

**UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E TOXICOLOGIA
APLICADA**



**EFEITO *IN VITRO* DOS CORPOS CETÔNICOS ÁCIDOS β -
HIDROXIBUTIRATO E ACETOACETATO SOBRE VÁRIOS PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS**

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre em Genética e
Toxicologia Aplicada

ANA PAULA BESKOW

Orientador: Prof. Dr. MOACIR WAJNER

Canoas
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dedico este trabalho ao meu pai.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Moacir, por todos os ensinamentos, conselhos, orientação, paciência e carinho em todos os momentos. Obrigada!.

Ao Guilhian, pessoa incrível que está sempre pronto para ajudar a todos. Muito obrigada por todo carinho, amizade e principalmente, paciência.

Aos bolsistas de iniciação científica: Bianca, Ângela, Alana, Alexandre Amaral, Matheus e Lisi, fundamentais para tornar a realização deste trabalho muito mais divertido!

Aos queridos colegas Carol Viegas, César, Anelise, Gus, Pati, Rafa, Carolzinha e Alexandre Solano pelas dicas, conversas, risadas, excelente convívio e pelo clima alegre que sempre proporcionaram.

A Lucila, pelo coleguismo e ajuda com os trabalhos na hora em que eu mais precisei.

A Doda, querida e maravilhosa amiga que me acolheu logo no primeiro dia que cheguei ao laboratório.

A minha querida bolsista Carol, indispensável para a realização deste trabalho. Obrigada pela conversa, pela dedicação, pela competência e pela diversão.

Ao meu querido marido. Sem o apoio dele com certeza eu não chegaria até aqui. Obrigada pela paciência, carinho e compreensão.

Ao meu pai que sempre me incentivou a estudar e que abriu mão de muita coisa em razão disto. A minha mãe, pelo apoio e compreensão nas horas difíceis que passamos neste ano. A minha querida irmã que mesmo longe sempre me deu apoio. Dedico essa minha conquista a vocês.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Síntese e Degradação de Corpos Cetônicos.....	17
1.1.1 Cetogênese	17
1.1.2 Cetólise	18
1.1.2.1 Cetoacidose em Doenças	19
1.2 Erros Inatos do Metabolismo (EIM)	20
1.2.1 Conceito e Classificação dos EIM	20
1.2.2 Sintomatologia	27
1.2.3 Erros Inatos do Metabolismo (EIM) e Cetonemia	31
1.3 Erros Inatos do Metabolismo dos Corpos Cetônicos.....	32
1.3.1 Deficiência de SCOT.....	32
1.3.1.1 Achados Clínicos.....	32
1.3.1.2 Fisiopatogenia do Dano Cerebral.....	32
1.3.1.3 Diagnóstico.....	33
1.3.1.4 Tratamento.....	33
1.3.2 Deficiência de T2	33
1.3.2.1 Achados Clínicos.....	33
1.3.2.2 Fisiopatogenia do Dano Cerebral.....	34
1.3.2.3 Diagnóstico.....	34
1.3.2.4 Tratamento.....	34
1.4 Radicais Livres.....	34
1.4.1 Definição.....	34
1.4.2 Lipoperoxidação.....	36
1.4.3 Defesas Antioxidantes.....	37
1.4.3.1 Defesas Antioxidantes Enzimáticas.....	37

1.4.3.1 Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas.....	39
1.5 Estresse Oxidativo.....	40
1.6 Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas	41
1.7 Efeito dos Corpos Cetônicos sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo.....	43
2. OBJETIVOS.....	46
2.1 Gerais.....	46
2.2 Específicos.....	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1 Reagentes.....	48
3.2 Animais.....	48
3.3 Preparação de Homogeneizado de Córtex Cerebral.....	48
3.4 Parâmetros de Estresse Oxidativo.....	49
3.4.1 Avaliação da Peroxidação Lipídica.....	49
3.4.1.1 Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS).....	49
3.4.1.2 Quimiluminescência.....	49
3.4.2 Medida da Oxidação de Proteínas.....	50
3.4.2.1 Medida de Grupamentos Sulfidríla.....	50
3.4.2.2 Formação de Carbonilas.....	50
3.4.3 Oxidação da 2',7'-Diclorofluoresceína (DCFH)	51
3.4.4 Avaliação das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas.....	51
3.4.4.1 Glutathiona Reduzida (GSH).....	51
3.4.4.2 Reatividade Antioxidante Total (TAR).....	52
3.4.5 Medida das Atividades das Enzimas Antioxidantes.....	53
3.4.5.1 Glutathiona Peroxidase (GPx)	53
3.4.5.2 Superóxido Dismutase (SOD).....	53
3.4.5.3 Catalase (CAT).....	53
3.4.6 Medida de Proteínas.....	54
3.5 Análise Estatística.....	54
4. RESULTADOS.....	55

4.1 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	55
4.2 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a o aumento dos níveis de TBA-RS induzidos por um sistema gerador de radicais hidroxila em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	56
4.3 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a o aumento dos níveis de TBA-RS na presença dos ácidos 3-metilglutacônico ou 3-hidroxi-3-metil-glutárico em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	58
4.4 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	59
4.5 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre o dano protéico em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens	60
4.5.1 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre o conteúdo de grupamentos sulfidríla em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens	60
4.5.2 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	62
4.6 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens	63
4.7 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre as defesas antioxidantes não enzimáticas em homogeneizado de córtex de ratos jovens.....	64
4.7.1 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de córtex de	

ratos jovens.....	64
4.7.2 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre as concentrações glutatona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	66
4.8 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a oxidação de uma solução comercial de glutatona reduzida (GSH).....	67
4.9 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a atividade das principais enzimas antioxidantes em homogeneizado de córtex de cérebros de ratos jovens.....	67
4.9.1 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) em homogeneizado de córtex de cérebros de ratos jovens.....	68
4.9.2 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	69
4.9.3 Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	71
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES.. ..	78
7. PERSPECTIVAS	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AcAc	ácido acetoacético
ABAP	2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano)
ANOVA	análise de variância
ASC	ácido ascórbico
BHB	ácido β -hiroxibutírico
CAT	catalase
DCF	2, 7-diclorofluoresceína
DCFH-DA	diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)
EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
EIM	erros inatos do metabolismo
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
Fe II	íon ferroso
Fe III	íon férrico
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
GPx	glutathiona peroxidase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LOOH	hidroperóxido lipídico
LOO•	radical peroxila
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
SPSS	pacote estatístico para ciências sociais
TAR	reatividade antioxidante total
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBA-RS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TRO	trolox

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Síntese de corpos cetônicos.....	18
Figura 1.2	Degradação de corpos cetônicos.....	19
Figura 1.3	Reação de iniciação, propagação e terminação da lipoperoxidação.....	36
Figura 1.4	Dismutação do radical superóxido pela SOD.....	38
Figura 1.5	Decomposição do peróxido de hidrogênio pela CAT.....	38
Figura 1.6	Decomposição do peróxido de hidrogênio ou outros lipoperóxidos pela GPx.....	39
Figura 1.7	Redução da GSSG pela GR.....	39
Figura 4.1	Efeito <i>in vitro</i> do ácido acetoacético (AcAc) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	55
Figura 4.2	Efeito <i>in vitro</i> do ácido β-hidroxibutírico (BHB) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	56
Figura 4.3	Efeito <i>in vitro</i> do ácido acetoacético (AcAc) sobre os níveis de TBA-RS na presença de um sistema gerador de radicais hidroxila em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	57
Figura 4.4	Efeito <i>in vitro</i> do ácido β-hidroxibutírico (BHB)) sobre os níveis de TBA-RS na presença de um sistema gerador de radicais hidroxila em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	57
Figura 4.5	Efeito <i>in vitro</i> do ácido β-hidroxibutírico (BHB) sobre o aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) (A) ou 3-hidroxi-3-metil-glutárico (HMG) (B) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	58
Figura 4.6	Efeito <i>in vitro</i> do ácido acetoacético (AcAc) sobre a	

	quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	59
Figura 4.7	Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-butírico (BHB) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	60
Figura 4.8	Efeito <i>in vitro</i> do ácido acetoacético (AcAc) sobre a medida de grupos sulfidrilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	61
Figura 4.9	Efeito <i>in vitro</i> do ácido β-hidroxi-butírico (BHB) sobre a medida de grupos sulfidrilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	61
Figura 4.10	Efeito <i>in vitro</i> do ácido acetoacético (AcAc) sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	62
Figura 4.11	Efeito <i>in vitro</i> do ácido β-hidroxi-butírico (BHB) sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	63
Figura 4.12	Efeito <i>in vitro</i> do ácido acetoacético (AcAc) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	63
Figura 4.13	Efeito <i>in vitro</i> do ácido β-hidroxi-butírico (BHB) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	64
Figura 4.14	Efeito <i>in vitro</i> do ácido acetoacético (AcAc) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de córtex de cérebros de ratos jovens.....	65
Figura 4.15	Efeito <i>in vitro</i> do ácido β-hidroxi-butírico (BHB) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de córtex de cérebros de ratos jovens.....	65
Figura 4.16	Efeito <i>in vitro</i> do ácido acetoacético (AcAc) sobre as concentrações de GSH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	66

Figura 4.17	Efeito <i>in vitro</i> do ácido β -hidroxibutirico (BHB) sobre as concentrações de GSH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	66
Figura 4.18	Efeito <i>in vitro</i> do ácido acetoacético (AcAc) e do β -hidroxibutirico (BHB) sobre a oxidação de uma preparação comercial de glutathiona reduzida (GSH).....	67
Figura 4.19	Efeito <i>in vitro</i> do ácido acetoacético (AcAc) sobre a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	68
Figura 4.20	Efeito <i>in vitro</i> do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	69
Figura 4.21	Efeito <i>in vitro</i> do ácido acetoacético (AcAc) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	70
Figura 4.22	Efeito <i>in vitro</i> do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	70
Figura 4.23	Efeito <i>in vitro</i> do ácido acetoacético (AcAc) sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	71
Figura 4.24	Efeito <i>in vitro</i> do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos Erros Inatos do Metabolismo (EIM).....	22
Tabela 2	Principais manifestações clínicas dos erros inatos do metabolismo de moléculas pequenas.....	29
Tabela 3	Principais manifestações clínicas dos erros inatos do metabolismo de moléculas complexas.....	31

RESUMO

Os corpos cetônicos ácido acetoacético (AcAc), ácido β -hidroxibutírico (BHB) e acetona são formados principalmente a partir de ácidos graxos no fígado. A utilização de corpos cetônicos é feita através da sua degradação (cetólise) que ocorre na mitocôndria de tecidos extrahepáticos, particularmente no coração, rim e cérebro, via reação reversível catalisada pela succinil CoA: 3-cetoácido CoA transferase (SCOT) e acetoacetil- CoA tiolase mitocondrial (T2). Os corpos cetônicos são freqüentemente encontrados em concentrações elevadas no jejum, na diabete mérito descompensada e nas deficiências da SCOT e da T2 (distúrbios hereditários do metabolismo dos corpos cetônicos), quando atingem níveis plasmáticos tão altos quanto 25 mM. A maioria dos pacientes afetados por deficiência da SCOT apresenta letargia e coma, acompanhados de elevados níveis de AcAc e BHB, além de hipoglicemia e acidose metabólica. Por outro lado, os pacientes acometidos por deficiência da T2 apresentam atraso no desenvolvimento físico e psicomotor, com lesões no córtex cerebral e gânglios da base, embora alguns sejam assintomáticos. A fisiopatogenia do dano cerebral dos pacientes portadores dessas deficiências é pouco conhecida. O presente trabalho investigou os efeitos *in vitro* do AcAc e do BHB sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos de 30 dias de idade. Neste particular, deve ser enfatizado que o efeito dos corpos cetônicos sobre parâmetros de estresse oxidativo tem sido pouco estudado e que os dados disponíveis mostram estudos contraditórios realizados principalmente em órgãos periféricos e, no que se refere às suas capacidades de gerar de espécies reativas ou mesmo seqüestrá-las. Verificamos que tanto o AcAc quanto o BHB, em concentrações de até 25 mM, não alteraram a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens, indicando que esses metabólitos não causam lipoperoxidação neste tecido. Além disso, esses corpos cetônicos não modificaram a oxidação de sulfidrilas e o conteúdo de carbonilas, indicando que não provocam dano oxidativo protéico. Similarmente, não foram verificadas alterações na oxidação do diacetato de 2, 7-

diclorofluoresceína quando sobrenadantes corticais foram expostos ao AcAc e ao BHB, indicando que esses ácidos não induzem a produção de espécies ativas, principalmente radicais hidroxila e peroxinitrito. Observamos também que o AcAc e o BHB não alteraram as defesas antioxidantes não enzimáticas, determinadas pelas medidas da reatividade antioxidante total e da glutathiona reduzida (GSH), bem como as enzimáticas, medidas pelas atividades das enzimas glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Com o objetivo de melhor esclarecer se esses corpos cetônicos possuem uma ação antioxidante, testamos o efeito do BHB sobre os níveis de TBA-RS na presença dos ácidos 3-hidroxi-3-metilglutárico e 3-metilglutacônico, metabólitos capazes de gerar espécies reativas, e também na presença de um sistema de produção do radical hidroxila. Mesmo nestas condições com estímulo de produção de radicais livres, o BHB não foi capaz de prevenir o aumento de TBA-RS induzido pelos ácidos 3-hidroxi-3-metilglutárico e 3-metilglutacônico e pelo sistema gerador do radical hidroxila induzido pela reação de Fenton. Finalmente testamos o efeito do AcAc e do BHB sobre a oxidação de uma solução comercial purificada de GSH e observamos que estes ácidos não foram capazes de oxidar a GSH presente na solução comercial. Concluindo, nossos resultados sugerem que os ácidos AcAc e BHB não possuem ações antioxidante ou pró-oxidante *in vitro* em córtex cerebral de ratos jovens. Portanto, não se pode atribuir os sintomas neurológicos da deficiência de SCOT e de T2 e em outros distúrbios hereditários durante episódios de descompensação metabólica, em que as concentrações dos corpos cetônicos AcAc e BHB estão elevadas, ao aumento das concentrações cerebrais desses compostos.

ABSTRACT

The ketone bodies (KB) acetoacetic acid (AcAc), β -hydroxybutyric acid (BHB) and acetone are generated mainly from fatty acids in the liver, being the former two transported to other peripheral tissues and brain. Ketone body utilization depends on their degradation (ketolysis) that occur in the mitochondria of extrahepatic tissues, particularly in the heart, kidney and brain through the reversible reaction catalyzed by succinyl CoA: 3-ketoacid CoA transferase (SCOT) and mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2). KB are frequently found at elevated concentrations during fasting, decompensated diabetes and in SCOT and T2 deficiencies (inherited metabolic disorders of ketone body metabolism), achieving plasma levels as high as 25 mM. Most patients affected by SCOT deficiency present lethargy and coma, associated with high levels of AcAc and BHB, besides hypoglycemia and metabolic acidosis. Patients with T2 deficiency present physical and mental development delay, with alterations in cerebral cortex and basal ganglia, although some are asymptomatic. The pathophysiology of the brain damage in these disorders is virtually unknown. The present work studied the *in vitro* effects of AcAc and BHB on a large spectrum of oxidative stress parameters in cerebral cortex of 30-day-old rats. It is emphasized that few studies exist on the effect of KB on oxidative stress parameters and that the available data comprehend studies carried out in peripheral tissues and are contradictory in what concerns to their ability to induce or scavenge reactive species. We verified that AcAc and BHB, at concentrations as high as 25 mM, did not alter thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) levels and chemiluminescence in cortical supernatants, indicating that they do not induce lipid peroxidation. Besides, these KB did not modify sulfhydryl and carbonyl content, as well as 2, 7-dichlorofluorescein diacetate oxidation, indicating that these substances do not provoke protein oxidative damage and do not induce reactive species generation. We also verified that AcAc and BHB did not alter the non-enzymatic antioxidant defenses, determined by total antioxidant reactivity and reduced glutathione (GSH) levels, as well as the enzymatic antioxidant defenses, evaluated by the

activities of the enzymes glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Furthermore, we verified that the KB did not affect the increased TBA-RS levels provoked by 3-hydroxy-3-methylglutaric and 3-methylglutaconic acids and by a hydroxyl-induced generation system, indicating that these acids do not have antioxidant properties, even under conditions with increased reactive species generation. Finally, we observed that AcAc and BHB were not able to oxidize a commercial GSH solution. Our results suggest that AcAc and BHB do not have antioxidant or pro-oxidant effects in vitro in cerebral cortex of young rats. Therefore, we cannot attribute the neurological symptoms of SCOT and T2 deficiencies and of other inherited disorders during metabolic decompensation, in which the concentrations of AcAc and BHB are increased, to the cerebral increase of these compounds.

1. INTRODUÇÃO

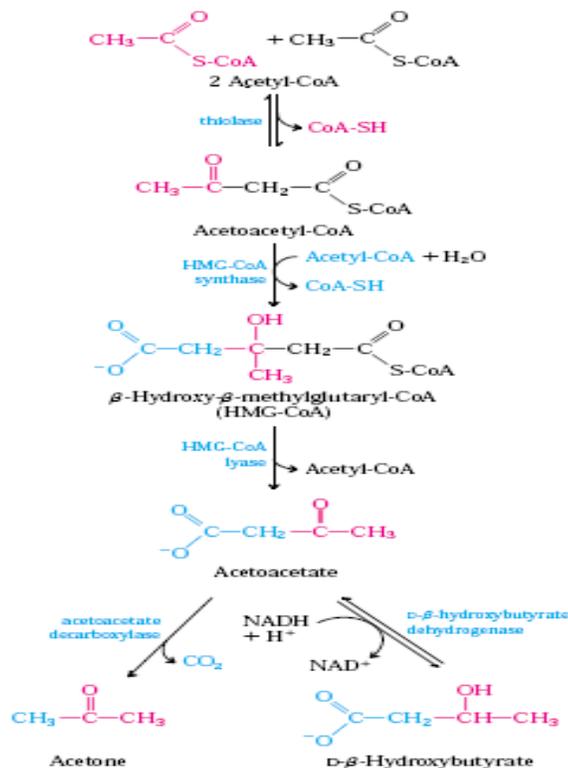
1.1 Síntese e Degradação de Corpos Cetônicos

Os corpos cetônicos ácido acetoacético, ácido β -hidroxibutírico e acetona são formados principalmente a partir dos ácidos graxos no fígado, sendo os dois primeiros transportados deste órgão para outros tecidos periféricos e cérebro, onde são reconvertidos a acetil-CoA e utilizados como fonte de energia.

1.1.1 Cetogênese

A cetogênese é um processo fisiológico muito importante. É fundamentalmente hepática e sua regulação é essencialmente dependente da concentração dos hormônios insulina e glucagon. No jejum, a diminuição da concentração de glicose sanguínea provoca uma diminuição da concentração da insulina e um aumento da concentração de glucagon. A mudança de concentração destes dois hormônios tem como principais conseqüências, a nível hepático, uma inibição da glicólise, um aumento da neoglicogênese uma inibição da síntese dos ácidos graxos (lipólise) e uma degradação acentuada de ácidos graxos levando a formação de corpos cetônicos (cetogênese) (NELSON e COX, 2004).

Nos vertebrados, a acetil-CoA proveniente fundamentalmente da β -oxidação de ácidos graxos pode ser convertida na mitocôndria a citrato ou utilizada na síntese dos corpos cetônicos. Este processo, chamado cetogênese ocorre na mitocôndria. As primeiras etapas da cetogênese são semelhantes à da síntese do colesterol. Duas moléculas de acetil-CoA são convertidas a acetoacetil-CoA em reação catalisada pela acetoacetil-CoA sintetase. A β -hidroxi- β -metil-glutaril-CoA formada é convertida em acetoacetato, que pode ser convertido em β -hidroxibutirato ou acetona, como pode ser observado na figura 1.1 (NELSON e COX, 2004).



1.1.2 Cetólise

O ácido acetoacético e o ácido β-hidroxibutírico, quando produzidos em grandes quantidades, são, após sofrerem cetólise, utilizados como fonte energética por diversos tecidos como o músculo cardíaco, o rim e o cérebro. Estes corpos cetônicos difundem livremente através das membranas celulares. Nestes tecidos o ácido β-hidroxibutírico é inicialmente convertido a acetoacetato em reação catalisada pela β-hidroxibutirato desidrogenase. Esta reação pode ocorrer em ambos os sentidos dependendo da disponibilidade de NADH, como pode ser observado na figura 1.2 (NELSON e COX, 2004).

As reações seguintes são catalisadas pela succinil-CoA: 3-cetoácido-CoA transferase (SCOT) e acetoacetyl-CoA tiolase mitocondrial (T2), resultando em acetil-CoA.

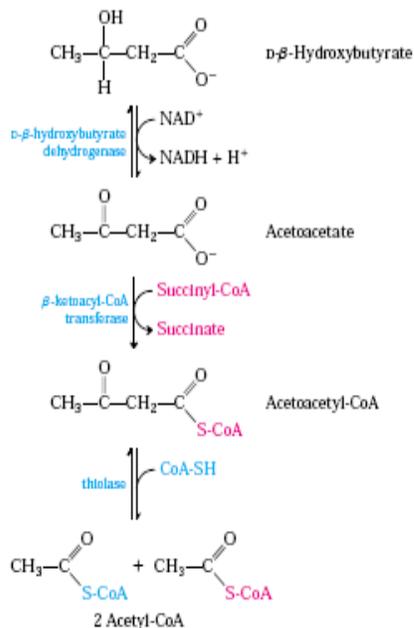


Figura 1.2: Degradação dos Corpos Cetônicos.

Os corpos cetônicos apresentam concentrações plasmáticas usualmente de até 0,2 mM no estado pós-prandial, porém no jejum estes níveis estão acima deste valor, podendo chegar a 7 mM na descompensação metabólica (NELSON e COX, 2004).

A cetonemia indica geralmente que a lipólise está ativada. Com exceção da cetonemia persistente que ocorre na deficiência de succinil-CoA: 3-cetoácido-CoA transferase (SCOT), a cetonemia é geralmente intermitente.

1.1.2.1 Cetoacidose nas Doenças

Em algumas doenças como na cetoacidose diabética, durante as crises de descompensação as concentrações séricas dos corpos cetônicos podem ultrapassar 25 mM (MITCHELL e FUKAO, 2001). A cetoacidose diabética é a causa mais comum de cetonemia em crianças e adultos. Já a cetoacidose alcoólica ocorre após excessivo consumo de álcool acompanhado de jejum e os níveis séricos do ácido β-hidroxibutírico ficam entre 2 e 20 mM. A cetonemia e a cetonúria durante episódios de descompensação também ocorre em infecções sistêmicas e em alguns erros inatos do metabolismo. Neste particular, nos distúrbios hereditários da cetólise como na deficiência de succinil-CoA: 3-cetoácido-CoA transferase (SCOT), que é o enfoque de nosso trabalho,

as concentrações dos corpos cetônicos encontram-se permanentemente elevadas com níveis plasmáticos semelhantes aos da cetoacidose diabética.

1.2 Erros Inatos do Metabolismo (EIM)

1.2.1 Conceito e Classificação dos EIM

O termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi utilizado pela primeira vez por Archibald Garrod em 1908, durante estudos realizados com pacientes com alcaptonúria, doença em que os pacientes afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. O pesquisador observou que, freqüentemente, um ou mais indivíduos da mesma família demonstravam ser afetados sem que seus pais ou demais parentes apresentassem a doença. Baseado também na observação da maior incidência de consangüinidade entre os pais dos pacientes e nas leis de Mendel, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio. Através da determinação do ácido homogentísico na urina de pacientes com alcaptonúria e da observação de que esta substância era um metabólito normal da degradação da tirosina, ele relacionou este acúmulo a um bloqueio na conversão do ácido homogentísico até fumarato e acetoacetato. Verificou-se mais tarde que tais alterações resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína enzimática (SCRIVER *et al.*, 2001).

Atualmente, mais de 500 EIM foram bioquimicamente caracterizados, sendo que a maioria envolve processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (SCRIVER *et al.*, 2001).

Os pacientes portadores de algum tipo de EIM apresentam sintomatologia muito variada e inespecífica, mesmo os que possuem o mesmo distúrbio. Essa variação fenotípica deve-se a diferentes graus de deficiência enzimática, áreas do metabolismo envolvidas e tecidos afetados. No entanto, as manifestações clínicas mais comuns nos EIM devem-se ao acometimento do SNC, com retardo neuropsicomotor, crises encefalopáticas, neurodegeneração progressiva e outras alterações neurológicas (BURTON, 1987).

A maioria dos EIM deve-se à deficiência na atividade de uma enzima. A ausência ou deficiência severa da atividade enzimática leva a um bloqueio metabólico com acúmulo dos substratos e seus derivados, com repercussão clínica variável no indivíduo, dependendo da importância da rota afetada. No entanto, geralmente provocam sintomatologia grave e, algumas vezes, letal. Os EIM já foram descritos em todas as áreas do metabolismo humano normal (MITCHELL e FUKAO, 2001). É comum que episódios de descompensação metabólica durante os quais ocorrem os sintomas severos, algumas vezes acompanhados por lesão cerebral, surjam após infecções ou jejum prolongado que estão por sua vez associados à cetonemia.

Sinclair (1982) classificou os EIM em quatro grandes grupos conforme o tipo de função exercida pela proteína deficiente e o tecido envolvido, considerando ainda aspectos clínicos, bioquímicos, patológicos e terapêuticos:

- a) desordens de transporte: envolvem proteínas transportadoras de moléculas orgânicas ou inorgânicas. Exemplos: deficiência de dissacaridases e defeito no transporte de magnésio;
- b) desordens de armazenamento, degradação e secreção: envolvem proteínas relacionadas com o aparelho de Golgi ou lisossomas, na sua grande maioria, provocando acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos. Exemplos: doenças lisossômicas de depósito, glicogenoses e cistinose;
- c) desordens de síntese: envolvem a síntese de proteínas com funções hormonais, de defesa imunológica, estrutural, etc. Exemplo: hiperplasia adrenal congênita por deficiência na atividade da enzima de 21-hidroxilase, hipogamaglobulinemia;
- d) desordens do metabolismo intermediário: caracterizam-se por deficiências enzimáticas das rotas do metabolismo intermediário de moléculas pequenas, comprometendo importantes rotas, como o ciclo do ácido tricarboxílico, o ciclo da uréia, ou outras rotas. Assim, o substrato da enzima deficiente se acumula e, a menos que haja uma rota alternativa para metabolizá-lo, o produto final da reação não será

formado. Os mecanismos de injúria podem ocorrer pela ação do substrato acumulado que pode ser tóxico, levando a alterações bioquímicas e danos em determinados tecidos por ser liberado na circulação e transportado para todo o organismo, por seus metabólitos ou pela falta de substâncias essenciais ao desenvolvimento do organismo, causada pelo bloqueio metabólico. Considerados os mais freqüentes EIM, essas desordens têm como exemplo as acidúrias orgânicas, as aminoacidopatias, as desordens do metabolismo das purinas e pentoses, e outros.

Outra classificação de EIM leva em conta a área do metabolismo afetada com especial ênfase para os metabólitos acumulados (Tabela 1).

Tabela 1- Classificação dos erros inatos do metabolismo (EIM)

EIM DOS CARBOIDRATOS

Defeitos no metabolismo da frutose

Defeitos no metabolismo do glicogênio (glicogenoses)

Defeitos no metabolismo da galactose

Pentosúria

EIM DOS AMINOÁCIDOS

Hiperfenilalaninemias

Tirosinemia e desordens relacionadas

Defeitos no metabolismo da histidina

Defeitos no metabolismo da prolina e hidroxiprolina

Hiperornitinemias

Defeitos no ciclo da uréia

Defeitos no metabolismo da lisina

Defeitos no metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada (valina,

leucina, isoleucina).

Defeitos na transulfuração

Sarcosinemia

Hiperglicinemia não cetótica

Defeitos nos beta-aminoácidos livres e em peptídeos

EIM DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS

Alcaptonúria

Acidúrias orgânicas de cadeia ramificada

Defeitos no metabolismo do propionato e metilmalonato

Acidúrias orgânicas por defeitos no metabolismo da lisina

Desordens do ciclo gama-glutamil

Acidemia láctica

Deficiência de acil-CoA desidrogenases

Acidemia glutárica tipo II e deficiência na cadeia respiratória mitocondrial

Hiperoxalúrias primárias

Defeitos no metabolismo do glicerol

EIM DAS PURINAS E PIRIMIDINAS

Defeitos no metabolismo das purinas

Defeitos no metabolismo das pirimidinas

EIM DAS LIPOPROTEÍNAS

Deficiência de apolipoproteínas

Deficiências enzimáticas do metabolismo das lipoproteínas

Deficiência de receptores para lipoproteínas

Deficiência das proteínas “transferidoras”

Doenças familiares de armazenamento de glicerol

EIM DAS PORFIRINAS E HEME

Porfirias

EIM DAS BILIRRUBINAS

Síndrome de Crigler-Najjar

Síndrome de deficiência de uridina difosfato glicuronil transferase tipo II

Síndrome de Gilbert

Síndrome de Dubin-Johnson

Síndrome de Rotor

Colestase intrahepática recorrente benigna

EIM DOS METAIS

Defeitos no transporte de cobre

Hemocromatose

Defeitos no cofator molibdênio

DESORDENS DOS PEROXISSOMAS

Defeitos na biogênese dos peroxissomais

Adrenoleucodistrofia

Doença de Refsun

Acatasemia

DOENÇAS LISSÔMICAS

Mucopolissacaridoses

Mucolipidoses

Defeitos na degradação de lipoproteínas

Defeitos de lípase ácida lisossômica

Doença de Farber
Lipidose esfingomielina-colesterol
Doença de Gaucher
Doença de Krabbe
Sulafatídeo lipidose
Doença de Fabry
Doença de Schindler
Gangliosidoses

EIM DOS HORMÔNIOS (síntese e ação)

Defeitos do metabolismo da tireóide
Hiperplasia adrenal
Síndrome de resistência a andrógenos
Deficiência de esteróide sulfatase
Defeitos do hormônio do crescimento
Diabete insipidus nefrogênico familiar
Pseudohipoparatiroidismo
Defeitos do metabolismo da vitamina D e outros calciferóis

EIM DAS VITAMINAS

Defeitos no metabolismo do folato
Defeitos no metabolismo da cobalamina
Defeitos no metabolismo da biotina

EIM DO SANGUE E TECIDOS HEMATOPOÉTICOS

Deficiência de fatores de coagulação vitamina K-dependente
Deficiência do fator XIII e fibrinogênio
Deficiência do fator VIII e fator V

Doença de Von Willebrand

Defeitos na ativação por contato (deficiência de fator XI, XII, pré-calcreína e cininogênio).

Defeitos de antitrombina

Defeitos hereditários das plaquetas

Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase

Metahemoglobina hereditária enzimopênica

Hemoglobinopatias

Deficiência de piruvato quinase e de outras enzimas eritrocitárias

Defeitos na membrana do eritrócito (esferocitose e eliptocitose)

Deficiência de alfa-1-antitripsina

Amiloidose

EIM DOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE MEMBRANA

Sistema contratransporte glicose/sódio

Cistinúria

Aminoacidúrias catiônicas

Doença de Hartnup

Iminoglicinúria familiar

Acidose tubular renal

Hipofosfatemias

Hiperuricemia renal hereditária

Defeitos no transporte lisossômico

Fibrose cística

EIM DOS MECANISMOS DE IMUNIDADE E DEFESA

Síndrome de deficiências imunoglobulinas

Imunodeficiência de linfócitos B e T
Desordens do sistema do complemento
Discinesia ciliar primária (Síndrome de Kartagener)
Defeitos na mobilidade de leucócitos
Defeitos hereditários dos fagócitos “killer”

EIM DO TECIDO CONJUNTIVO

Desordens do colágeno
Hipofosfatasia
Síndrome de deficiência de anidrase carbônica tipo II
Distrofias musculares

EIM DA PELE

Albinismo
Xeroderma pigmentosum

EIM DO INTESTINO

Deficiência hereditária de dissacaridases

Fonte: Baseada em Scriver (2001).

A identificação de um EIM permite, muitas vezes, a introdução de um tratamento eficaz. Quando isso é possível, a ocorrência de outros afetados no mesmo grupo familiar pode ser evitada pela identificação de casais em risco, aos quais pode ser oferecido o aconselhamento genético e, em muitos casos, o diagnóstico pré-natal (SCRIVER, 2001).

1.2.2 Sintomatologia

Os pacientes portadores de erros inatos do metabolismo apresentam sintomas muito variados e inespecíficos, inclusive aqueles que possuem o mesmo distúrbio, pois a expressividade é muito variável. Essa variação fenotípica deve-se a diferentes graus de deficiência enzimática, área do

metabolismo envolvida e tecidos afetados. Algumas manifestações clínicas aparecem com maior freqüência no período neonatal, tais como deficiência no crescimento, vômitos, diarreia, convulsões, letargia ou coma, odor peculiar na pele ou urina e dificuldade alimentar, enquanto outras (atraso no desenvolvimento psicomotor, neurodegeneração progressiva) podem aparecer mais tarde (BURTON, 1987).

Uma gama de sintomas e sinais clínicos deve alertar o médico para esse grupo de doenças. A forma de aparecimento dos sintomas é um fator importante na distinção entre os dois grandes grupos de EIM: erros inatos devido a alterações do metabolismo intermediário e erros inatos devidos ao depósito celular de macromoléculas. Os defeitos do metabolismo intermediário que levam ao acúmulo de moléculas pequenas (ex.: aminoácidos e ácidos orgânicos) geralmente têm uma apresentação clínica súbita e a evolução se caracteriza por episódios de agudização recorrentes geralmente precedidos por infecções, ingestão alimentar exagerada de alimentos específicos, cirurgia, jejum ou outras condições de catabolismo elevado, pois nestas situações ocorre degradação de proteínas ou lipídeos que vão originar os metabólitos tóxicos (ex.: defeitos do ciclo da uréia e acidemias orgânicas). São consideradas doenças de intoxicação e/ou de comprometimento do metabolismo energético, pois várias dessas entidades patológicas caracterizam-se por prejuízo deste metabolismo.

Nos intervalos entre as crises, os pacientes podem estar clinicamente normais. Para muitas destas doenças é, portanto, essencial que as amostras para análise laboratorial sejam coletadas nos momentos de crise metabólica. O exame físico geralmente é inespecífico, assim como os exames histopatológicos dos órgãos mais afetados. O tratamento agudo com restrição alimentar específica (proteínas, lipídios ou glicídios) associada ou não à suplementação de vitaminas (que ajudam as reações enzimáticas) mostra resultados extraordinários, retirando o paciente da crise em poucas horas.

Um outro grupo dessas doenças mostra uma evolução crônica desde o nascimento ou nos primeiros meses ou anos de vida. Nesses casos, a intoxicação é crônica (ex.: fenilcetonúria) e os afetados apresentam um atraso

na aquisição das habilidades motoras (ex.: caminhar), não adquirindo em muitos casos as habilidades cognitivas normais.

A Tabela 2 mostra os principais achados clínico-laboratoriais que devem levar a suspeita de um EIM de intoxicação ou de deficiência energética (erros inatos devidos à alteração em moléculas pequenas). Pode-se observar que os sintomas predominantes são neurológicos, sugerindo que este tecido é mais suscetível aos metabólitos acumulados nestas doenças.

Tabela 2 - Principais manifestações clínicas dos erros inatos do metabolismo de moléculas pequenas (aminoacidopatias, acidemias orgânicas, galactosemia, intolerância hereditária à frutose, etc).

Neonato

Vômitos incoercíveis
Recusa alimentar
Hipotonia/hipertonia
Letargia, coma intermitente.
Convulsões de causa desconhecida
Mioclonias
Miopatia/cardiomiopatia
Taquipnéia/apnéia
Dismorfismo
Odor peculiar na urina ou no paciente
Macrocefalia

Criança com até 10 anos de idade

Intolerância alimentar
Atraso no desenvolvimento físico e psicomotor
Ataxia, hipotonia, coreoatetose, paraparesia espástica, marcha anormal,
Microcefala / macrocefala, distúrbio de comportamento.
Hepatomegala/hepatopatia, pancreatite, urolitíase, disfunção tubular

renal.

Deslocamento de cristalino, atrofia ótica.

Alterações esqueléticas

Alopecia, alterações pigmentares na pele e cabelos.

Odor peculiar na urina ou no paciente

Doença aguda precipitada por estresse (infecção, cirurgia ou indiscrição alimentar).

Adolescente até a fase juvenil

Retardo mental, estupor ou ataxia episódica, sintomas neuropsiquiátricos, letargia, coma.

Oclusão vascular prematura

Hepatomegalia, urolitíase

Deslocamento do cristalino, retinite pigmentar.

Alterações esqueléticas

Odor peculiar

Doença aguda precipitada por estresse (infecção, cirurgia ou indiscrição alimentar).

Os EIM de moléculas complexas ou de organelas (doenças lisossômicas de depósito e peroxissomais) manifestam-se na sua quase totalidade de uma forma crônica e progressiva, atingindo tecidos e órgãos (fígado, baço, medula óssea e encéfalo) em que os substratos (glicogênio, lipídeos complexos, mucopolissacarídeos) que não podem ser degradados ali se depositam. É comum encontrar nesses pacientes distorções e sinais clínicos específicos (hepatomegalia, esplenomegalia, leucodistrofia, etc.). A doença geralmente se manifesta após os primeiros meses ou anos de vida e é comum o afetado perder as habilidades motoras e cognitivas que já tinham sido adquiridas. Os exames histopatológicos, nos afetados por várias dessas doenças são bastante informativos (presença de glicogênio no fígado nas glicogenoses, de lipídeos específicos em vários tecidos nas lipidoses, etc.). O tratamento dessas doenças, no entanto, é ainda experimental para a maioria das doenças deste

grupo, sendo que a reposição enzimática tem tido recentemente sucesso em várias delas (SCRIVER *et al.*, 2001; HUGHES *et al.*, 2007; SIMON *et al.*, 2008; CHOI *et al.*, 2008; ORTIZ *et al.*, 2008; VEDDER *et al.*, 2008; GRABOWSKI G.A., 2008).

A tabela 3 mostra sinais clínicos que levam a suspeita de doenças de moléculas complexas (EIM de armazenamento).

Tabela 3- Principais manifestações clínicas dos erros inatos do metabolismo de moléculas complexas (doenças lisossômicas de depósito, doenças peroxissomais, etc).

-
-
- ⇒ Retardo mental progressivo
 - ⇒ Dismorfias (gargolismo, etc.)
 - ⇒ Anormalidades no esqueleto
 - ⇒ Hepatoesplenomegalia
 - ⇒ Atraso no desenvolvimento
 - ⇒ Opacidade de córnea
 - ⇒ Comportamento agressivo/Irritabilidade
 - ⇒ Dificuldade auditiva e visual
-
-

1.2.3 Erros Inatos do Metabolismo (EIM) e Cetonemia

Pacientes afetados por distúrbios hereditários metabólicos principalmente os de intoxicação freqüentemente apresentam crises de descompensação metabólica devidos ao catabolismo acelerado (infecções, vacinas, cirurgia, jejum, etc.), acompanhadas de cetoacidose intermitente. Durante esses episódios, os sintomas neurológicos pioram, podendo ocorrer dano cerebral, algumas vezes verificado por alterações na ressonância magnética ou tomografia cerebral. Além disso, há alguns EIM de cetólise,

caracterizados bioquimicamente por elevações persistentes dos níveis teciduais de corpos cetônicos.

1.3 Erros Inatos do Metabolismo dos Corpos Cetônicos

A utilização de corpos cetônicos é feita através da sua degradação (cetólise) que ocorre na mitocôndria de tecidos extrahepáticos, particularmente no coração, rim e cérebro, via reação reversível catalisada pela succinil CoA: 3-cetoácido CoA transferase (SCOT) e acetoacetil- CoA tiolase mitocondrial (T2). A capacidade cetolítica é fundamentalmente determinada pela concentração circulante de corpos cetônicos e é proporcional à atividade da SCOT. Há dois distúrbios hereditários do metabolismo dos corpos cetônicos devidos a deficiência da SCOT e da T2, respectivamente em que ocorre aumento acentuado de corpos cetônicos de forma persistente que se acentua durante as crises.

1.3.1 Deficiência de SCOT

A deficiência de SCOT foi inicialmente descrita em 1972 por Tildon e Cornblath e é uma doença autossômica recessiva. Os pacientes estudados apresentavam episódios de cetoacidose. A deficiência de SCOT, quando não tratada, é fatal, enquanto o tratamento diminui a mortalidade e a morbidade (TILDON e CORNBATH 1972; FUKAO *et al.*, 2004).

1.3.1.1 Achados Clínicos

A doença se manifesta logo após o nascimento (1^a semana de vida) ou mais tarde até os dois anos de vida. A maioria dos afetados apresenta letargia e coma, acompanhados de elevados níveis séricos dos ácidos β -hidroxibutírico e acetoacético, além de hipoglicemia e acidose metabólica, sendo que alguns pacientes apresentam também cardiomegalia e insuficiência cardíaca congestiva (MITCHELL e FUKAO, 2001).

1.3.1.2 Fisiopatogenia do Dano Cerebral

A fisiopatogenia do dano cerebral e cardíaco que acomete pacientes com deficiência de SCOT é desconhecida.

1.3.1.3 Diagnóstico

A deficiência de SCOT deve ser investigada em crianças com cetoacidose severa ou recorrente, acompanhada de cetonúria, ou mesmo com cetonúria persistente (BENNETT *et al.*, 1996).

O diagnóstico enzimático é feito em fibroblastos ou em linfoblastos, podendo-se também fazer o diagnóstico molecular da deficiência de SCOT. Já o diagnóstico pré-natal também pode ser realizado por amniocentese ou cultura de células do líquido amniótico com a medida da atividade da enzima SCOT em amniócitos ou por determinação de mutações nestas células (SAKAZAKI *et al.*, 1995; FUKAO *et al.*, 2004;).

1.3.1.4 Tratamento

O tratamento desta doença é feito por redução da cetogênese. Após o diagnóstico, é recomendado um tratamento com ingestão freqüente de carboidratos com restrição de proteínas para evitar a formação de corpos cetônicos. Também se administra L- carnitina (MIDDLETON *et al.*, 1987).

1.3.2 Deficiência de T2

A deficiência de β -cetotilase (T2) foi inicialmente descrita em 1971, sendo um distúrbio do metabolismo de corpos cetônicos que se apresenta com episódios de cetoacidose.

1.3.2.1 Achados Clínicos

Há uma grande heterogeneidade clínica na deficiência de T2, sendo que alguns pacientes são assintomáticos. No entanto, a grande parcela dos pacientes afetados apresenta cefaléia, atraso no desenvolvimento físico e mental, distonia e crises encefalopáticas, além de cardiomiopatia e neutropenia. (BJORKHEM *et al.*, 1986; WANDERS *et al.*, 1986; CLAYTON *et al.*, 1994; BIERMANN *et al.*, 1999; HOFFMANN *et al.*, 1999;). Pode-se observar necrose cortical e nos gânglios da base, com perda neuronal, glicose e outras anormalidades nestas estruturas cerebrais.

1.3.2.2 Fisiopatogenia do Dano Cerebral

A fisiopatogenia do dano cerebral nestes pacientes é pouco conhecida, havendo um relato de que os metabólitos acumulados nesta doença possam inibir a respiração celular (ROSA *et al.*, 2005).

1.3.2.3 Diagnóstico

Os pacientes afetados apresentam crises intermitentes de cetonemia com cetoacidose e excretam predominantemente na urina corpos cetônicos, bem como os ácidos 3-metil- β -hidroxibutírico, 2-metilacetoacético e tigilil glicina.

1.3.2.4 Tratamento

O tratamento da deficiência de T2 é similar ao da deficiência de SCOT.

1.4 Radicais Livres

1.4.1 Definição

Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (SOUTHORN e POWIS, 1988; HALLIWELL, 2001; HALLIWELL, 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007a). O desemparelhamento de elétrons, situação energeticamente instável, é o que confere alta reatividade a essas espécies. Os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical. Radicais podem também ser formados em um processo de fissão homolítica, no qual uma ligação covalente é quebrada e cada elétron do par compartilhado permanece com cada um dos átomos envolvidos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Quando um radical livre reage com um composto não-radical, outro radical livre pode ser formado. Assim, a presença de um único radical pode iniciar uma seqüência de reações em cadeia de transferência de elétrons (redox) (MAXWELL, 1995). Nas reações em cadeia induzidas pelos radicais livres, um radical reativo leva à formação de um produto que também é um radical livre e que, por sua vez, reage produzindo um terceiro radical.

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, com incorporação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido a intermediários reativos como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (OH^{\bullet}), e também a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (BOVERIS, 1998).

O termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do O_2 , o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}), mas também alguns não-radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio *singlet* (1O_2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007b). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) os principais representantes.

As ERO e ERN ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos do organismo. Fisiologicamente, essas espécies reativas apresentam diversas funções (BERGENDI *et al.*, 1999). Assim, um aumento da liberação local de radicais livres pode ser benéfico, como é o caso da liberação de espécies tóxicas oxidantes pelos neutrófilos, que podem atuar na defesa do hospedeiro contra uma infecção (DELANTY e DICHTER, 1998; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007a). Participam ainda de processos de sinalização celular e também estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas (WARD e PETERS, 1995).

Por outro lado, quando formadas em excesso, essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas (MAXWELL, 1995). Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, os radicais livres podem promover lipoperoxidação, causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), reagir com proteínas, levando à sua inativação e conseqüente alteração de sua função e reagir com o DNA e RNA, levando a

mutações somáticas e a distúrbios de transcrição (DELANTY e DICHTER, 1998; HALLIWELL E WHITEMAN, 2004), entre outros efeitos.

1.4.2 Lipoperoxidação

Antes de ser vista como um mecanismo de dano oxidativo, a lipoperoxidação deve ser considerada como um processo fisiológico contínuo que ocorre normalmente nas membranas celulares. Além de ser um fator de renovação da membrana, este processo é essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose. No entanto, por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo. Assim, quando a produção de espécies reativas aumenta acima da capacidade de detoxificação, a lipoperoxidação acelerada acarretará profundas alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Isso irá causar perda de seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído e o 4-hidroxinonenal, entre outros eventos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A lipoperoxidação possui etapas de iniciação, propagação e terminação (Figura 1.3) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007a), podendo ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidróxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos capazes de iniciar nova cadeia de reações, denominada ramificação.

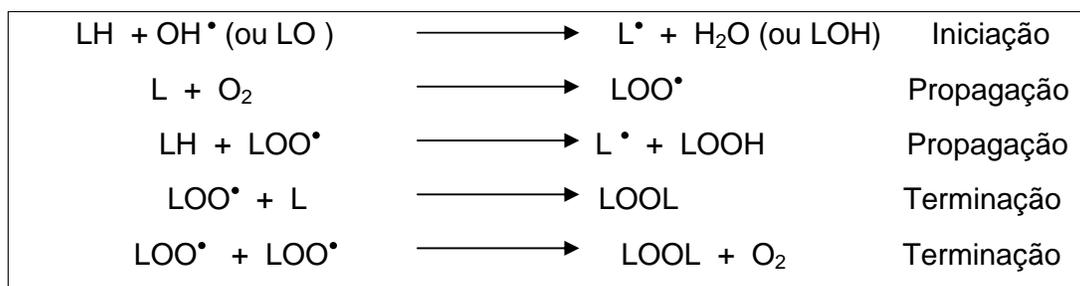


Figura 1.3. Reações de iniciação, propagação e terminação da lipoperoxidação. Adaptado de FERREIRA e MATSUBARA (1997).

A iniciação é causada pelo ataque a um lipídio de membrana por parte de qualquer espécie que tenha reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-CH_2-$). Nesse contexto, radicais hidroxila

podem prontamente iniciar a lipoperoxidação. Já que o átomo de hidrogênio tem apenas um elétron, a retirada de H[•] de um grupo metileno deixa um elétron desemparelhado no carbono (-[•]CH-). Esse radical formado é geralmente estabilizado por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. O destino mais provável desse radical é reagir com o O₂, formando um radical peroxila (ROO[•]). Os radicais peroxila, por sua vez, são capazes de subtrair um próton de outra molécula lipídica, sendo esta fase conhecida como a fase de propagação. O radical de carbono formado pode reagir com o O₂ para formar outro radical peroxila, e assim sucessivamente. A retirada de um hidrogênio de outro lipídio por parte do radical peroxila gerará um hidroperóxido lipídico (LOOH). O término da reação poderá ocorrer quando dois radicais produzidos nas etapas anteriores reagirem entre si, formando um produto estável (HALLIWEL, 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

1.4.3 Defesas Antioxidantes

Para evitar os efeitos danosos das espécies reativas, existem mecanismos eficientes para sua eliminação, como a produção endógena de enzimas antioxidantes e alguns antioxidantes não-enzimáticos. Embora diferindo na composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo e compreendem:

- * agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, entre outras;

- * proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo), ao se ligarem aos mesmos como as transferrinas;

- * proteínas que protegem biomoléculas de dano oxidativo por outros mecanismos;

- * agentes de baixo peso molecular que aprisionam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como glutathione, α -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina.

1.4.3.1 Defesas Antioxidantes Enzimáticas

- Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD catalisa a reação de dismutação de dois radicais superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio (Figura 1.4) e é chamada de defesa primária contra o estresse oxidativo, já que o radical superóxido é um forte iniciador de reações em cadeia (MARKS *et al.*, 1996). O peróxido de hidrogênio formado é menos reativo que o radical superóxido e é degradado posteriormente por outros sistemas, como a catalase e a glutathiona peroxidase (FRIDOVICH, 1975).

Existem três formas de SOD com diferentes grupos prostéticos em sua composição. A forma SOD cobre-zinco está presente principalmente no citosol em praticamente todas as células eucarióticas, a SOD manganês na matriz mitocondrial, enquanto a SOD ferro em plantas e bactérias (MC CORD e FRIDOVICH, 1969; FRIDOVICH, 1975).

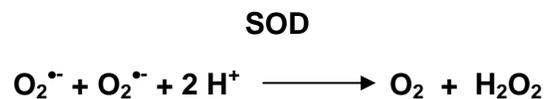


Figura 1.4. Dismutação do radical superóxido pela SOD.

- Catalase (CAT)

A CAT é uma hemeproteína que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio (Figura 1.5) (FERREIRA E MATSUBARA, 1997). Ela está localizada principalmente no peroxissoma e em menor quantidade no citosol e na fração mitocondrial da célula (MARKS *et al.*, 1996).



Figura 1.5. Decomposição do peróxido de hidrogênio pela CAT.

- Glutathiona Peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus álcoois correspondentes (Figura 1.6) (FERREIRA E MATSUBARA, 1997). O grupo sulfidríla da glutathiona reduzida (GSH) atua como doador de elétrons e é oxidado para a forma glutathiona oxidada (GSSG). Há dois tipos de glutathiona peroxidase: uma requer selênio cisteína (Prohaska

et al., 1977) como co-fator, podendo ser encontrada no citosol e na mitocôndria, e outra que é independente de selênio e localiza-se no citosol (MARKS *et al.*, 1996). A GPx atua acoplada à enzima glutationa redutase (GR), que catalisa a redução de GSSG. Esta redução requer NADPH como coenzima (Figura 1.7) (MARKS *et al.*, 1996).



Figura 1.6. Decomposição de peróxido de hidrogênio, ou outros lipoperóxidos, pela GPx (MARKS *et al.*, 1996).



Figura 1.7. Redução da GSSG pela GR (MARKS *et al.*, 1996).

1.4.3.2 Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas

- Glutationa reduzida

A glutaciona reduzida (GSH) é um tripeptídeo sintetizado a partir de L-glutamato, L-cisteína e glicina (SIES, 1999). A capacidade redutora da GSH é determinada pela presença do grupamento tiólico (-SH) da cisteína. Na maioria das células, a GSH é encontrada em elevadas concentrações (mM) no meio intracelular e atua como transportadora e reservatório de cisteína, além de participar da destoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e produtos de lipoperoxidação. A GSH também é requerida para a síntese de DNA, proteínas e algumas prostaglandinas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000) e tem papel na transdução de sinal, na expressão gênica e na apoptose (SIES, 1999).

Apesar de citar os demais antioxidantes não-enzimáticos, estes não serão detalhados, visto que não foram abordados neste estudo.

1.5 Estresse Oxidativo

Organismos saudáveis em condições normais produzem espécies reativas, que em sua maior parte são controladas pelos sistemas de defesa antioxidante. No entanto, em determinadas condições patológicas pode haver um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes, favorecendo a ocorrência do estresse oxidativo.

Assim, o termo “estresse oxidativo” é usado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis. Pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a combinação de quaisquer desses fatores (HALLIWELL, 2006).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular:

* *Adaptação*: as células podem tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em *up-regulation* da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço oxidante/antioxidante. Apesar disso, nem sempre o estresse oxidativo precisa envolver defesas antioxidantes aumentadas.

* *Dano celular*: o estresse oxidativo pode danificar alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007b). A resposta à injúria pode ser reversível: a célula entra em um estado de homeostase alterado temporário ou prolongado que não leva à morte celular.

* *Morte celular*: pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose. Na morte celular por necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. Pode haver a liberação de antioxidantes, como a catalase e a glutathiona reduzida, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e proteínas do grupo HEME, agentes esses que podem afetar as células adjacentes, podendo até mesmo induzi-las a um estresse oxidativo. Já na apoptose, o mecanismo intrínseco de morte celular programada é ativado e

não há a liberação do conteúdo celular. A apoptose pode estar acelerada em certas doenças, como as desordens neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007a).

Além da indução de necrose e apoptose, o estresse oxidativo pode levar ao aumento da lipoperoxidação, cujos produtos malondialdeído e 4-hidroxinonenal, entre outros são altamente neurotóxicos, bem como ao dano oxidativo protéico, provocando a inibição da atividade de diversas enzimas antioxidantes, podendo provocar alteração da função celular e do DNA, ao causar alteração de bases púricas e pirimídicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007a).

1.6 Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas

Numerosas hipóteses têm sido propostas para explicar a fisiopatologia das doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson (ALEXI et al., 2000; MENDÉZ-ÁLVAREZ et al., 2001; BEHL et al., 2002; CHONG, et al., 2005; HALLIWELL, 2006), sem, entretanto, obter até o momento uma explicação completamente satisfatória para explicar o dano cerebral dessas doenças. No entanto, acredita-se que possíveis mecanismos envolvam deficiência no metabolismo energético, estresse oxidativo e neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (excitotoxicidade), ou, possivelmente, um somatório desses fatores (ROSE e HENNEBERRY, 1994).

O cérebro é altamente dependente de energia para o seu funcionamento normal e a mitocôndria é a estrutura intracelular responsável pela produção dessa energia. Para a produção eficiente de energia na forma de ATP, a mitocôndria possui uma alta demanda por oxigênio, já que utiliza uma grande quantidade de O₂ em uma massa de tecido relativamente pequena, o que o torna altamente susceptível à ação de espécies reativas. Outros fatores também contribuem para essa susceptibilidade como o alto conteúdo de ferro presente no cérebro, que pode favorecer a lipoperoxidação; o seu alto conteúdo lipídico, principalmente lipídios de cadeia lateral poliinsaturada que são extremamente susceptíveis à lipoperoxidação; e à sua modesta defesa antioxidante, sendo os níveis de catalase particularmente baixos em muitas

regiões cerebrais (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007a). Além disso, uma disfunção mitocondrial pode ocorrer por diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória com um conseqüente prejuízo no transporte de elétrons, o que leva a uma dispersão dos elétrons na forma de radicais livres potencialmente danosos à célula.

Numerosas evidências sugerem que os radicais livres e o estresse oxidativo possam estar envolvidos na patogênese do dano neurológico em várias doenças neurodegenerativas. Estudos demonstraram uma diminuição na atividade do complexo I da cadeia respiratória em cérebros *postmortem* de pacientes portadores de doença de Parkinson. Essa inibição do complexo I pode acarretar a geração de espécies reativas, tais como ânion superóxido, radicais hidroxila e peroxinitrito, as quais poderiam causar um prejuízo ainda maior na cadeia transportadora de elétrons. Dessa forma, é possível que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial formem um ciclo vicioso na doença de Parkinson (SCHAPIRA *et al.*, 1989, 1990 a, b; JANETSKY *et al.*, 1994; GU *et al.*, 1998).

Na doença de Alzheimer, a mais comum dentre as doenças neurodegenerativas, é possível que o estresse oxidativo tenha um papel chave na morte neuronal. Tem sido proposto que o peptídeo β -amilóide, o formador das chamadas placas senis, tenha a capacidade de gerar radicais livres espontaneamente. Estudos *in vivo* também evidenciaram um dano oxidativo em cérebros humanos *postmortem* com doença de Alzheimer através da observação de aumento de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdGA), produtos de oxidação de outras bases e de RNA, carbonilas de proteínas, nitrotirosina e marcadores de peroxidação lipídica (SMITH *et al.*, 1991; MARKESBERY *et al.*, 1999; NOUROOZ-ZADEH *et al.*, 1999; LOVELL *et al.*, 2000).

Por outro lado, vários estudos têm evidenciado um dano oxidativo importante em pacientes portadores da doença de Huntington, particularmente representado pela formação de 3-nitrotirosina nas áreas afetadas (MARK *et al.*, 1999; ALEXI *et al.*, 2000). Entretanto, o dano oxidativo observado nessa doença aparentemente tem menor importância do que nas doenças de

Parkinson e Alzheimer. Recentemente foi verificado que vários metabólitos acumulados em alguns EIM produzem estresse oxidativo no cérebro de animais experimentais (KESSLER *et al.*, 2007; SCHUCK *et al.*, 2007; LEIPNITZ *et al.*, 2008; LATINI *et al.*, 2007; LEIPNITZ *et al.*, 2008; FEKSA *et al.*, 2008; ZUGNO *et al.*, 2008;) e em seres humanos (SITTA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007; DEON *et al.*, 2007; BARSCHAK *et al.*, 2008; BARSCHAK *et al.*, 2008; DEON *et al.*, 2008) indicando que compostos acumulados nestas doenças possam causar dano oxidativo.

Considerando a importância dos radicais livres e do estresse oxidativo como mecanismo fisiopatogênico de doenças neurodegenerativas, surgiram diversas drogas para a terapia de pacientes portadores dessas doenças baseadas em um mecanismo antioxidante, tais como seqüestradores de ânion superóxido, análogos da vitamina E, inibidores da peroxidação lipídica, inibidores da enzima óxido nítrico sintase, entre outras.

1.7 Efeitos de Corpos Cetônicos sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo

O efeito dos corpos cetônicos sobre o estresse oxidativo tem sido pouco estudado. Foi inicialmente verificado dano oxidativo em pacientes diabéticos através do aumento dos níveis de peróxido no plasma e este aumento foi associado à presença de angiopatia nestes pacientes (SATO *et al.*, 1979). Mais tarde, foi verificado um aumento da peroxidação lipídica em eritrócitos de diabéticos que foi correlacionado com os níveis aumentados de glicemia. Estudos recentes mostraram que estresse oxidativo também ocorre em fígado, coração, retina, cristalino, rins e células neurais de diabéticos, o que foi confirmado por estudos *in vitro* (SUSHIL *et al.*, 2006; MESA *et al.*, 2006). Outro estudo demonstrou que a utilização de antioxidantes em pacientes diabéticos com cetoacidose provocou uma diminuição significativa da peroxidação lipídica no plasma destes pacientes (LEE *et al.* 2002). Em outro estudo, foi observado que ocorre dano oxidativo em pacientes diabéticos com hipercetonemia, mas não em pacientes diabéticos com níveis normais de corpos cetônicos comparados a indivíduos normais (JAIN *et al.*, 2006). Estes estudos comprovam a ocorrência de estresse oxidativo em pacientes diabéticos e relacionam esse mecanismo a níveis elevados de corpos cetônicos, mas não

comprovam que a etiologia desse mecanismo tóxico se deva aos corpos cetônicos.

Por outro lado, foi verificado que o ácido acetoacético (AcAc) induz a geração de espécies ativas de oxigênio e depleção de glutatona reduzida em hepatócitos cultivados de ratos, efeito que foi abolido pelo uso dos antioxidantes N-acetilcisteína e vitamina E, sugerindo, portanto, que o estresse oxidativo estava associado à ativação da síntese de espécies reativas (ABDELMEGEED *et al.*, 2004). Também se observou que a suplementação *in vitro* de AcAc a células vermelhas provocou um aumento da peroxidação lipídica, oxidação da glutatona reduzida (GSH) com um aumento da oxidada (GSSG) nestas células (JAIN *et al.*, 2006), reforçando a hipótese de que o AcAc induz o dano oxidativo. Resultados similares *in vitro* e *in vivo* foram observados em monócitos e em células endoteliais de pacientes diabéticos, mas não mostraram efeito do BHB sobre os mesmos parâmetros (JAIN *et al.*, 1999; JAIN *et al.*, 2003).

Além disso, o AcAc mostrou ser capaz de induzir a geração de radical superóxido em um sistema tamponado livre de células que desapareceu na presença de superóxido dismutase, o que não foi observado com o BHB (JAIN *et al.*, 1999).

Outros achados, no entanto, mostraram resultados opostos. Assim, recentemente foi demonstrado que os ácidos acetoacético e β -hidroxiacético diminuem a produção de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias de neurônios expostas ao cálcio (MAALOUF *et al.*, 2007). Outros trabalhos, demonstraram que uma dieta cetogênica é neuroprotetora contra muitas doenças neurológicas agudas e crônicas (GILBERT *et al.*, 2000; KASHIWAYA *et al.*, 2000), e que o BHB e o AcAc protegem neurônios hipocâmpais expostos a PMP + *in vivo* e *in vitro* e reduz a lesão cerebral em roedores submetidos a inibição de glicólise ou a uma isquemia generalizada (SUZUKI *et al.*, 2001; SUZUKI *et al.*, 2002; MASSIEU *et al.*, 2003). Estes estudos indicam que os corpos cetônicos podem reduzir níveis de radicais livres no cérebro,

aumentando a possibilidade de que essas substâncias podem mediar neuroproteção através da atividade antioxidante.

Da mesma forma, outros estudos revelaram que os corpos cetônicos podem reduzir o dano oxidativo no tecido cardíaco (VEECH *et al.*, 2001).

Estes resultados contraditórios relativos ao papel dos corpos cetônicos na produção de espécies reativas por células neuronais e por células de órgãos periféricos indicam a necessidade de uma melhor investigação do papel destas substâncias sobre parâmetros de estresse oxidativo, especialmente no cérebro, tecido muito suscetível ao ataque de radicais livres e em que até agora não foi elucidado o papel dos corpos cetônicos sobre o dano oxidativo.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

O presente trabalho visa investigar os efeitos *in vitro* dos ácidos β -hidroxibutírico e acetoacético sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos, com o intuito de verificar se esses metabólitos que se acumulam principalmente nas deficiências de SCOT e T2, mas também durante as crises de descompensação metabólica (cetoacidose) em pacientes afetados por outros erros inatos do metabolismo, poderiam contribuir para o dano neurológico característico dessas doenças.

2.2 Específicos

1) Determinar o efeito *in vitro* dos ácidos β -hidroxibutírico e acetoacético na lipoperoxidação medida através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e quimiluminescência em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens;

2) Determinar os efeitos *in vitro* dos ácidos β -hidroxibutírico e acetoacético sobre a oxidação de proteínas, determinada através da formação de carbonilas e da medida de grupamentos sulfidríla em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos de 30 dias de vida.

3) Determinar o efeito *in vitro* dos ácidos β -hidroxibutírico e acetoacético sobre a oxidação da 2',7'- diclorofluoresceína em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.

4) Determinar o efeito *in vitro* dos ácidos β -hidroxibutírico e acetoacético sobre as defesas antioxidantes não enzimáticas: reatividade antioxidante total e glutatona reduzida em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens;

- 5) Determinar o efeito *in vitro* dos ácidos β -hidroxibutírico e acetoacético sobre as enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens;
- 6) Determinar o efeito *in vitro* dos ácidos β -hidroxibutírico e acetoacético sobre uma possível ação antioxidante utilizando os ácidos orgânicos 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMG) e 3-metilglutacônico (MGT) e também um sistema gerador de radicais hidroxila (reação de Fenton) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau de pureza pró-análise (PA).

Os ácidos acetoacético (AcAc) e o β -hidroxibutírico (BHB) foram sempre dissolvidos e diluídos em tampão contendo fosfato de sódio 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4, no dia da realização dos ensaios.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 30 dias de vida do Biotério do Departamento de Bioquímica do ICBS, UFRGS. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração comercial (Supra, POA, RS, Brasil) contendo 20,5% proteína (predominantemente de soja), 54% de carboidratos, 4% de lipídios, 4,5% de fibras, 7% cinzas e 10% de umidade. Eles foram mantidos em ciclo claro-escuro de \pm 12 horas a uma temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$.

3.3 Preparação de Homogeneizados de Córtex Cerebral

Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia. O cérebro foi rapidamente removido e colocado sobre placa de Petri em gelo para a dissecação do córtex cerebral. O córtex cerebral foi posteriormente pesado e homogeneizado em tampão fosfato de sódio 20 mM contendo cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4, na proporção de 1:10 (peso/volume) e o homogeneizado obtido foi levado à centrifugação a 650 g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi empregado para a medição dos diferentes parâmetros de estresse oxidativo. Finalmente, foram retiradas alíquotas para a realização de uma pré-incubação de 1 hora a 37 ° C na ausência dos metabólitos (grupo controle) ou presença dos mesmos (grupos teste) nas concentrações de 1, 10 e 25 mM para o ácido acetoacético e o ácido β -hidroxibutírico.

3.4 Parâmetros de Estresse Oxidativo

3.4.1 Avaliação da Peroxidação Lipídica

3.4.1.1 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)

A medida de níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foi realizada de acordo com o método de Esterbauer e Cheeseman (1990). 300 µL de ácido tricloroacético 10 % foram adicionados à alíquota retirada da incubação previamente realizada. Após centrifugação, 300 µL do sobrenadante foram tratados com ácido tiobarbitúrico 0,67 % na proporção de 1:1. A mistura foi levada a um banho fervente durante 25 min e, após, resfriada em água a temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1, 1, 3, 3 – tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram calculados como nmol TBA-RS / mg de proteína e expressos como porcentagem do controle.

Em alguns experimentos, com o objetivo de avaliar uma possível atividade antioxidante do AcAc e do BHB em condições com estímulo de produção de espécies ativas, foi utilizado um sistema gerador de radicais hidroxila (reação de Fenton) para induzir peroxidação lipídica em sobrenadantes de córtex cerebral. O meio de reação com formação de radicais hidroxila consistiu de FeCl₃ 20 µM, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 500 µM e ácido ascórbico 100 µM em tampão fosfato de sódio 20 mM contendo cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4. Além disso, também foram utilizados os ácidos orgânicos 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMG) e 3-metilglutacônico (MGT), metabólitos acumulados na acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica que induzem lipoperoxidação, com o mesmo objetivo, para testar o BHB.

3.4.1.2 Quimiluminescência

A medida da quimiluminescência foi realizada através do método de González-Flecha *et al.* (1991). Aos tubos foram adicionados 3,5 mL de tampão contendo fosfato de sódio 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4, e a

luminescência basal foi medida em contador de cintilação líquida durante 5 min. Após essa leitura, uma alíquota de 500 μL das amostras incubadas foi imediatamente adicionada e a quimiluminescência foi medida durante 30 min a temperatura ambiente. Todo o procedimento foi realizado em sala escura e à temperatura ambiente. Os tubos utilizados para esta técnica foram lavados separadamente de outros materiais do laboratório com solução detergente, exaustivamente enxaguados com água destilada, fervidos por 10 minutos e mantidos no escuro 12 horas antes do experimento. O valor total foi diminuído do valor basal e os resultados foram calculados como cpm / mg proteína e expressos como percentagem do controle.

3.4.2 Medida da Oxidação de Proteínas

3.4.2.1 Medida de Grupamentos Sulfidrila

A medida de grupos sulfidrilas, em homogeneizado de córtex cerebral, foi feita utilizando um ensaio baseado na redução de tiois a partir do ácido 5,5'-ácido ditio bis nitrobenzóico (DTNB), gerando um produto final amarelo medido espectrofotometricamente a 412nm (KOWALTOWSKI *et al.*, 1997).

Uma alíquota de 160 μL do sobrenadante foi incubada a 37°C por 30 minutos com AcAc ou BHB. Após a incubação, 1 mL de DTNB 0,1 mM preparado em solução fosfato de potássio 0,2 M, pH 8,0, foi adicionado, e os tubos foram mantidos no escuro a temperatura ambiente por 30 minutos. A absorvância foi medida a 412 nm, o resultado foi calculado como nmol/mg de proteína e expressos como percentagem do controle.

3.4.2.2 Formação de Carbonilas

A formação de carbonilas, um marcador de oxidação a proteínas, foi medida em espectrofotômetro de acordo com REZNICK & PACKER (1994). Uma alíquota de 100 μL da incubação foi tratada com 400 μL de 10 mM 2,4-(DNFH) dissolvida em 2,5 N HCL e para o branco 2,5 N HCl, e colocada no escuro por uma hora. A amostra foi precipitada com 500 μL de TCA 20% e centrifugada por 5 minutos a 10.000 x g. O sedimento foi lavado com etanol: acetato de etila (1:1, V/V) e dissolvido em 550 μL de guanidina 6 M preparada

em HCl, e incubado a 37°C. A diferença entre as amostras tratadas com DNFH e tratadas com HCL (branco) foi usada para determinar o conteúdo de carbonilas a 365 nm. O conteúdo de carbonilas foi calculado em nmol/mg de proteína, e os resultados expressos em percentual do controle.

3.4.3 Oxidação do Diacetato de 2', 7'-Diclorofluoresceína (DCFH-DA)

A produção de espécies reativas foi determinada de acordo com o método de LeBel *et al.* (1992) utilizando o diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). Às alíquotas provenientes da pré-incubação, adicionou-se a forma diacetato do DCF que é permeável à membrana celular, e essas alíquotas foram então incubadas durante 30 min a 37 °C. No meio intracelular, esterasas clivam o grupamento acetato do DCFH-DA, gerando a forma reduzida DCFH. As espécies reativas presentes no meio oxidam o DCFH, produzindo o produto fluorescente DCF. A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de 480 e 535 nm, respectivamente. A curva de calibração foi realizada com DCF padrão (0-10 µM) e a concentração das espécies reativas foi calculada em nmol de DCF formado / mg proteína e expressa em percentagem do controle.

3.4.4 Avaliação das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas

3.4.4.1 Medida das Concentrações de Glutathiona Reduzida (GSH)

As concentrações de glutathiona reduzida (GSH) foram medidas de acordo com a técnica de Browne e Armstrong (1998). As alíquotas provenientes da pré-incubação foram tratadas com ácido metafosfórico com o objetivo de precipitar as proteínas e proporcionar um meio com pH ácido para a glutathiona ser mantida na forma reduzida. Após centrifugação, foram adicionados 50 µL de o-ftaldialdeído a 100 µL do sobrenadante obtido. A fluorescência gerada foi medida com comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. A curva de calibração foi realizada com GSH padrão (0,01-1 mM), a concentração calculada em nmol GSH / mg proteína e expressa como percentagem do controle.

Em outro experimento, com o objetivo de avaliar uma possível ação pró-oxidante do AcAc e do BHB, estas substâncias foram incubadas na presença de uma solução comercial de GSH (200 μ M) em um meio de incubação contendo tampão fosfato de sódio 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4. N-etilmaleimida (NEM; 150 μ M), um oxidante clássico de grupamentos tióis, foi utilizado como controle positivo. Após 60 minutos, foi adicionado o-ftaldialdeído 7,4 mM e a mistura incubada durante 15 min a temperatura ambiente. A fluorescência gerada foi medida com comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos como unidades de fluorescência e expressos como percentagem do controle.

3.4.4.2 Reatividade Antioxidante Total (TAR)

A medida da reatividade antioxidante total (TAR) representa a qualidade dos antioxidantes de um determinado tecido ou órgão. A TAR foi determinada através da medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida pelo 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP) à temperatura ambiente (LISSI *et al.*, 1995). Para a preparação das soluções de uso (ABAP 10 mM, luminol 4 mM e Trolox 80 μ M) foi utilizado tampão glicina 0,1 M, pH 8,6. A solução de ABAP foi utilizada como formadora de radicais livres, a de luminol como amplificadora do sinal de quimiluminescência e a de Trolox (vitamina E hidrossolúvel) como padrão antioxidante. Inicialmente, a quimiluminescência basal foi medida em cintilador através da adição de 4 mL de ABAP 2,0 mM em um tubo no escuro. 10 μ L de luminol foram então adicionados ao tubo e a quimiluminescência foi medida. Este foi considerado o valor inicial. A seguir, adicionou-se 10 μ L de Trolox 10-100 μ M (curva de calibração) ou a amostra, e a quimiluminescência foi medida durante 60 seg. O Trolox ou a amostra reduz a quimiluminescência inicial e essa rápida redução na intensidade gerada pelo luminol é considerada uma medida da TAR. A medida da TAR foi calculada como nmol de Trolox / mg de proteína e expressa como percentagem do controle.

3.4.5 Medida das Atividades das Enzimas Antioxidantes

3.4.5.1 Glutationa Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada pelo método de WENDEL (1981) usando hidroperóxido de tert-butila como substrato. Em cubeta de quartzo foram adicionados os seguintes reagentes: 600 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, 10 μL de azida sódica 40 mM, 15 μL de glutatona 100 mM, 15 μL glutatona redutase 10 U / ml, 10 μL NADPH 10 mM e 10 μL de amostra (0,1 – 0,3 μg de proteína). Esta mistura foi incubada a 25 °C durante 1 minuto, a fim de estabilizar o meio e após foram adicionados 50 μL de hidroperóxido de tert-butila 10 mM para iniciar a reação. Os brancos foram preparados substituindo a amostra por tampão fosfato. A queda da absorvância a 340 nm foi lida durante 240 segundos e a atividade da GPx foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção do NADPH a 340 nm de 6,2 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. A atividade da GPx foi calculada como U / mg de proteína (1U = 1 μmol NADPH consumido / min).

3.4.5.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida mediante a utilização do Kit Randox. O método baseia-se na formação do vermelho de formazan através da reação do ânion superóxido (produzido no meio a partir de um sistema xantina-xantina oxidase) e do cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio gerando um complexo rosa que é lido a 505 nm. A inibição de formação do cromôgeno foi proporcional à atividade da SOD. Os resultados da atividade da SOD foram expressos em U/mg de proteína.

3.4.5.3 Catalase (CAT)

Foi determinada a atividade desta enzima através do método de AEBI (1984). Em 100 μL do sobrenadante foram adicionados 10 μl de Triton 0,1 % seguido de agitação, esta mistura foi conservada em banho de gelo durante 15 minutos. Em 50 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM pH=7,0 foram adicionados 100 μl de H_2O_2 30% (v/v). Foram pipetados 600 μl deste meio em cubeta de quartzo, e o aparelho estabilizado contra um branco corrido separadamente de tampão fosfato. Após adição de 25 μl de amostra foi

realizada a leitura da queda da absorvância do H_2O_2 em espectrofotômetro a 240nm, em temperatura ambiente ($22^\circ\text{C} \pm 2$), durante 100 segundos. Para o cálculo da CAT se utilizou o coeficiente de extinção do H_2O_2 de $43.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados da atividade da CAT foram expressos em U / mg proteína (1U = $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumido / min).

3.4.6 Medida de Proteínas

O conteúdo protéico em todas as técnicas empregadas foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), usando albumina bovina sérica como padrão.

3.5 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e a média usada para os cálculos. A significância estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Duncan, quando o F foi significativo. O teste de regressão linear foi também utilizado para se verificar efeitos dose-resposta. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Toda a análise estatística foi feita através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) em um computador PC compatível.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.

A figura 4.1 mostra que o AcAc, mesmo na concentração de 25 mM, não alterou significativamente os níveis de TBA-RS [$F_{(3,12)} = 2,440$; $P = 0,115$] em preparações de homogeneizado de córtex de cérebro de ratos. O mesmo ocorreu para o BHB em concentrações de até 25 mM [$F_{(3,12)} = 1,043$; $P = 0,409$] (Figura 4.2).

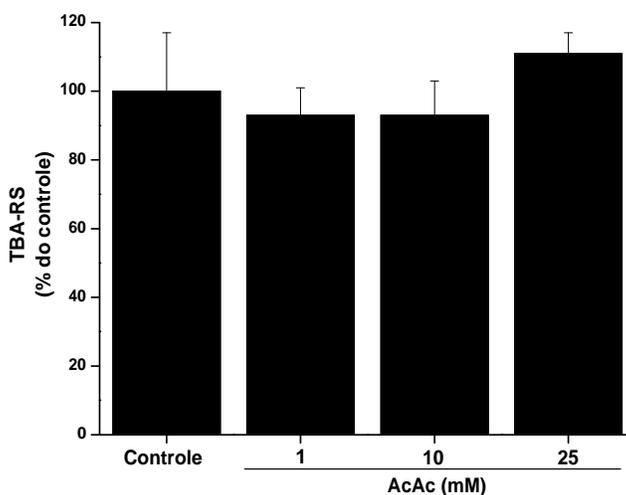


Figura 4.1– Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizados de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=4$) e foram expressos em percentual dos controles ($4,15 \pm 0,15$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

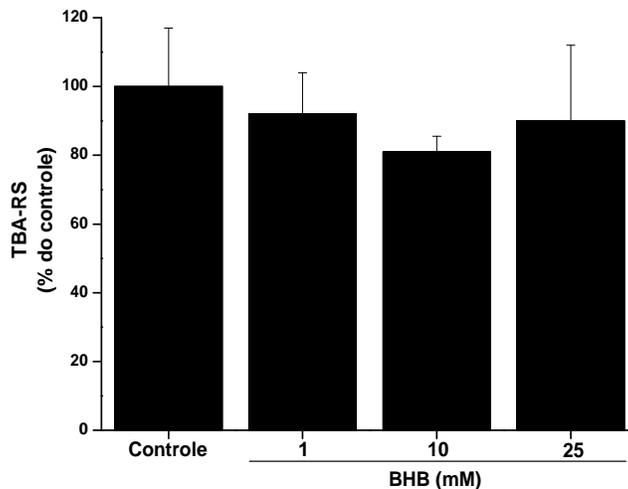


Figura 4.2– Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizados de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=5$) e foram expressos em percentual dos controles ($4,15 \pm 0,15$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

4.2 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre o aumento dos níveis de TBA-RS induzidos por um sistema gerador de radicais hidroxila em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.

O sistema utilizado para a geração de radicais hidroxila (reação de Fenton) consistiu de cloreto férrico (Fe^{3+}), ácido ascórbico (ASC) e peróxido de hidrogênio. Inicialmente, o íon Fe^{3+} (FeIII) é reduzido a íon Fe^{2+} (Fe II) pelo ASC. O íon Fe II, então, ao reagir com peróxido de hidrogênio, leva à formação do radical hidroxila. As figuras 4.3 e 4.4 mostram que o AcAc [$F_{(3,16)}=29,854$; $P<0,001$] e o BHB [$F_{(3,16)}=42,048$; $P<0,001$], na concentração de 25 mM, não alteraram, respectivamente, a medida do TBA-RS induzida pelos radicais hidroxila.

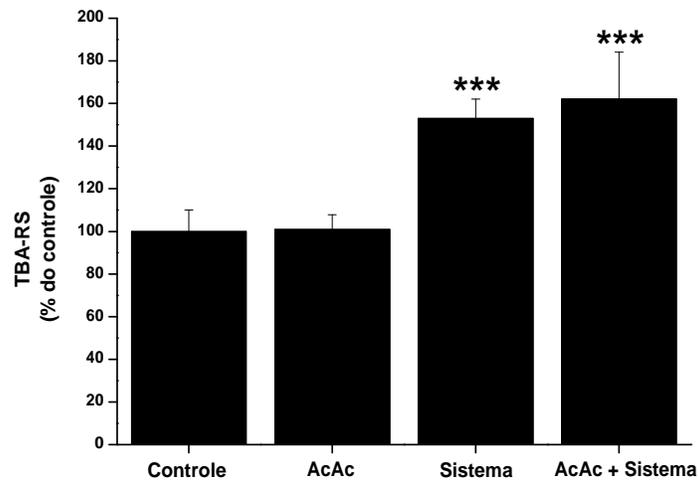


Figura 4.3– Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre os níveis de TBA-RS na presença de um sistema gerador de radicais hidroxila em homogeneizados de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e foram expressos em percentual dos controles ($3,74 \pm 0,40$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguindo-se do teste de Duncan (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, comparado ao controle).

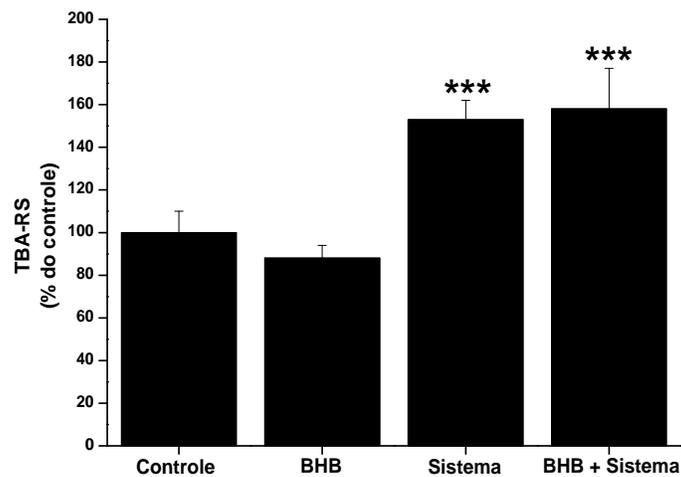
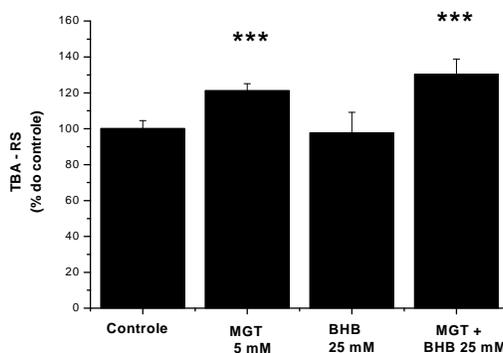


Figura 4.4– Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre os níveis de TBA-RS na presença de um sistema gerador de radicais hidroxila em homogeneizados de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e foram expressos em percentual dos controles ($3,74 \pm 0,40$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguindo-se do teste de Duncan (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, comparado ao controle).

4.3 Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença dos ácidos 3-metilglutacônico ou 3-hidroxi-3-metil-glutárico em córtex cerebral de ratos jovens.

Visto que dados prévios indicaram que o ácido β -hidroxibutírico (BHB) possui ação antioxidante, testamos a influência desse corpo cetônico sobre o aumento do TBA-RS induzido pelos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) ou 3-hidroxi-3-metil-glutárico (HMG) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. A figura 4.5 mostra que o BHB (25 mM) não foi capaz de prevenir a indução de peroxidação lipídica provocada, respectivamente, pelo MGT [F(3,12)=17,293; $P < 0,001$] (A) na concentração de 5 mM e HMG [F(3,12)=31,869; $P < 0,001$] (B) na concentração de 0,5 mM.

(A)



(B)

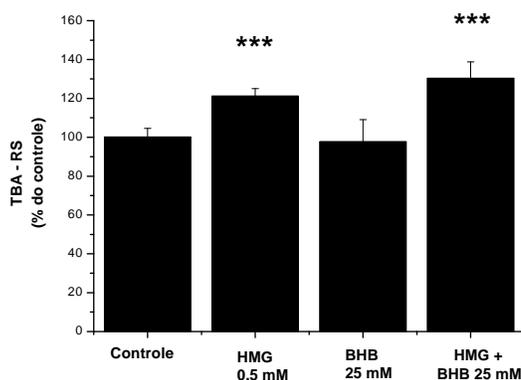


Figura 4.5– Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre o aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) (A) ou 3-hidroxi-3-metil-glutárico (HMG) (B) em córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4) e estão expressos como percentual do controle (3,36 nmol TBA-RS / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguindo-se do teste de Duncan (***) $P < 0,001$, comparado ao controle).

4.4 Efeito *in vitro* dos ácidos acetocético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura 4.6 mostra que o AcAc, em concentrações tão altas quanto 25 mM, não alterou significativamente a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos [$F_{(3,16)} = 0,183$; $P = 0,906$]. Também podemos observar na Figura 4.7 que o BHB, mesmo na concentração de 25 mM, não induziu um aumento significativo a quimiluminescência ($F_{(3,16)} = 0,360$; $P = 0,782$].

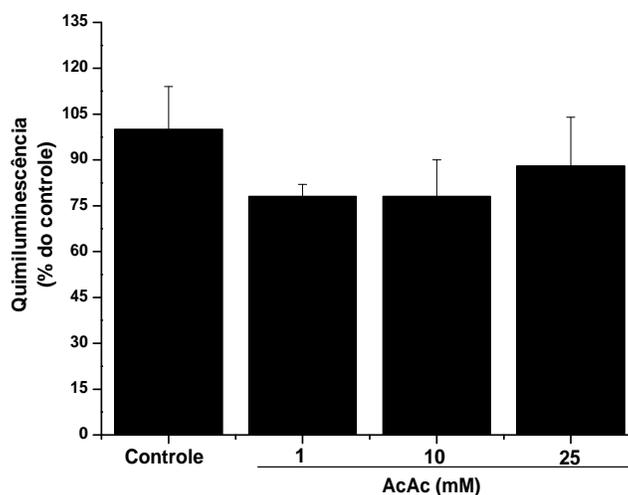


Figura 4.6– Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=5$) e foram expressos em percentual do controle (3632 ± 706 cpm/min). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

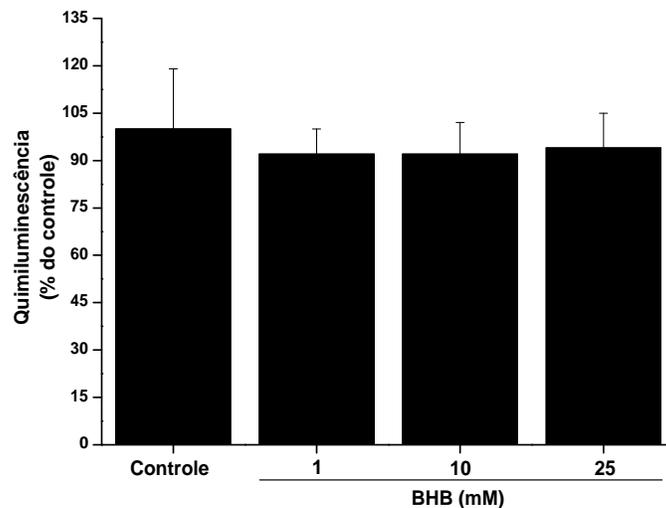


Figura 4.7– Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=5$) e foram expressos em percentual do controle (3632 ± 706 cpm/min). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

4.5 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre o dano oxidativo protéico em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Estudamos então o efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético e β -hidroxibutírico sobre a oxidação de proteínas, medida através da determinação do conteúdo dos grupamentos sulfidríla e carbonilas em homogeneizados de córtex de cérebro de ratos jovens.

4.5.1 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre o conteúdo de grupamentos sulfidríla em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura 4.8 mostra que o AcAc não alterou significativamente a medida de grupamentos sulfidríla em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [$F_{(3,12)} = 0,622$; $P = 0,614$], o mesmo ocorrendo para o BHB [$F_{(3,12)} = 0,777$; $P = 0,529$] (Figura 4.9).

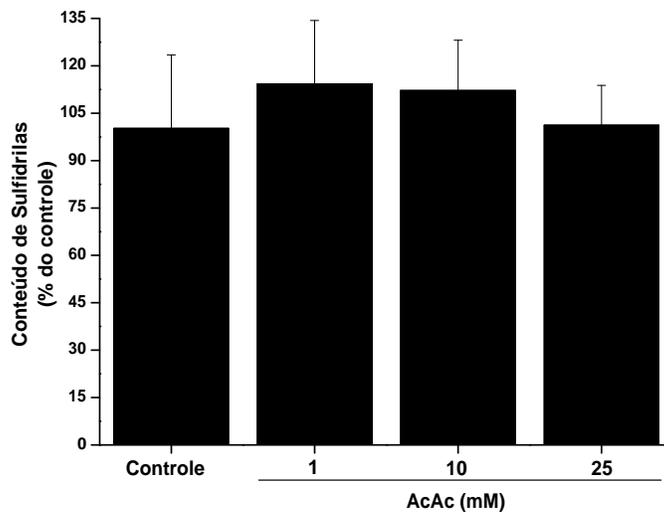


Figura 4.8– Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre a medida de grupos sulfidrilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=5$) e foram expressos em percentual do controle ($15,0261 \pm 9,47$ nmol de sulfidrilas/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

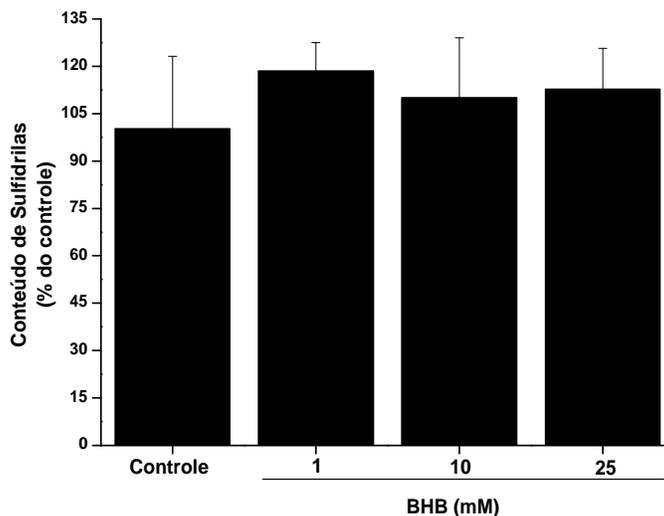


Figura 4.9– Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a medida de grupos sulfidrilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=4$) e foram expressos em percentual do controle ($15,0261 \pm 9,47$ nmol de sulfidrilas/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

4.5.2 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.

Na figura 4.10 demonstramos que o AcAc, nas concentrações 1, 5 e 10 mM, não aumentou significativamente a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex [$F_{(3,20)}=1,757$; $P= 0,188$]. Verificamos também que o BHB também não aumentou significativamente a formação de carbonilas nestas preparações [$F_{(3,15)}= 0,847$; $P= 0,489$] (Figura 4.11).

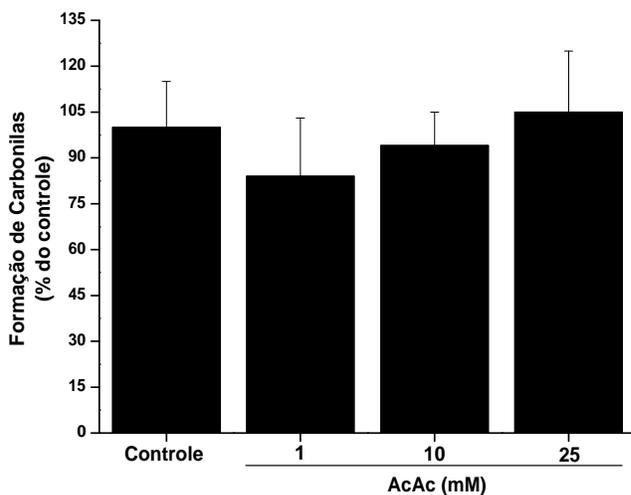


Figura 4.10– Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=6$) e os resultados expressos em percentual do controle ($0,74 \pm 0,11$ nmol de carbonila/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

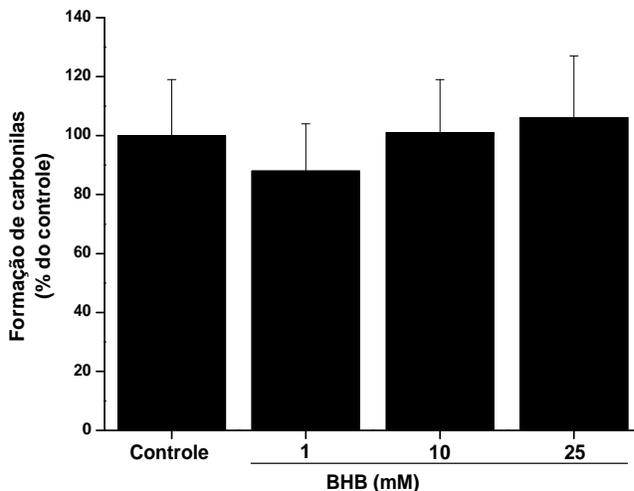


Figura 4.11– Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=7$) e foram expressos em percentual do controle ($0,86 \pm 0,17$ nmol de carbonila/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

4.6 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a oxidação da 2,7-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Verificamos que o AcAc [$F_{(3,16)} = 0,484$; $P = 0,698$] (Figura 4.12) e o BHB [$F_{(3,16)} = 0,620$; $P = 0,612$] (Figura 4.13) não alteraram significativamente a oxidação do DCFH-DA em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos.

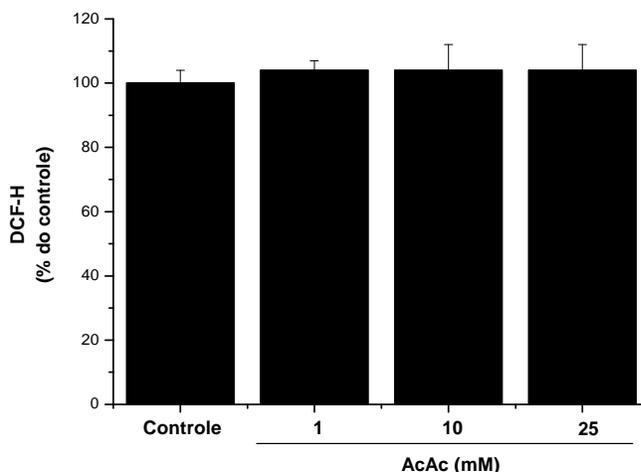


Figura 4.12– Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre a oxidação do DCFH-DA em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=5$) e estão expressos como percentual do controle (Controle: 600 ± 28 pmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

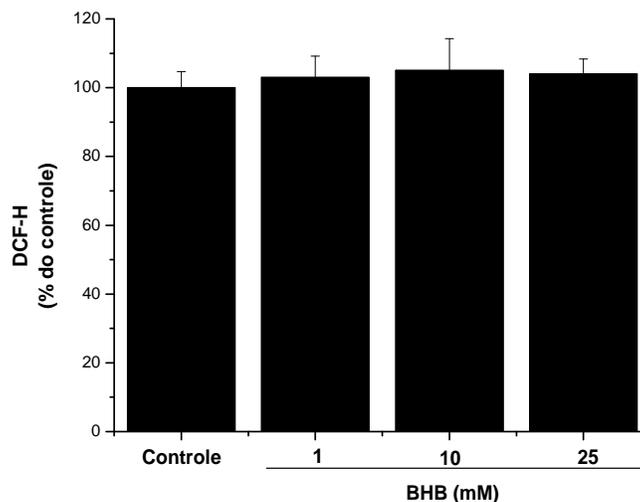


Figura 4.13– Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a oxidação do DCFH-DA em córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e estão expressos como percentual do controle (Controle: 600 ± 28 pmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.7 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre as defesas antioxidantes não enzimáticas em homogeneizado de córtex de ratos jovens.

O próximo passo de nossa investigação foi estudar o efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético e β -hidroxibutírico sobre as defesas antioxidantes não enzimáticas, medidas através da determinação da reatividade antioxidante total (TAR) e glutathiona reduzida (GSH), em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

4.7.1 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de córtex de ratos jovens.

Verificamos que o AcAc [$F_{(3,8)} = 0,304$; $P = 0,822$] (Figura 4.14) e o BHB [$F_{(3,8)} = 0,422$; $P = 0,743$] (Figura 4.15) não alteraram significativamente o TAR em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos.

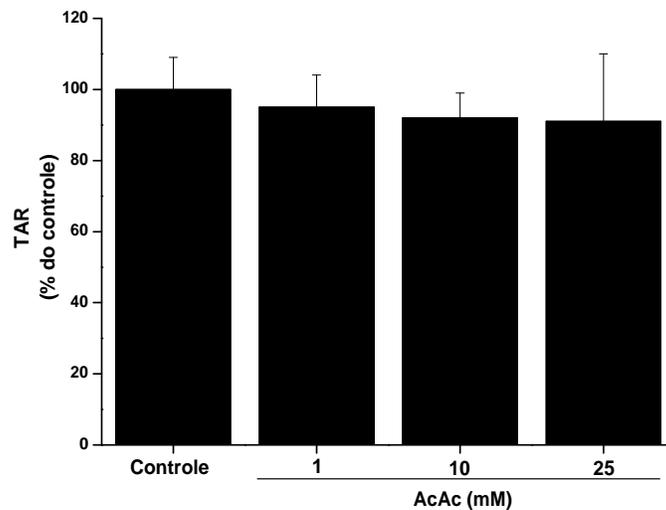


Figura 4.14– Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de córtex de cérebros de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=3$) e estão expressos em percentual do controle ($66,73 \pm 6,30$ nmol de Trolox / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

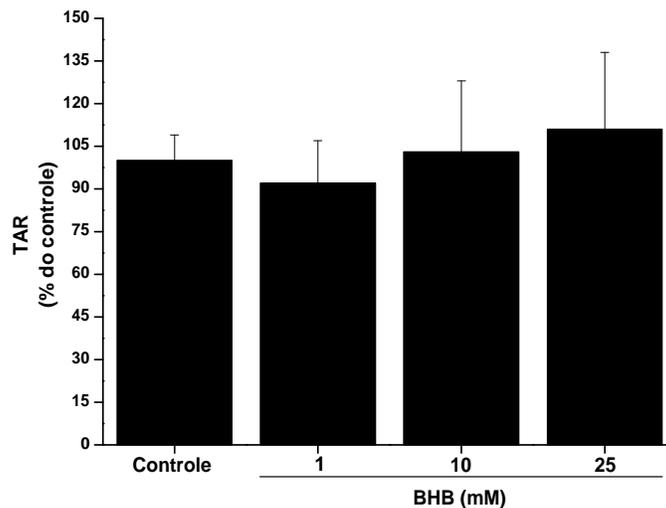


Figura 4.15– Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de córtex de cérebros de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=3$) e estão expressos em percentual do controle ($66,73 \pm 6,30$ nmol de Trolox / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

4.7.2 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

As figuras 4.16 e 4.17 demonstram que o AcAc [$F_{(3,12)}= 0,774$; $P= 0,530$] e o BHB [$F_{(3,12)}=2,069$; $P=0,158$] não alteraram significativamente as concentrações de GSH.

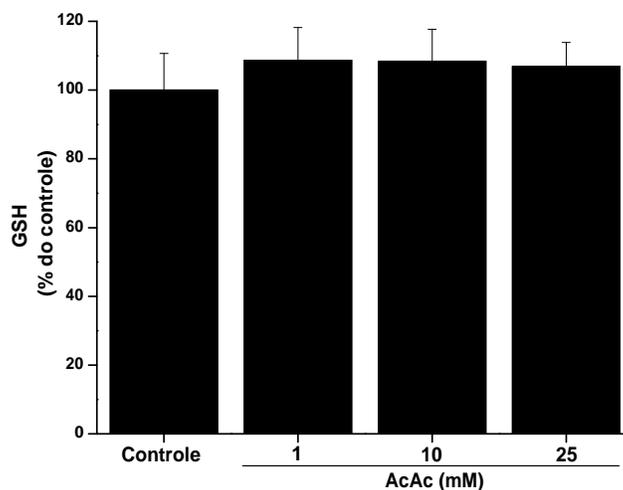


Figura 4.16– Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=4$) e foram expressos em percentual do controle ($8,78 \pm 0,94$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

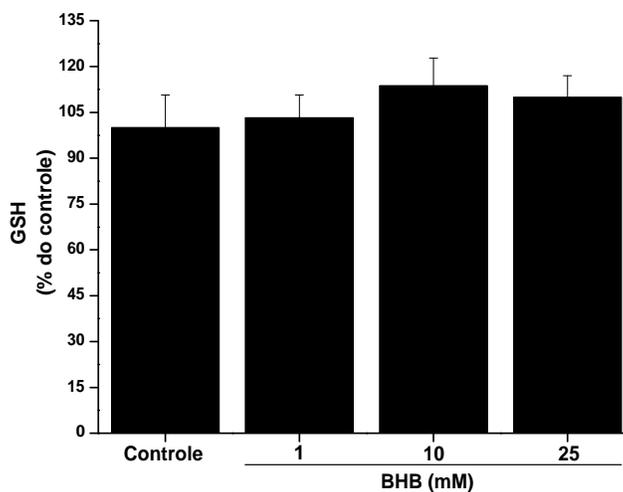


Figura 4.17– Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=4$) e foram expressos em percentual do controle ($8,78 \pm 0,94$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

4.8 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β-hidroxi-butírico (BHB) sobre a oxidação de uma solução comercial de glutathiona reduzida (GSH)

A figura 4.18 mostra que o AcAc e o BHB, na concentração de 25 mM, não alteraram significativamente a oxidação de uma preparação comercial purificada de 200 μM GSH [$F_{(3,4)}=16,123$; $P < 0,001$]. Podemos verificar também que o uso de N-etilmaleimida (NEM, 150 μM) (controle positivo) inibiu significativamente a concentração de GSH.

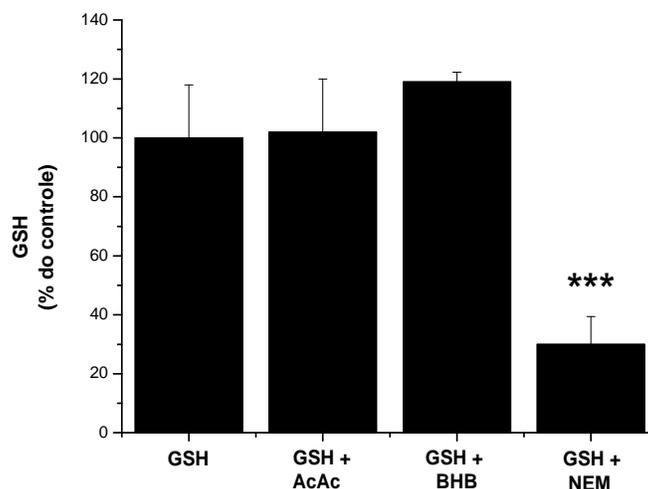


Figura 4.18– Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc, 25 mM) e β-hidroxi-butírico (BHB, 25 mM) sobre a oxidação de uma preparação purificada comercial de 200 μM glutathiona reduzida (GSH). N-etilmaleimida (NEM, 150 μM) representou o controle positivo. Os valores representam média ± desvio padrão (n=2) e foram expressos em percentual do controle (2154,10 ± 18,02 unidades de fluorescência). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguindo-se do teste de Duncan (***) $P < 0,001$, comparado ao controle).

4.9 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β-hidroxi-butírico (BHB) sobre a atividade das principais enzimas antioxidantes em homogeneizado de córtex de cérebros de ratos jovens.

Estudamos também o efeito dos ácidos acetoacético e β-hidroxi-butírico sobre as defesas antioxidantes enzimáticas glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em homogeneizado de córtex de cérebros de ratos jovens.

4.9.1 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) em homogeneizado de córtex de cérebros de ratos jovens.

Verificamos que o AcAc [$F_{(3,12)}=3,244$; $P=0,060$] (Figura 4.19) e o BHB [$F_{(3,12)}=0,098$; $P=0,960$] (Figura 4.20) não alteraram significativamente a atividade da glutatona peroxidase (GPx) em homogeneizado de córtex de cérebros de ratos jovens.

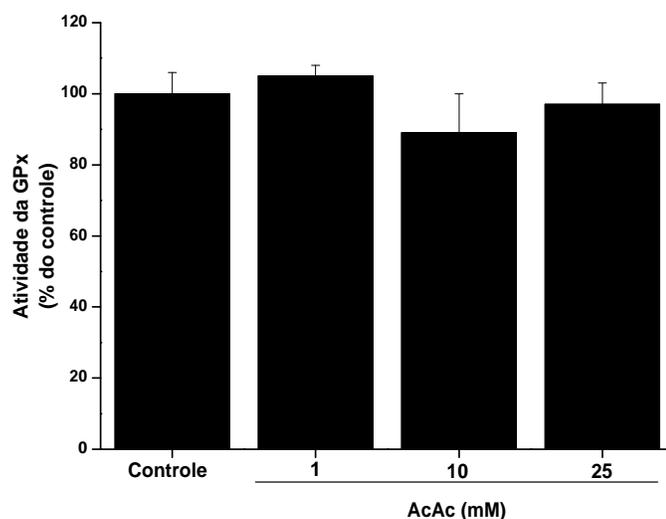


Figura 4.19– Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre a atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=4$) e foram expressos em percentual do controle ($17,238 \pm 1,0257$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

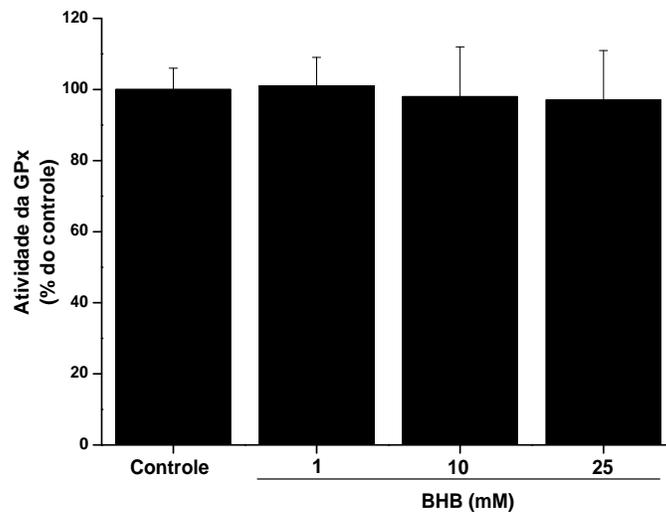


Figura 4.20– Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4) e foram expressos em percentual do controle ($15,0261 \pm 9,47$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

4.9.2 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os resultados demonstraram que o AcAc [$F_{(3,16)}=0,440$; $P=0,727$] (Figura 4.21), e o BHB [$F_{(3,16)}=0,462$; $P=0,713$] (Figura 4.22) não alteraram significativamente a atividade da SOD em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.

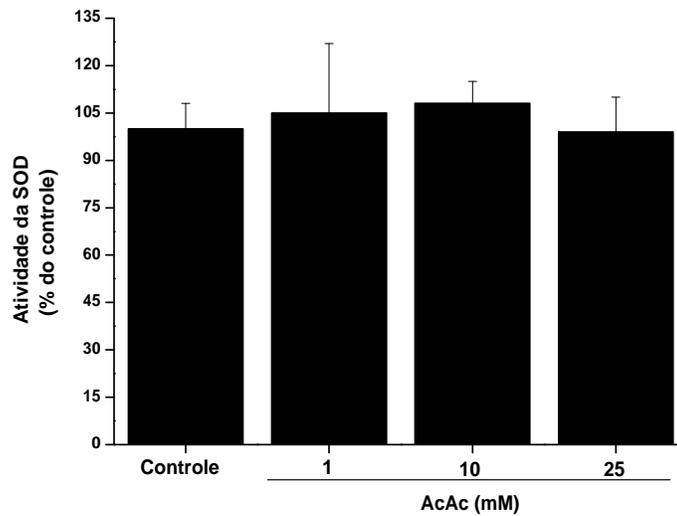


Figura 4.21– Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e foram expressos em percentual do controle ($3,404 \pm 0,1744$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

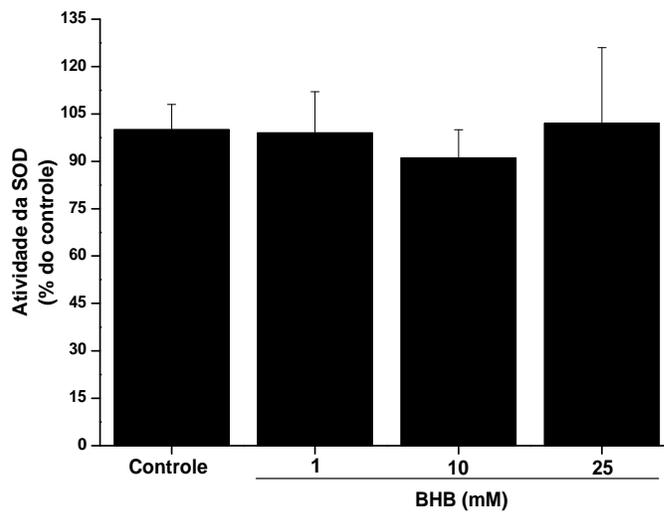


Figura 4.22– Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e foram expressos em percentual do controle ($3,404 \pm 0,1744$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

4.9.3 Efeito *in vitro* dos ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB) sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.

Os resultados demonstraram que o AcAc [$F_{(3,16)}=0,152$; $P=0,927$] (Figura 4.23) e o BHB [$F_{(3,16)}=0,576$; $P=0,639$] (Figura 4.24) não alteraram significativamente a atividade da CAT em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens.

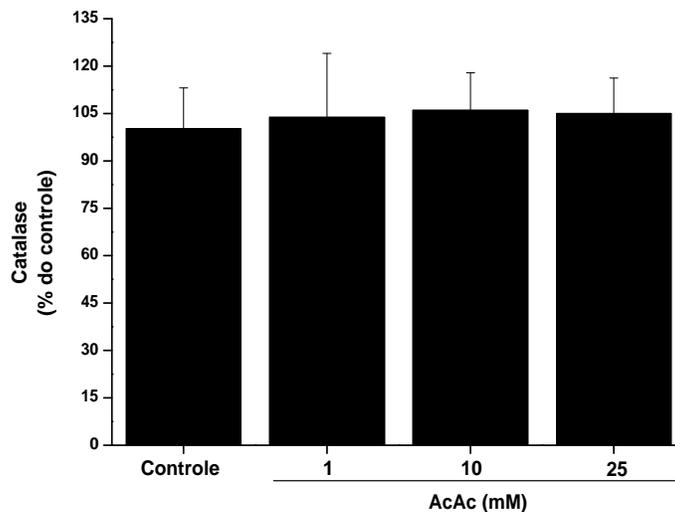


Figura 4.23– Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=5$) e foram expressos em percentual do controle ($1,944 \pm 0,2502$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

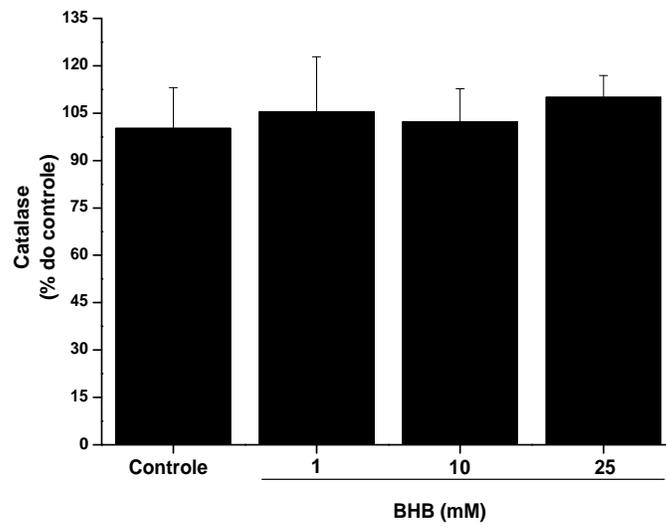


Figura 4.24– Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e foram expressos em percentual do controle (1,944 \pm 0,2502 mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

5. DISCUSSÃO

Os corpos cetônicos β -hidroxibutirato (BHB) e acetoacetato (AcAc), formados principalmente a partir de ácidos graxos, representam importantes fontes de energia durante o jejum, quando se encontram em concentrações teciduais elevadas especialmente para o cérebro, coração e rim (OWEN *et al.*, 1967). O aumento da cetonemia também ocorre caracteristicamente no diabetes mérito e nas doenças de cetólise deficiências de SCOT e T2. No que se refere ao diabetes mérito, o estresse oxidativo tem sido associado às complicações dessa doença (EVANS *et al.*, 2002). Neste particular, vários trabalhos demonstraram que os corpos cetônicos, especialmente o AcAc é capaz de induzir espécies ativas de oxigênio, provocar dano oxidativo lipídico e reduzir o conteúdo do antioxidante glutathiona reduzida em eritrócitos, células endoteliais e monócitos humanos, bem como em hepatócitos cultivados de roedores (JAIN *et al.*, 1998; JAIN E MCVIE, 1999; JAIN *et al.*, 1999, 2003; SUSHIL *et al.*, 2002; ABDELMEGEED *et al.*, 2004; JAIN *et al.*, 2006). Foi também verificado que a N-acetilcisteína, precursora da glutathiona, é capaz de reverter os níveis diminuídos de glutathiona reduzida e a peroxidação lipídica induzida pelo AcAc em hepatócitos cultivados de ratos (ABDELMEGEED *et al.*, 2004). Além disso, o AcAc induz a produção do radical superóxido em um meio sem a presença de material biológico (JAIN *et al.*, 1998). No entanto, não se sabe se o AcAc altera a expressão gênica ou atividades de enzimas antioxidantes, além de induzir espécies reativas ou possui outros efeitos sobre sinalização celular que possam levar a um desequilíbrio de atividades pró-oxidantes e antioxidantes resultando em estresse oxidativo. Também não se conhecem as razões pelas quais o AcAc, mas não o BHB aumenta as espécies reativas de oxigênio. No entanto, um mecanismo hipotético foi proposto para explicar a formação de espécies ativas de oxigênio pelo AcAc que envolveria a formação de um enol intermediário pela adição de $2H^+$ a dois grupos $C=O$ no acetato e sua autooxidação formando peróxido de oxigênio. O intermediário poderia sofrer a reação de Fenton em que Fe^{2+} e o peróxido de oxigênio se combinariam para formar Fe^{3+} e o radical hidroxila (JAIN *et al.*, 1990). O radical hidroxila é um

ácido fraco, podendo dissociar liberando o radical superóxido (CZAPSKI, 1984).

Por outro lado, outros estudos mostraram que os corpos cetônicos possuem ações neuroprotetoras, podendo diminuir a concentração de radicais livres no cérebro. Neste particular, foi verificado que uma dieta cetogênica é benéfica para tratamento de epilepsia intratável (FREEMAN *et al.*, 1998; VINING *et al.*, 1998). Além disso, foi demonstrado que o BHB previne a morte de neurônios hipocâmpais e mesencefálicos devido ao efeito de toxinas que aumentam a formação de radicais livres, bem como o dano cerebral em roedores submetidos à inibição da glicólise e à isquemia generalizada (KASHIWAYA *et al.*, 2000; SUZUKI *et al.*, 2001, 2002). Foi também recentemente demonstrado que os corpos cetônicos diminuem a produção mitocondrial de espécies ativas de oxigênio e a morte de neurônios neocorticais de ratos submetidos à excitotoxicidade por glutamato por aumentar a oxidação de NADH e a respiração mitocondrial (KOKOSZKA *et al.*, 2001; MAALOUF *et al.*, 2007). Assim, tais estudos e outros indicam que estas substâncias, especialmente o BHB, podem ter atividade neuroprotetora, provavelmente através da sua propriedade antioxidante (GILBERT *et al.*, 2000; KASHIWAYA *et al.*, 2000; SUZUKI *et al.*, 2001; SUZUKI *et al.*, 2002; MASSIEU *et al.*, 2003; MAALOUF *et al.*, 2007). Também foi verificado que os corpos cetônicos podem reduzir o estresse oxidativo no tecido cardíaco (VEECH *et al.*, 2001).

Tendo em vista os resultados prévios demonstrando efeitos pró-oxidantes do AcAc em tecidos periféricos e ações neuroprotetoras para o AcAc e BHB, com ênfase para o BHB, provavelmente devido ao seu possível poder antioxidante, a presente investigação avaliou os efeitos *in vitro* destes dois compostos endógenos sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens para esclarecer a sua influência sobre o potencial redox celular no cérebro em situações em que essas substâncias encontram-se em concentrações cerebrais elevadas. O intuito do presente trabalho foi, portanto, estudar possíveis ações pró-oxidantes (deletérias) ou antioxidantes (benéficas) para o SNC, em condições patológicas

caracterizadas por um aumento expressivo das concentrações teciduais do BHB e do AcAc (25 mM), como, por exemplo, em pacientes afetados por alguns erros inatos do metabolismo durante descompensação metabólica e também nas deficiências de SCOT e T2 que se caracterizam por lesões cerebrais.

Os parâmetros analisados foram o dano oxidativo lipídico (quimiluminescência e TBA-RS), dano oxidativo protéico (formação de carbonilas e oxidação de sulfidrilas), bem como as defesas antioxidantes não enzimáticas (GSH e TAR) e enzimáticas (GPx SOD e CAT) e a oxidação do DCFH-DA que refletem uma produção acelerada de espécies ativas.

Nenhum destes parâmetros foi alterado por concentrações tão altas quanto 25 mM do AcAc ou do BHB incubadas separadamente com os homogeneizados de córtex cerebral nas várias técnicas utilizadas para medir os parâmetros.

Testamos também na presença de córtex cerebral o efeito do AcAc e BHB em situações com aumento da geração do radical hidroxila através em um sistema que utiliza a reação de Fenton. Nenhum deles foi capaz de alterar a geração desse radical, indicando que mesmo em uma situação pró-oxidante, não detectamos qualquer efeito antioxidante nestes compostos.

Resultados anteriores de nosso grupo demonstraram ações pró-oxidantes do HMG e do MGT em córtex cerebral de ratos jovens. Investigamos então se o BHB poderia prevenir ou atenuar o aumento da peroxidação lipídica induzida por esses metabólitos. Uma vez mais, verificamos que o BHB não alterou o aumento de TBA-RS provocado pelos HMG e MGT, reforçando a idéia de que esse corpo cetônico não possui ação antioxidante nas condições utilizadas. Finalmente, considerando os vários estudos demonstrando uma ação pró-oxidante do AcAc na presença ou ausência tecidual, estudamos o efeito desses corpos cetônicos sobre a oxidação de GSH purificado comercialmente. Estes corpos cetônicos não foram capazes de alterar a

oxidação de GSH, indicando que não são pró-oxidante em nossas condições experimentais.

Concluindo, nossos resultados não apontam qualquer influência pró-oxidante ou antioxidante do AcAc e do BHB em córtex cerebral de ratos jovens em condições basais ou com alta produção de radicais livres. Em outras palavras, estas substâncias nas concentrações utilizadas não agem como antioxidantes ou pró-oxidantes em cérebro de ratos jovens.

No entanto, outros estudos revelaram propriedades neuroprotetoras para estas substâncias e especialmente para o BHB (GILBERT *et al.*, 2000; KASHIWAYA *et al.*, 2000; SUZUKI *et al.* 2001, 2002; MASSIEU *et al.*, 2003; MAALOUF *et al.*, 2007). Poder-se-ia, por conseguinte, sugerir que a neuroproteção nestas situações (isquemia *in vitro* e *in vivo*, epilepsia, inibição da glicólise, etc) pode ter ocorrido por meio de mecanismos indiretos, como, por exemplo, através do aumento da respiração celular e da produção de ATP nessas situações caracterizadas por déficit energético, não sendo, portanto, devida a atividades antioxidantes. Neste contexto, é bem conhecido que os corpos cetônicos são excelentes substratos para a produção de energia no cérebro (MORRIS, 2005).

Por outro lado, alguns estudos demonstraram que os corpos cetônicos e especialmente o AcAc podem atuar como agentes pró-oxidantes em tecidos periféricos como já foi amplamente demonstrado em monócitos, eritrócitos e células endoteliais de pacientes diabéticos com cetonemia elevada (JAIN *et al.*, 1998; JAIN *et al.*, 1999; JAIN e McVIE, 1999; LEE *et al.*, 2002; SQUIRES *et al.*, 2003; ABDELMEGEED *et al.*, 2004; DUARTE *et al.*, 2005; JAIN *et al.*, 2006). Assim, não podemos afastar uma ação pró-oxidante dos corpos cetônicos, especialmente do AcAc em tecidos periféricos. Não podemos, no entanto, até o presente momento estabelecer a relevância dos corpos cetônicos na indução de estresse oxidativo em diabéticos, pois a hiperglicemia é também capaz de provocar estresse oxidativo (JAIN *et al.*, 1989; RAJESWARI *et al.*, 1991; TESHAMARIAM e COHEN, 1992; NISHIKAWA *et al.*, 2000; NATARAJAN *et al.*, 2002).

Nossos resultados evidenciando que os corpos cetônicos não possuem ações pró-oxidantes no cérebro estão de acordo com o fato de que pacientes diabéticos com freqüentes e graves episódios cetóticos não apresentam, aparentemente, um comprometimento neurológico e psicomotor e seu desenvolvimento físico está dentro dos limites normais. Assim, se o AcAc e o BHB possuísem ações pró-oxidantes, dano oxidativo cerebral seria uma constante nos diabéticos, já que o cérebro é especialmente vulnerável a ataques de radicais livres (JAIN *et al.*, 1998; JAIN E MCVIE, 1999; JAIN *et al.*, 1999, 2003, 2006; ABDELMEGEED *et al.*, 2004).

Além disso, se nossos resultados *in vitro* pudessem ser transportados para a situação *in vivo* nas deficiências de SCOT e T2 caracterizadas por com quadro de cetose e cetonúria persistente ou intermitente, respectivamente, poderíamos sugerir que o comprometimento do desenvolvimento físico e função cerebral apresentada pelos pacientes afetados por esses distúrbios não se devem ao aumento tecidual dos corpos cetônicos (NIEZEN-KONING *et al.*, 1997).

Em conclusão, o presente trabalho, demonstrou que os corpos cetônicos, por si só, não induzem estresse oxidativo ou ações antioxidantes *in vitro* no cérebro de ratos jovens. Um grande número de parâmetros de estresse oxidativo foi avaliado, distintamente de outros estudos disponíveis na literatura, que basicamente testaram os efeitos dos corpos cetônicos sobre a peroxidação lipídica e os níveis de GSH. Presumimos que os efeitos da neuroproteção observados para os corpos cetônicos *in vivo* em várias situações patológicas e em cultura de células hipocâmpais são, pelo menos em parte, indiretos e provavelmente devidos ao suporte energético que eles provêm necessário para sobrevivência e atividade neuronal. Por outro lado, os resultados contraditórios descritos na literatura sobre a ação dos corpos cetônicos sobre o estresse oxidativo provavelmente se devem a diferenças metodológicas ou tecido-específicas como foi o caso do presente trabalho realizado com sistema nervoso central.

6. CONCLUSÕES

1) Os ácidos acetoacético (AcAc) e β -hidroxibutírico (BHB), em concentrações de até 25 mM, não afetaram *in vitro* a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), parâmetro de lipoperoxidação, em condições basais e quando ativadas por um sistema gerador de peróxido de hidrogênio e pelos ácidos 3-metilglutacônico e 3-hidroxi-3-metilglutárico em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos de 30 dias de vida.

2) Os ácidos AcAc e BHB, em concentrações de até 25 mM, não alteraram *in vitro* a quimiluminescência, parâmetro de lipoperoxidação, em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos de 30 dias de vida.

3) Os ácidos AcAc e BHB, em concentrações de até 25 mM, não alteraram a medida de grupamentos sulfidríla, parâmetro de oxidação de proteínas, em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos de 30 dias de vida.

4) Os ácidos AcAc e BHB, em concentrações de até 25 mM, não aumentaram significativamente a formação de carbonilas, parâmetro de oxidação de proteínas, em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos de 30 dias de vida.

5) Os ácidos AcAc e BHB, em concentrações de até 25 mM, não afetaram a oxidação da 2,7-diclorofluoresceína-diacetato, parâmetro de produção de espécies reativas, em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

6) Os ácidos AcAc e BHB, em concentrações de até 25 mM, não alteraram as defesas antioxidantes não enzimáticas medidas pela reatividade antioxidante total e pela glutatona reduzida em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos de 30 dias de vida.

7) Os ácidos AcAc e BHB, em concentrações de até 25 mM, não alteraram uma solução comercial purificada de glutathione reduzida.

8) Os ácidos AcAc e BHB, em concentrações de até 25 mM, não alteraram a atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos de 30 dias de vida.

7. PERSPECTIVAS

- Verificar o efeito da administração *in vivo* de corpos cetônicos sobre parâmetros de estresse oxidativo em tecidos de ratos;
- Relacionar as concentrações séricas e cerebrais dos corpos cetônicos com parâmetros de estresse oxidativo em modelos animais e em pacientes com EIM (estudos *in vivo*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABDELMEGEED, M.A., KIM, S.K., WOODCROFT, K., J., NOVAK, R.F. Acetoacetate activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Primary Culture Rat Hepacocytes: Role of Oxidative Stress. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.310, p.728-736, 2004.

AEBI, H. Catalase. in vitro, *Methods of Enzymology*, v. 105, p 121-126, 1984

ALEXI, T., BORLONGAN, C.V., FAULL, R.L., WILLIAMS, C.E., CLARK, R.G., GLUCKMAN, P.D., HUGHES, P.E. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Progress in Neurobiology*, v. 60, p. 409 - 470, 2000.

BARSHAK, A.G., MARCHESAN, C., SITTA, A., DEON, M., GIUGLIANI, R., WAJNER, M., VARGAS, C.R. Maple syrup urine disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles. *Clinical Biochemistry*, v. 41, p.317-24, 2008

BARSHAK, A.G., SITTA, A., DEON, M., BARDEN, A.T., DUTRA-FILHO, C.S., WAJNER, M., VARGAS, C.R. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metabolic Brain Disease*, v. 23, p.71-80, 2008.

BEHL, C. MOOSMANN, B. Antioxidant neuroprotection in alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 33, p. 182-191, 2002.

BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z., FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, v. 65, p.1865-1874, 1999.

BENNETT, M.J., WEINBERGER, M.J., KOBORI, J.A., RINALDO, P. BURLINA, A. B. Mitochondrial short-chain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: A new defect of fatty acid oxidation. *Pediatrics*, v. 39, p.185, 1996.

BIERMANN, J., GOOTJES, J., HUMBEL, B.M., DANSEN, T.B., WANDERS, R. J.A., VAN DEN BOSCH, H. Immunological analyses of alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase in human peroxisomal disorders. *European Journal of Cell Biology*, v. 78, p.339, 1999.

BJORKHEM, I., SISFONTES, L., BOSTROM, B., KASE, B. F., BLOMSTRAND, R. Simple diagnosis of the Zellweger syndrome by gs-liquid chromatography of dimethylacetals. *Journal of Lipid Research*, v. 27, p.786, 1986.

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to issues. *Medicina (Buenos Aires)*, v. 58, p.350-356, 1998.

BROWNE, R.W., ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods in Molecular Biology*, v.108, p. 347 - 352, 1998.

BURTON, BK. Inborn Errors of Metabolism: The clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics*, v. 79, p. 359, 1987.

CHOI, J.H., CHO, Y.M., SUH, K.S., YOON, H.R., KIM, G.H., KIM, S.S., KO, J.M., LEE, J.H., PARK, Y.S., YOO, H.W. Short-term efficacy of enzyme replacement therapy in korean patients with fabry disease. *Journal of Korean Medical Science*, v. 23, p. 243-50, 2008.

CHONG, Z.Z., LI, F., MAIESE, K. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology*, v. 75, p.207-246, 2005.

CLAYTON, P.T., ECKHARDT, S., WILSON, J., HALL, C.M., YOUSUF, Y., WANDERS, R.J. A., SCHUTGENS, R.B.H. Isolated dihydroxyacetonephosphate acyltransferase deficiency presenting with developmental delay. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v.17, p. 533, 1994.

CZAPSKI, G. Reaction of OH*, *Methods of Enzymology*, v. 105, p. 209-215, 1984.

DELANTY, N., DICHTER, M.A. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 98, p.145-53, 1998.

DEON, M., SITTA, A., BARSCHAK, A.G., COELHO, D.M., PIGATTO, M., SCHMITT, G.O., JARDIM, L.B., GIUGLIANI, R., WAJNER, M., VARGAS, C.R. Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 25, p. 441-444, 2007.

DEON, M., SITTA, A., BARSCHAK, A.G., COELHO, D.M., TERROSO, T., SCHMITT, G.O., WANDERLEY, H.Y., JARDIM, L.B., GIUGLIANI, R., WAJNER, M., VARGAS, C.R. Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 266 p.79-83, 2008.

DUARTE, A.I., SANTOS, M.S., OLIVEIRA, C.R., REGO, A.C. Insulin neuroprotection against oxidative stress in cortical neurons: involvement of uric acid and glutathione antioxidant defenses. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 39, p.876-889, 2005.

ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 407-421, 1990.

EVANS, J.L., GOLDFINE I.D., MADDUX B.A., GRODSKY G.M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, v. 23, p.599-622, 2002.

FEKSA, L.R., LATINI, A., RECH, V.C., FEKSA, P.B., KOCH, G.D., AMARAL, M.F., LEIPNITZ, G., DUTRA-FILHO, C.S., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M. Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats. *Metabolic Brain Disease*, v. 23, p. 221-233 2008.

FERREIRA, A.L., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, p. 61-68, 1997.

FREEMAN, J.M., VINING E.P.G., PILLAS, D.J., PYZIK P.L., CASEY J.C., KELLY M.T. The efficacy of the ketogenic diet: A perspective evaluation of intervention in 150 children. *Pediatrics*, v. 102, p. 1358-1363, 1998.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. *Annual Review of Biochemistry*, v.44, p. 147-157,1975.

FUKAO, T., SHINTAKU, H., KUSUBAE, R., ZHANG, G., NAKAMURA, K., KONDO, M., KONDO, N. Patients Homozygous for the T435N Mutation of Succinyl-CoA: 3-Ketoacid CoA Transferase (SCOT) do Not Show Permanent Ketosis. *Pediatric Research*, v. 56, p. 858-863, 2004.

GILBERT, D.L., PYZIK, P.L., FREEMAN, J.M. The ketogenic diet: seizure control correlates better with serum beta-hydroxybutyrate than with urine ketones. *Journal of Child Neurology*, v.15, p. 787-790, 2000.

GONZÁLEZ-FLECHA, B., LLESUY, S., BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 10, p. 93 - 100, 1991.

GRABOWSKI, G.A. Treatment perspectives for the lysosomal storage diseases. *Expert Opin Emerg Drugs*, v. 13(1), p.197-211, 2008.

GU, M., GASH, M.T., MANN, V.M. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Annals of Neurology*, v. 39, p. 385 - 389, 1998.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3.ed. *New York: Oxford University Press Inc.*, 2000.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. *Drugs and Aging*, v. 18, p. 685 - 716, 2001.

HALLIWELL, B., WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damages *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. v. 142, p. 231-255, 2004.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, v. 97, p.1634-58, 2006.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Measurement of reactive species*. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press. p. 268-340, 2007a.

HALLIWELL, B, GUTTERIDGE, J.M.C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence ad death. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press. p. 187-267, 2007b.

HUGHES, D.A., MLILLIGAN, A., MEHTA, A. Home therapy for lysosomal storage disorders. *British Journal of Nursing*, v. 16, p. 1384, 1386-9, 2007.

JAIN, S.K. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 264, p. 21340-21345, 1989.

JAIN, S.K., KRISHNASWAMY, K., LIM, G. Ketosis (acetoacetate) can generate oxygen radicals and cause increased lipid peroxidation and Growth inhibition in human endothelial cells. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 25, p. 1083-1088, 1998.

JAIN, S.K., ROSS J.D., LEVY G. The effect of malonyldialdehyde on viscosity of normal and sickle red blood cells. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, v. 44, p. 37-41, 1990.

JAIN, S.K., MCVIE, R., JACKSON, R., LEVINE, S.N., LIM, G. Effect of Hyperketonemia on Plasma Lipid Peroxidation Levels in Diabetic Patients. *Diabetes Care*, v. 22, p. 1171-1175, 1999.

JAIN, S.K., MCVIE, R. Hyperketonemia can increase lipid peroxidation and lower glutathione levels in human erythrocytes in vitro and in type 1 diabetic patients. *Diabetes*, v. 48, p. 555-1850, 1999.

JAIN, S.K., KANNAN, K., LIM, G., MATTHEW-GREE, J., MC VIE, R., BOCCHINI, J. A. Elevated blood interleukin-6 levels in hyperketonemic type 1 diabetic patients and secretion by acetoacetate-treated cultured U937 monocytes. *Diabetes Care*, v. 26, p. 2139-2143, 2003.

JAIN, S.K., MCVIE, R., BOCCHINI, J.R. J.A. Hyperketonemia (ketosis), oxidative stress and type 1 diabetes. *Pathophysiology*, v.13, p. 163-170, 2006.

JANETZKY, B., HAUCK, S., YODIM, M.B.H., RIEDERER, P., JELLINGER, K., PANTUCEK, F., ZOCHILING, R., BOISSL, K.W., REICHMANN, H. Unaltered aconitase activity but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, v. 169, p. 126 -128, 1994.

KASHIWAYA, Y., TAKESHIMA, T., MORI, N., NAKASHIMA, K., CLARKE, K., VEECH, R.L. D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, v. 97, p. 5440-5444, 2000.

KESSLER, A., BIASIBETTI, M., FEKSA, L.R., RECH, V.C., MELO, D.A., WAJNER, M., DUTRA-FILHO, C.S., WYSE, A.T., WANNMACHER, C.M. Effects of cysteamine on oxidative status in cerebral cortex of rats. *Metabolic Brain Disease*, v. 23, p. 81-93, 2008.

KOKOSZKA, J.E., COSKUN, P., ESPOSITO, L.A., WALLACE, D.C. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, v. 98, p. 2278-2283, 2001.

KOWALTOWSKI, A.J., VERCESI, A.E., CASTILHO, R.F. Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with N-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca²⁺: correlation with mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1318, p. 395-402, 1997.

LATINI, A., SCUSSIATO, K., LEIPNITZ, G., GIBSON, K.M., WAJNER, M. Evidence for oxidative stress in tissues derived from succinate semialdehyde dehydrogenase-deficient mice *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 30, p. 800-810, 2007.

LEBEL, C.P., ISCHIROPOULOS, H., BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemistry Research in Toxicology*, v. 5, p. 227 – 231, 1992.

LEE, D.M., HOFFMAN, W.H., CARL, G.F., KHICHI, M., CORNWELL, P.E. Lipid peroxidation and antioxidant vitamins prior to, during, and after correction of diabetic ketoacidosis. *Journal of Diabetes and Its Complications*, v. 16, p. 294-300, 2002.

LEIPNITZ, G., SEMINOTTI, B., AMARAL, A.U., BORTOLI, G., SOLANO, A., SCHUCK, P.F., WYSE, A.T., WANNMACHER, C.M., LATINI, A., WAJNER, M. Induction of oxidative stress by the metabolites accumulating in 3-methylglutaconic aciduria in cerebral cortex of young rats. *Life Science*, v. 82, p. 652-662, 2008.

LEIPNITZ, G., SEMINOTTI, B., HAUBRICH, J., DALCIN, M.B., DALCIN, K.B., SOLANO, A., BORTOLI, G., AMARAL, A., DUTRA-FILHO, C.S., LATINI, A., WAJNER, M. Evidence that 3-hydroxy-3-methylglutaric acid promotes lipid and protein oxidative damage and reduces the nonenzymatic antioxidant defenses in rat cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Research*, v. 86, p. 683-93, 2008.

LISSI, E., SALIM-HANNA, M., PASCUAL, C., DEL CASTILLO, M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 18, p. 153 -158, 1995.

LOVELL, M.A., XIE, C., MARKESBERY, W.R. Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Research*, v. 855, p. 116 - 123, 2000.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N. J., LEWIS-FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. v.193, p. 265 - 275, 1951.

MAALOUF, M., SULLIVAN, P.G., DAVIS, L., KIM, Y., RHO, J.M. Ketones Inhibit Mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience*. 145:256-264, 2007.

MASSIEU, L., HACES, M.L., MONTIEL, T., HERNANDEZ-FONSECA, K. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience*, v. 120, p. 365-378, 2003.

MARKESBERY, W.R., CARNEY, J.M. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathology*, v. 9, p. 133 - 146, 1999.

MARKS, D.B., MARKS, A.D., SMITH, C.M. Basic medical biochemistry: Williams & Wilkins, Baltimore, 336, 1996.

MAXWELL, S.R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, v. 49, p. 345-361, 1995.

MCCORD, J., FRIDOVICH, I. Superoxido dismutase: an enzymic function for eruthrocyuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MÉNDEZ-ÁLVAREZ, E., SOTO-OTERO, R., HERMIDA-AEIJEIRAS, A., LÓPEZ-REAL, A.M., Labandeira-García JL. Effects of aluminium and zinc on the oxidative stress caused by 6-hydroxydopamine autoxidation: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1586, p. 155-168, 2001.

MESA, J., SALCEDO, D., CALLE, DE L.A.H., DELGADO, E., NÓVOA, J., HAWKINS, F., NAVARRETE, G.S., PARRAMÓN, M., ACOSTA, D. Detection of ketonemia and its relationship with hyperglycemia in type 1 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 72, p. 292-297, 2006.

MIDDLETON, B., DAY, R., LOMBES, A., SAUDUBRAY, J.M. Infantile ketoacidosis associates with decreased activity of succinyl-CoA: 3ketoacid CoA-transferase. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 10, p. 273, 1987.

MITCHELL, G.A., FUKAO, T.J.C. Inborn Errors of Ketone Body Metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill p. 2340-2342, 2001.

MORRIS A.A.M. Cerebral ketones body metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 28, p. 109-121, 2005.

NATARAJAN, R., GERRITY, R.G., GU, J.L., LANTING, L., THOMAS, L., NADLER, J.L. Role of 12-lipoxygenase and oxidant stress in hyperglycaemia-induced acceleration of atherosclerosis in a diabetic pig model. *Diabetologia*, v. 45, p. 125-133. 2002.

NELSON, D., COX, M.M., Lehninger – *Principles of Biochemistry*, Hardcover, 2004.

NIEZEN-KONING, K.E., WANDERS, R.J.A., RUITER, J.P.N. IJLST, L., VISSER, G., REITSMA-BIERENS, W. C. C., HEYMANS, H. S. A., REIJNGOUD, D. J., SMIT, G. P. A. Succinyl-CoA:acetoacetate transferase deficiency: identification of a new patient with a neonatal onset and review of the literature. *European Journal of Pediatric*, v. 156, p. 870-873, 1997.

NISCHIKAWA, T., EDELSTEIN, D., DU, X.L., YAMAGISHI, S., MATSUMURA, T., KANEDA, Y., YOREK, M.A., BEEBE, D., OATES, P.J., HAMMES, H.P. GIARDINO, I., BROWNLEE, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature*, v. 404, p. 787-790, 2000.

NOUROOZ-ZADEH, J., LIU, E. H., YHLEN, B., ANGGARD, E. E., HALLIWELL, B. F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, v. 72, p. 734 - 740, 1999.

ORTIZ, A., OLIVEIRA, J.P., WANNER, C., BRENNER, B.M., WALDEK, S., WARNOCK, D.G. Recommendations and guidelines for the diagnosis and treatment of Fabry nephropathy in adults. *Nature Clinical Practice Nephrology*, v. 4, p. 327-36, 2008.

OWEN, O.E., MORGAN, A.P., KEMP, H.G., SULLIVAN, J.M., HERRERA, H.G., CAHILL, G.F. Brain metabolism during fasting. *Journal of Clinical Investigation*, v. 46, p. 1589-1596, 1967.

RIBEIRO, C.A., BALESTRO, F., GRANDO, V., WAJNER, M. Isovaleric acid reduces Na⁺, K⁺-ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 27, p. 529-40, 2007.

RAJESWARI, P., NATARAJAN, R., NADLER, J.L., KUMAR, D. Glucose induces lipid peroxidation and inactivation of membrane associated iron transport enzymes in human erythrocytes in vivo and in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, v. 149, p. 100-109, 1991.

REZNICK, A.Z., PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, v. 233, p. 357-363, 1994.

ROSA, R.B., SCHUCK, P.F., DE ASSIS, D.R., LATINI, A., DALCIN, K.B., RIBEIRO, C.A.J., FERREIRA, G. DA C. Inhibition of energy metabolism by –methyl-acetoacetate and –methyl—hydroxybutyrate in cerebral cortex of developing rats. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 28, p. 501-515, 2005.

ROSE, C.D.; HENNEBERRY, R.C. Etiology of the neurodegenerative disorders: a critical analysis. *Neurobiology of Aging*, v. 15, p. 233-234, 1994.

SAKAZAKI, H., HIRAYAMA, K., MURAKAMI, S., YONEZAWA, S., SHINTAKU, H., SAWADA, Y., FUKAO, T., et al: A new Japanese case of succinyl CoA: 3-ketoacid CoA-transferase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 18, p. 323, 1995.

SATO, Y., HOTTA, N., SAKAMOTO, N., MATOSUOKA, A., OHISHI, N., YAGI, K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochemical Medicine*, v. 21, p. 104-107, 1979.

SCHAPIRA, A.H., COOPER, J.M., DEXTER, D., JENNER, P., CLARK, J.B., MARSDEN, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*, v. 1, p. 1269 - 1276, 1989.

SCHAPIRA, A.H., COOPER, J.M., DEXTER, D., JENNER, P., CLARK, J.B., MARSDEN, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, v. 54, p. 823 - 827, 1990a.

SCHAPIRA, A.H.V., MANN, V.M., COOPER, J.M., DEXTER, D., DANIEL, S.E., JENNER, P., CLARK, J.B., MARSDEN, C.D. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ10 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, v. 55, p. 2142 - 2145, 1990b.

SCHUCK, P.F., CEOLATO, P.C., FERREIRA, G.C., TONIN, A., LEIPNITZ, G., DUTRA-FILHO, C.S., LATINI, A., WAJNER, M. Oxidative stress induction by cis-4-decenoic acid: relevance for MCAD deficiency. *Free Radical Research*, v. 41, p. 1261-72, 2007.

SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SKY, W.S. (Eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease* 8 ed. New York: McGraw-Hill, p. 2327-2348, 2001.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 27, p. 916-921, 1999.

SIMON, G., ERDOS, M., MARÓDI, L., TÓTH, J. Gaucher disease: The importance of early diagnosis and therapy. *Orvosi hetilap*, v. 149(16), p. 743-50, 2008.

SINCLAIR, L.A. A new look at the inborn errors of metabolism. *Annals of Clinical Biochemistry*, v. 19, p. 314-321, 1982.

SITTA, A., BARSCHAK, A.G., DEON, M., TERROSO, T., PIRES, R., GIUGLIANI, R., DUTRA-FILHO, C.S., WAJNER, M., VARGAS, C.R. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metabolic Brain Disease*, v. 21, p. 287-96, 2006.

SMITH, C.D., CARNEY, J.M., STARKE-REED, P.E., OLIVER, C.N., STADTAN, E.R., FLOYD, R.A., MARKESBERY, W.R. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, p. 1540 - 10543, 1991.

SOUTHORN, P.A., POWIS, G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clinic Proceedings*, v.63, p. 381-389, 1988.

SQUIRES, J.E., SUN, J., CAFFREY J.L., YOSHISHIGE D., MALLET R.T. Acetoacetate augments β -adrenergic inotropism of stunned myocardium by an antioxidant mechanism. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, v. 284, p. H1340-H1347, 2003.

SUSHIL, K.J., MCVIE, R., BOCCHINI, J.A., Hyperketonemia (ketosis), oxidative stress and type 1 diabetes. *Pathophysiology*, v. 13, p. 163-170, 2006.

SUSHIL, K.J., KANNAN, K., LIM, G., MCVIE, R., BOCCHINI, J.A., Hyperketonemia Increase Tumor Necrosis Factor α Secretion in Culture U937 Monocytes and Type 1 Diabetic Patients and Is Apparently Mediated by Oxidative Stress and cAMP Deficiency. *Diabetes*, v. 51, p. 2287-2293, 2002.

SUZUKI, M., KITAMURA, Y., MORI, S., SATO, K., DOHI, S., SATO, T., MATSUURA, A., HAIRAIDE, A. Beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 89, p. 36-43, 2002.

SUZUKI, M., SATO, K., DOHI, S., SATO, T., MATSUURA, A., HAIRAIDE, A. Effect of beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 87, p. 143-150, 2001.

TESFAMARIAM, B., COHEN, R.A. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Journal of Physiology*, v. 262, p. H321-H326, 1992.

TILDON, J.T., CORNBLATH, M., Succinyl CoA: 3 ketoacid CoA-transferase deficiency: A cause for ketoacidosis in infancy. *Journal of Clinical Investigation*, v. 51, p. 493, 1972.

VEDDER, A.C., BREUNIG, F., DONKER-KOOPMAN, W.E., MILLS, K., YOUNG, E., WINCHESTER, B., TEN BERGE, I.J., GROENER, J.E., AERTS, J.M., WANNER, C., HOLLAK, C.E. Treatment of Fabry disease with different dosing regimens of agalsidase: Effects on antibody formation and GL-3. *Molecular Genetics and Metabolism*, v.9, p. 319-325, 2008.

VEECH, R.L., CHANCE, B., KASHIWAYA, Y., LARDY H.A., CAHILL, G.F.F.Jr. Ketones bodies, potential therapeutic uses. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, v. 51, p. 241-247, 2001.

VINNING, E.P.G., FREEMAN, J.M., BALLABAN-GIL, K., CAMFIELD, C.S., CAMFIELD, P.R., HOLMES, G.L., SHINNAR, S., SHUMAN, R., TREVATHAN, E., WHELLESS, J.W.A multicenter study of the efficacy of the ketogenic diet. *Archives of Neurology*, v. 55, p. 1433-1437, 1998.

WANDERS, R.J.A., PURVIS, Y.R., HEYMANS, H.S., BAKKEREN, J.A., PARMENTIER, G.G. VAN ELDERE, J., EYSEN, H. Age-related differences in plasmalogen content of erythrocytes from patients with the cerebro-hepato-renal (Zellwenger) syndrome: Implications for postnatal detection of the disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 9, p. 335, 1986.

WARD, R.J.; PETERS, T.J. Free Radicals. In: MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K. (Eds). *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. New York: Churchill Livingstone, p. 765-777, 1995.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. *Methods of Enzymology*, v. 77, p. 325 - 332, 1981.

ZUGNO, A.I., STEFANELLO, F.M., SCHERER, E.B., MATTOS, C., PEDERZOLLI, C.D., ANDRADE, V.M., WANNMACHER, C.M., WAJNER, M., DUTRA-FILHO, C.S., WYSE, A.T. Guanidinoacetate Decreases Antioxidant Defenses and Total Protein Sulfhydryl Content in Striatum of Rats. *Neurochemical Research*, 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)