

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR EM FARMÁCIA**

**EFEITO DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS ACUMULADOS NA  
DOENÇA DO XAROPE DO BORDO SOBRE PARÂMETROS  
RESPIRATÓRIOS EM PREPARAÇÕES MITOCONDRIAS DE  
CÉREBRO DE RATOS JOVENS**

**ALEXANDRE UMPIERREZ AMARAL**

**Porto Alegre, julho de 2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR EM FARMÁCIA**

**EFEITO DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS ACUMULADOS NA DOENÇA DO  
XAROPE DO BORDO SOBRE PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS EM  
PREPARAÇÕES MITOCONDRIAS DE CÉREBRO DE RATOS JOVENS**

**ALEXANDRE UMPIERREZ AMARAL**

**Trabalho de Conclusão**

**da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER**

**CO-ORIENTADOR: M.Sc. GUILHIAN LEIPNITZ**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**Porto Alegre, julho de 2008**

*“Se você tentou e fracassou, se planejou e seus planos ruíram, lembre-se de que os maiores homens da história foram produtos de coragem; e a coragem nasce no berço da adversidade”.*

*(Napoleão Bonaparte)*

*Aos meus pais, Anselmo e Nilza, que sempre me proporcionaram o apoio e as condições necessárias para a realização deste objetivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino gratuito e de qualidade.

Aos meus colegas do laboratório 38, pela amizade, competência e alegria com que cada um trabalha, tornando o nosso dever muito mais gratificante.

Ao meu orientador, Professor Moacir Wajner, pela orientação com dedicação e competência, e pela inteligência com que conduz o laboratório 38.

Ao meu co-orientador, Guilhian, pela ajuda e conselhos imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À Alexandra, por tudo o que me ensinou no período em que trabalhamos juntos.

Ao César, que colaborou muito para solução de problemas durante o trabalho.

Ao Gustavo e à Patrícia, que, mesmo à distância, nunca deixaram de me aconselhar e responder às dúvidas que surgiram naturalmente.

Aos colegas de laboratório, Carolina Fernandes, Bianca, Ângela, Alana, Lisiane, Mateus, Carolina Viegas, Anelise, Ana Paula, Lucila e Alexandre Solano, por sempre estarem prontos e dispostos a ajudar.

Aos que nos deixaram para seguirem seus sonhos, Rafael, Karina, Anna Laura, Josué, Paula, Fernanda e Giórgia, pela ótima companhia que sempre foram.

Aos meus colegas de classe, especialmente à gurizada, que me acompanharam durante estes últimos anos com companheirismo e amizade.

Aos meus mais antigos amigos, por sempre estarem presentes, pela diversão e amizade que me proporcionaram e me proporcionarão por muito tempo.

À Cristina, por todo o amor, companheirismo, dedicação e compreensão durante o período da graduação.

Aos meus pais, irmãos e família, pela educação, amor e pelos conselhos que me tornaram a pessoa que sou.

## RESUMO

A Doença do Xarope do Bordo (DXB) é uma desordem neurometabólica causada pela deficiência na atividade do complexo da desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (CDCCR). Os metabólitos que se acumulam em maior concentração na DXB são a leucina, o ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico (CIC) e o ácido  $\alpha$ -hidroxiisovalérico (HIV). Considerando que os mecanismos neurotóxicos na DXB são muito pouco conhecidos, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito *in vitro* da leucina, CIC e HIV sobre parâmetros respiratórios medidos através do consumo de oxigênio em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens. Os parâmetros respiratórios analisados foram o estado III, o estado IV e o RCR (razão de controle respiratório), os quais foram medidos na presença de 1 mM e 5 mM de leucina, CIC e HIV utilizando-se o eletrodo de Clark. Glutamato/malato (2,5 mM cada), succinato (5 mM) e  $\alpha$ -cetogluturato (5 mM) foram utilizados como substratos respiratórios. Observamos que o CIC estimulou significativamente a respiração mitocondrial no estado IV e diminuiu o RCR, sem alterar o estado III, quando o consumo de oxigênio foi estimulado por glutamato/malato ou succinato. Quando  $\alpha$ -cetogluturato foi utilizado como substrato, além dos mesmos efeitos apresentados anteriormente, o estado III também foi inibido pelo CIC. A leucina e o HIV não alteraram nenhum parâmetro respiratório testado, com a utilização de glutamato/malato e succinato como substratos. Tais resultados indicam que o CIC se comporta como um desacoplador da fosforilação oxidativa e que a respiração celular é comprometida por esse metabólito.

Palavras-chave: Doença do Xarope do Bordo, ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico, ácido  $\alpha$ -hidroxiisovalérico, leucina, respiração celular, consumo de oxigênio, fosforilação oxidativa

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas metabólicas dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina .....	13
Figura 2. Complexo desidrogenase dos $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada .....	15
Figura 3. Lançadeira do malato e lançadeira do glicerol-3-P .....	25
Figura 4. Estados da respiração mitocondrial .....	27
Figura 5. Efeito in vitro do ácido $\alpha$ -cetoisocapróico (CIC) sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando glutamato/malato como substrato.....	33
Figura 6. Efeito in vitro do ácido $\alpha$ -cetoisocapróico (CIC) sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando succinato como substrato.....	34
Figura 7. Efeito in vitro do ácido $\alpha$ -cetoisocapróico (CIC) sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando $\alpha$ -cetoglutarato como substrato .....	35
Figura 8. Efeito in vitro do ácido $\alpha$ -hidroxiiisovalérico (HIV) sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando glutamato/malato como substrato.....	37
Figura 9. Efeito in vitro do ácido $\alpha$ -hidroxiiisovalérico (HIV) sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando succinato como substrato.....	38
Figura 10. Efeito in vitro da leucina sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando glutamato/malato como substrato.....	40
Figura 11. Efeito in vitro da leucina sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando succinato como substrato.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACR – aminoácidos de cadeia ramificada; ADP – adenosina-5'-difosfato; ATP - adenosina-5'-trifosfato; BSA – albumina bovina; CIC - ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico; CIV - ácido  $\alpha$ -cetoisovalérico; CMV - ácido  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalérico; CCR –  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada; CDCCR - complexo desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada; CoA - coenzima A; DMSO – dimetil sulfóxido; DXB – doença do xarope do bordo; EGTA – ácido etileno glicol-bis(2-aminoetiléter)-N, N, N', N'-tetraacético; FAD – flavina adenina dinucleotídeo; FADH<sub>2</sub> - flavina adenina dinucleotídeo reduzido; GABA - ácido  $\gamma$ -aminobutírico; H<sub>2</sub>O – água; HCl – ácido clorídrico; HCR – hidroxiácidos de cadeia ramificada; HEPES - ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etano sulfônico; HIC - ácido  $\alpha$ -hidroxiisocapróico; HIV - ácido  $\alpha$ -hidroxiisovalérico; HMV - ácido 2-hidroxi-3-metilvalérico; KCl – cloreto de potássio; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato de potássio monobásico anidro; KOH – hidróxido de potássio; MOPS – ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico; NAD<sup>+</sup> - adenina dinucleotídeo; NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido; O<sub>2</sub> – oxigênio; Pi - fosfato inorgânico; SNC - sistema nervoso central; SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1. Erros Inatos do Metabolismo .....	10
1.2. Acidemias Orgânicas .....	10
1.3. Doença do Xarope do Bordo .....	10
1.3.1. Histórico.....	10
1.3.2. Etiologia.....	11
1.3.3. Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada .....	11
1.3.4. Complexo desidrogenase dos $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (CDCCR) .....	14
1.3.5. Diagnóstico da Doença do Xarope do Bordo .....	15
1.3.6. Fenótipos clínicos .....	16
1.3.6.1. Clássico .....	16
1.3.6.2. Intermediário.....	17
1.3.6.3. Intermitente .....	17
1.3.6.4. Tiamina-responsivo .....	17
1.3.6.5. Diidrolipoil desidrogenase (E3)-deficiente.....	18
1.3.6.6. Genética .....	18
1.3.7. Neuropatologia .....	19
1.3.7.1. Achados neuropatológicos .....	19
1.3.7.2. Tratamento.....	20
1.3.7.3. Fisiopatologia do dano neurológico .....	21
1.4. Fosforilação Oxidativa .....	24
1.4.1. Estudo do consumo mitocondrial de oxigênio .....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
2.1. Objetivo geral .....	28
2.2. Objetivos específicos .....	28
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1. Animais de experimentação.....	29
3.2. Reagentes.....	29
3.3. Equipamentos e outros materiais .....	29
3.4. Isolamento das mitocôndrias .....	30
3.5. Avaliação dos parâmetros respiratórios .....	30
3.6. Determinação do conteúdo protéico.....	31
3.7. Análise estatística .....	31
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
4.1. Efeito in vitro do ácido $\alpha$ -cetoisocapróico (CIC) sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	32
4.2. Efeito in vitro do ácido $\alpha$ -hidroxiisovalérico (HIV) sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	36
4.3. Efeito in vitro da leucina sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens. ....	39
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>45</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>46</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Erros Inatos do Metabolismo**

Erros inatos do metabolismo são distúrbios hereditários, majoritariamente de herança autossômica recessiva, cuja característica bioquímica principal é a deficiência ou ausência da atividade de uma enzima específica de uma rota metabólica. Além das enzimas, outras proteínas com função alterada como proteínas de transporte e proteínas estruturais, imunoglobulinas, hormônios, entre outras, podem estar afetadas nos erros inatos do metabolismo. O resultado deste bloqueio pode levar ao acúmulo de substâncias tóxicas nos tecidos e fluidos corporais ou à falta de substâncias essenciais, desta forma, muitas vezes, acarretando prejuízo no desenvolvimento mental e/ou físico dos indivíduos afetados (Del Rio, 1962). Além disso, rotas alternativas também poderão originar outras substâncias possivelmente tóxicas.

### **1.2. Acidemias Orgânicas**

Acidemias orgânicas são distúrbios hereditários do metabolismo de aminoácidos, glicídios ou lipídios, causados por deficiência na atividade de uma enzima e caracterizados bioquimicamente pelo acúmulo de um ou mais ácidos orgânicos (carboxílicos) e/ou derivados em vários tecidos e líquidos biológicos dos indivíduos afetados (Chalmers e Lawson, 1982; Scriver et al, 2001; Cornejo e Raiman, 2003).

### **1.3. Doença do Xarope do Bordo**

#### **1.3.1. Histórico**

Em 1954, Menkes e colaboradores descreveram uma doença degenerativa cerebral em quatro casos de uma mesma família. A manifestação do quadro clínico se

dava na primeira semana de vida com prognóstico fatal nos três meses subsequentes. O achado mais proeminente foi um odor forte de açúcar queimado na urina, o que deu origem ao nome “Doença do Xarope do Bordo” (DXB). Em 1957, Westall e colaboradores observaram outro paciente e encontraram concentrações muito altas dos aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina). Em 1959, Menkes isolou na urina dos pacientes com DXB, os  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada ( $\alpha$ -cetoisocapróico,  $\alpha$ -cetoisovalérico e  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalérico) que se derivam dos aminoácidos acima citados.

### **1.3.2. Etiologia**

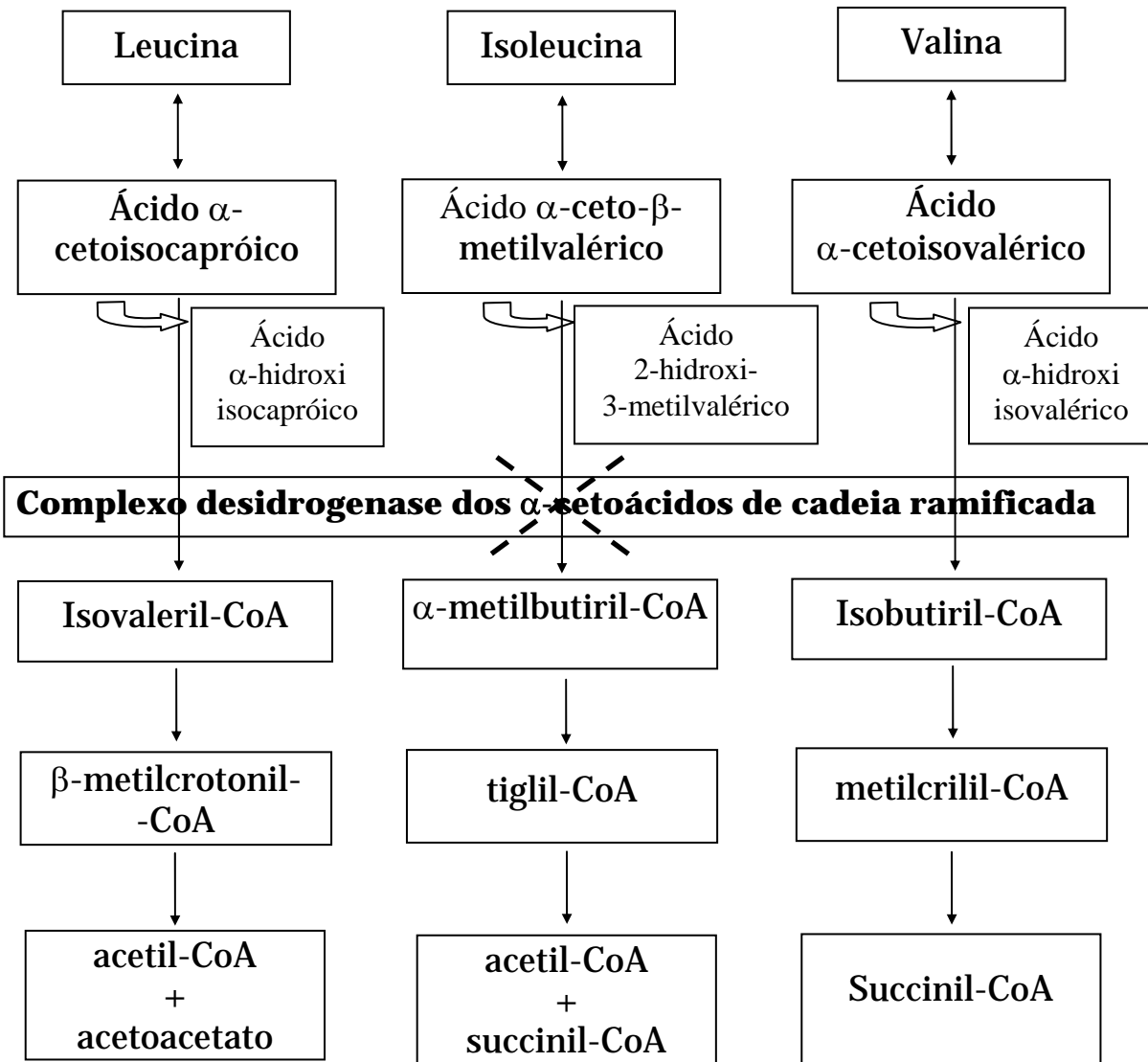
A Doença do Xarope do Bordo (DXB) é um distúrbio metabólico de herança autossômica recessiva causada pela deficiência na atividade do complexo desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (CDCCR) (Nobukuni et al., 1992; Chuang & Shih, 2001). Esta deficiência enzimática resulta no acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) leucina, valina e isoleucina, bem como de seus respectivos  $\alpha$ -cetoácidos (CCR), ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico (CIC), ácido  $\alpha$ -cetoisovalérico (CIV) e ácido  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalérico (CMV). Da mesma forma são encontrados em concentrações elevadas os hidroxiderivativos correspondentes (HCR) ácido  $\alpha$ -hidroxiisocapróico (HIC), ácido  $\alpha$ -hidroxiisovalérico (HIV) e ácido 2-hidroxi-3-metilvalérico (HMV), com especial ênfase para o HIV (Figura 1).

### **1.3.3. Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada**

Os ACR leucina, valina e isoleucina correspondem a aproximadamente 40% dos aminoácidos essenciais nos indivíduos normais e 35% dos aminoácidos indispensáveis para o tecido muscular. O principal destino metabólico destes ACR é a incorporação em proteínas corporais (Schadewaldt e Wendel, 1997).

A oxidação dos ACR pode ser vista na figura 1. Tem início com o transporte destes aminoácidos para dentro da célula através do sistema de transporte L localizado na membrana plasmática. No interior das células os ACR sofrem três passos iniciais comuns na sua via metabólica. O primeiro passo é uma transaminação reversível catalizada pela

aminotranferase de cadeia ramificada produzindo os CCR, CIC da leucina, CMV da isoleucina e CIV da valina. Após isto, os CCR são translocados para dentro da mitocôndria por um transportador específico onde sofrem descarboxilação oxidativa catalisada pelo CDCCR. Por último, sofrem desidrogenação pela isovaleril-CoA desidrogenase ou pela acil-Coa  $\alpha$ -metil desidrogenase de cadeia ramificada. A seqüência de reações dos respectivos acil-CoA de cadeia ramificada apresenta vias distintas a partir de então. A leucina apresenta como produtos finais a acetil-CoA e o acetoacetato. A valina é convertida exclusivamente a succinil-CoA e a isoleucina produz acetil-CoA e succinil-CoA. Os ACR são, portanto, tanto cetogênicos quanto glicogênicos, servindo como precursores para a síntese de ácidos graxos e do colesterol e também servindo como substrato para a produção de energia via succinil-CoA e acetoacetato (Chuang e Shih, 2001).



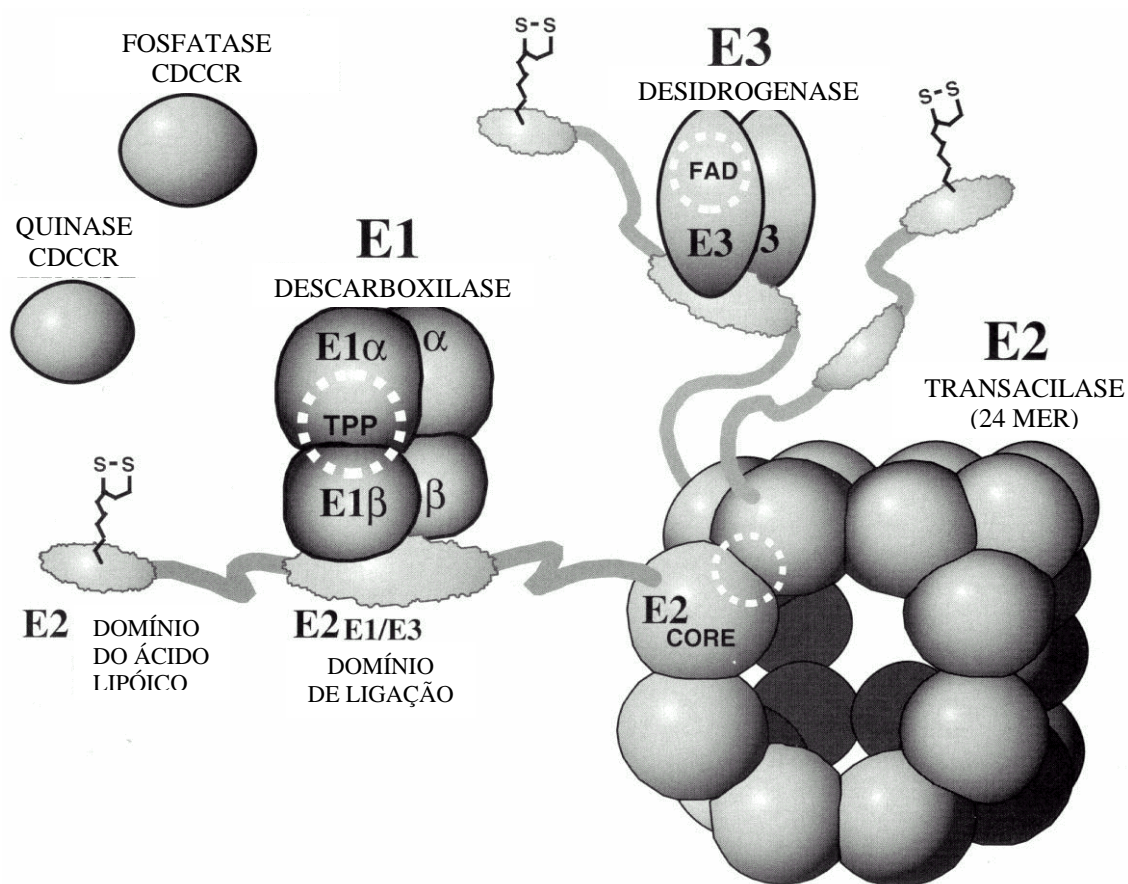
**Figura 1** - Rotas metabólicas dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina. As duas primeiras reações comuns são catalisadas pelas seguintes enzimas: transaminação reversível pela aminotransferase dos aminoácidos de cadeia ramificada, descarboxilação oxidativa dos cetoácidos de cadeia ramificada e esterificação da coenzima A pelo complexo alfa-cetoácido desidrogenase. Em destaque é mostrada a etapa em que a enzima é deficiente nos pacientes com DXB (Adaptado de Scriver et al., 2001).

#### **1.3.4. Complexo desidrogenase dos $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (CDCCR)**

O bloqueio metabólico na DXB foi demonstrado em 1960 por Dancis e colaboradores como sendo na descarboxilação dos CCR em leucócitos. O CDCCR é um complexo multienzimático localizado na membrana interna da mitocôndria das células de mamíferos (Yeaman, 1986; Chuang e Shih, 2001), envolvido na descarboxilação dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, valina e isoleucina (Nobukuni, 1992; Parrella et al., 1994; Chuang e Shih, 2001). Os produtos finais desta reação são  $\text{CO}_2$ , acil-CoA de cadeia ramificada e NADH na proporção de 1:1:1 (Danner et al., 1979). A atividade deste complexo regula o fluxo dos ACR usados para a produção de energia e é o passo irreversível da via catabólica. O complexo CDCCR é um membro do grupo de complexos de desidrogenases de  $\alpha$ -cetoácidos bastante conservados e compreendendo o complexo piruvato desidrogenase,  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e o CDCCR que se apresentam com estrutura e função similares.

Os passos da reação catalisados pelos três componentes da enzima são mostrados na figura 2. O componente E1 catalisa uma descarboxilação dos  $\alpha$ -cetoácidos mediada pela tiamina pirofosfatase (Treacy et al., 1992; Peinemann e Danner, 1994; Chuang e Shih, 2001) e subsequentemente reduz a molécula de lipoil que é covalentemente ligada a E2. A molécula do lipoil reduzida e o domínio lipoil servem como um braço móvel para transferir o grupo acil do E1 para a CoA, aumentando a quantidade de acil-CoA. Finalmente, o componente E3, que é fortemente ligado ao FAD, reoxida o resíduo de diidrolipoil do E2 tendo o  $\text{NAD}^+$  como último acceptor de elétrons (Reed e Hackert, 1990; Chuang, 1998; Chuang e Shih, 2001). O resultado final da reação da desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada é a produção de acil-CoA de cadeia ramificada,  $\text{CO}_2$  e NADH.

A quinase liga-se aos resíduos Ser-292 e Ser-302 do domínio E1 $\alpha$ , (Cook et al., 1983; Cook et al., 1983a; Lau et al. 1983; Paxton et al., 1986). Estudos iniciais apontam para uma possível ligação da fosfatase ao centro da subunidade E2 (Yeaman, 1989).



**Figura 2** - Complexo desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (Chuang, 1998).

### 1.3.5. Diagnóstico da Doença do Xarope do Bordo

O diagnóstico da DXB é fundamentalmente laboratorial. A identificação de concentrações plasmáticas e urinárias elevadas de leucina, isoleucina e valina e de seus respectivos  $\alpha$ -cetoácidos através de cromatografia de aminoácidos e ácidos orgânicos, respectivamente, caracterizam a doença. Os níveis mais altos encontrados para os metabólitos acumulados na DXB são os da leucina, do CIC e do HIV (1-5 mM) quando analisado o plasma de pacientes não tratados. Os níveis destes metabólitos quando analisado o líquido céfalo-raquidiano estão ao redor de 1 mM (Shigematsu et al., 1983). Muitos estados nos Estados Unidos e outros países utilizam um programa de triagem em

massa para identificar neonatos com níveis plasmáticos de leucina acima de 2 mg/100 ml (153  $\mu$ M) indicativos da doença (Danner e Elsas, 1989).

A confirmação do diagnóstico é feita através da medida da atividade do CDCCR em cultura de leucócitos periféricos dos pacientes (Peinemann e Danner, 1994).

O diagnóstico pré-natal da DXB pode ser realizado em cultura de células do fluido amniótico retiradas por amniocentese entre a 14<sup>a</sup> e a 18<sup>a</sup> semana de gestação, ou por análise direta do tecido em vilosidades coriônicas e cultura de células de vilosidades coriônicas (Kleijer et al., 1985; Chuang e Shih, 2001).

### **1.3.6. Fenótipos clínicos**

#### **1.3.6.1. Clássico**

A DXB que apresenta um quadro neonatal de encefalopatia é considerada a forma clássica, e representa o fenótipo mais grave e comum da doença. Os níveis dos ACR e CCR, particularmente de leucina e CIC, estão muito aumentados no sangue, chegando a 5 mM, bem como no líquido céfalo-raquidiano e na urina dos pacientes afetados. A atividade do CDCCR em fibroblastos ou cultura de linfócitos encontra-se usualmente em 2% ou menos em relação à atividade normal da enzima. Os pacientes afetados apresentam-se normais ao nascimento e os sintomas que se desenvolvem geralmente entre o 4<sup>o</sup> e o 7<sup>o</sup> dia de vida incluem letargia, recusa alimentar, alterações neurológicas progressivas como hipotonia e hipertonia, cetose, odor de açúcar queimado na urina, hipoglicemia, convulsões e coma.

A maioria dos pacientes, quando não tratados, morre nos meses de vida em decorrência de crises metabólicas recorrentes e de deterioração neurológica, freqüentemente precipitada por infecções ou outros eventos relacionados ao catabolismo, tais como vacinações ou cirurgias (Chuang e Shih, 2001).



### **1.3.6.2. Intermediário**

Pacientes com a forma intermediária apresentam elevações persistentes dos ACR, porém menores do que as verificadas na forma clássica (acompanhadas por comprometimento neurológico), mas não apresentam sintomas severos no período neonatal. Muitos casos não apresentam episódios de descompensação metabólica aguda. A atividade residual da enzima é geralmente maior do que a apresentada no fenótipo clássico e varia entre 3 a 30% da normal, embora existam relatos de níveis menores (Fischer & Gerritsen, 1971; Muller et al., 1971; Gonzales-Rios et al., 1985). O diagnóstico geralmente ocorre entre 5 meses a 7 anos de idade em decorrência de atraso no desenvolvimento e/ou convulsões e cetoacidose, embora encefalopatia aguda raramente ocorra.

### **1.3.6.3. Intermitente**

Pacientes apresentam um desenvolvimento inicial normal, com crescimento e inteligência normais. No entanto, eles apresentam risco de sofrerem descompensação metabólica durante situações de estresse. No período assintomático da doença os níveis dos ACR são normais. A atividade enzimática situa-se entre 5 a 20% da normal. Os sintomas iniciais normalmente surgem entre os 5 meses e 2 anos de vida em associação com otite média ou outras infecções. Os episódios de mudanças agudas no comportamento e dificuldade de caminhar podem evoluir para crises de descompensação com choque e coma. Os perfis de ACR e CCR nestes casos equiparam-se ao do fenótipo clássico da DXB durante as crises (Chuang e Shih, 2001).

### **1.3.6.4. Tiamina-responsivo**

Normalmente, estes pacientes não apresentam doença neonatal aguda e suas manifestações clínicas são semelhantes às da forma intermediária. A concentração de ACR no plasma é cerca de 5 vezes maior que o normal. Estes níveis (2-5 mM) são reduzidos abruptamente para níveis normais com doses de 10 a 1000 mg/dia de tiamina e

com dieta restrita em proteínas. A atividade enzimática situa-se entre 2 a 40% da normal. As manifestações clínicas e laboratoriais mais freqüentes são descompensação metabólica e acidose, acompanhada de desenvolvimento físico normal (Chuang e Shih, 2001).

#### **1.3.6.5. Diidrolipoil desidrogenase (E3)-deficiente**

A deficiência de E3 é um distúrbio raro. Apresenta sinais clínicos semelhantes aos da forma intermediária, mas é acompanhada de acidose láctica grave. O perfil de ácidos orgânicos na urina exhibe anormalidades encontradas tanto na acidose láctica como na DXB. O lactato, o piruvato, o  $\alpha$ -cetogluturato, o  $\alpha$ -hidroxiisovalerato e o  $\alpha$ -hidroxiglutarato estão aumentados neste fenótipo. A hiperalaninemia secundária ao acúmulo de piruvato é também freqüente. Os ACR estão leve ou moderadamente aumentados no plasma, quando comparados aos níveis encontrados na forma clássica. Estes pacientes têm deficiência das três enzimas desidrogenases em que E3 é um componente, a  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase, a piruvato desidrogenase e o CDCCR. Os pacientes que apresentam este fenótipo normalmente não apresentam sintomatologia nos primeiros meses de vida. Quando surge acidose láctica persistente, entre 8 semanas e 6 meses de idade, ocorre a deterioração neurológica progressiva caracterizada por hipotonia, atraso no desenvolvimento e encefalopatia similar a de Leigh. (Chuang e Shih, 2001). Os resultados dos tratamentos com doses farmacológicas de tiamina, biotina, e ácido lipóico, combinados com restrição na dieta de gorduras e ACR não têm se revelado satisfatórios.

#### **1.3.6.6. Genética**

A doença do Xarope do Bordo é uma desordem metabólica autossômica recessiva. A freqüência mundial baseada em neonatal em massa em 26,8 milhões de recém nascidos é de 1 para 185.000 (Naylor, 1980). Esta freqüência inclui o fenótipo clássico e as formas variantes da doença. Os pacientes com o fenótipo intermediário da doença não estão incluídos nestes cálculos. Em países cujo casamento consanguíneo é comum (Turquia, Arábia Saudita, Espanha e Índia), a freqüência é muito maior. A DXB é

altamente prevalente nas populações Menonitas dos condados de Lancaster e Lebanon no estado da Pensilvânia/EUA. Toda a população Menonita afetada apresenta o fenótipo Clássico da doença devido a uma mutação genética única na subunidade E1 $\alpha$ .

### **1.3.7. Neuropatologia**

#### **1.3.7.1. Achados neuropatológicos**

Na maioria dos pacientes com DXB observa-se encefalopatia com edema cerebral generalizado. Pode haver também a formação de edema intenso localizado envolvendo o tronco cerebral dorsal, os pedúnculos cerebrais e a cápsula interna. Estes estudos relataram também a ocorrência de hipodensidade difusa no globo pálido e tálamo afetando a substância branca destas regiões, o que é um indicativo de hipomielinização (Treacy et al., 1992). A fase aguda do edema também é seguida por alargamento do sulco sobre os lobos frontais e das fissuras inter-hemisféricas e silviana indicando atrofia cerebral. O trato piramidal da medula espinal, a mielina que circunda o núcleo dentado, o corpo caloso e os hemisférios cerebrais são os mais afetados. Paralelamente à deficiência de mielina, observa-se redução dos oligodendrócitos. Outra estrutura que apresenta alterações expressivas é o cerebelo, pois relatos mostram panecrose da camada de células granulares com preservação das células de Purkinje. Nos núcleos da base e substância negra observou-se perda neuronal considerável (Chuang e Shih, 2001).

Os achados radiológicos mais recentes apontam que as anomalias consistem de um sinal aumentado em neuroimagens (T2), que é compatível com o conteúdo aquoso modificado na substância branca característico da desmielinização. As áreas afetadas mais comumente são: mesencéfalo, tronco cerebral, tálamo e o globo pálido; as lesões supratentoriais são vistas somente nos casos mais severos (Schonberger et al., 2004).

Quando comparadas as presenças anormais dos ACR e CCR com os achados de neuroimagem, o aumento destes metabólitos era acompanhado por uma difusão protônica marcadamente restrita, compatível com edema citotóxico ou da bainha intramielínica no tronco cerebral, nos gânglios basais, no tálamo, no cerebelo, na substância branca periventricular e no córtex cerebral (Jan et al., 2003).

### 1.3.7.2. Tratamento

O tratamento dos pacientes com DXB consiste basicamente em restrição dos ACR da dieta para minimizar os efeitos do acúmulo dos metabólitos acumulados, principalmente no Sistema Nervoso Central (SNC). O objetivo do tratamento é normalizar as concentrações dos ACR sem prejudicar o crescimento e desenvolvimento dos pacientes e para tanto, deve ser iniciado o mais cedo possível e ainda no período neonatal. Administra-se um leite especial com concentrações reduzidas de leucina, valina e isoleucina (Snyderman et al., 1964). Outras preparações dietéticas específicas para pacientes com DXB também foram desenvolvidas. A terapia com tiamina (50 a 300 mg/dia) por 3 semanas é empregada no início do tratamento para a detecção de pacientes com a doença tiamina-responsível (Chuang e Shih, 2001).

Em casos mais graves tem sido utilizado o transplante de fígado, substituindo o órgão com gene alterado por um órgão normal. Desta forma, os aminoácidos de cadeia ramificada podem ser metabolizados normalmente.

Na fase aguda, emprega-se um tratamento mais agressivo, pois o aumento na concentração dos ACR e CCR, freqüentemente precipitado por infecções ou outros estresses, leva à deterioração das funções cerebrais. Existem três medidas a ser tomadas para o controle das crises metabólicas: remoção dos metabólitos tóxicos; promover suporte nutricional adequado e minimizar o catabolismo e/ou promover o anabolismo. Supõe-se que promover o anabolismo pode ser um dos mais importantes fatores no controle da descompensação metabólica (Chuang e Shih, 2001). A diálise peritoneal e a transfusão sanguínea são utilizadas para a remoção dos metabólitos com melhora significativa e rápida do quadro neurológico. No entanto, a hemodiálise é mais eficaz na depuração dos ACR e dos CCR do plasma do que a diálise peritoneal. A diálise peritoneal é um procedimento relativamente simples, enquanto que a hemodiálise requer um equipamento sofisticado e treinamento especializado. Desenvolveu-se, para os pacientes com DXB, uma terapia com nutrição parenteral que inclui uma mistura de ACR em combinação com glicose, lipídios, eletrólitos e vitaminas a fim de proporcionar uma nutrição balanceada. Esta preparação é utilizada nos casos de descompensação metabólica moderada ou em combinação com outras terapias na descompensação metabólica severa. Uma terapia alternativa consiste em evitar o estado catabólico com administração de insulina e glicose (Rogers et al., 1962; Wendel, et al., 1982). Devemos,

no entanto, enfatizar que um grau variável de comprometimento da cognição é observado na maioria dos pacientes com doença do xarope do bordo, os quais foram submetidos a um tratamento aparentemente adequado, sugerindo que o tratamento para esta doença deva ser melhorado.

### **1.3.7.3. Fisiopatologia do dano neurológico**

Os mecanismos tóxicos dos ACR e CCR sobre o cérebro ainda não foram totalmente elucidados, mas diversos estudos já realizados contribuem para o entendimento das suas ações sobre o SNC. Alguns fatores, tais como a complexidade do desenvolvimento do cérebro, as concentrações alcançadas pelas toxinas e o estágio do desenvolvimento cerebral em que elas atuam prejudicam o esclarecimento destes efeitos.

Tashian, em 1961, demonstrou que o CIC e o CIV inibem competitivamente a atividade da enzima glutamato descarboxilase em homogeneizados de cérebro de rato. Os hidroxiácidos HIC e HIV também apresentaram o mesmo efeito, mas em menor grau. Desta forma, estes metabólitos poderiam reduzir a produção de GABA, o principal neurotransmissor inibitório do SNC. Foi também verificada em um modelo animal de DXB em bovinos uma perda marcante no número de receptores pós-sinápticos GABA<sub>A</sub> demonstrada por ligação de [H<sup>3</sup>]diazepam (Dodd et al., 1992). Por outro lado, foi demonstrado que os cetoácidos CIC, CIV e CMV inibem a oxidação da glicose e a síntese de acetilcolina, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos em fatias de cérebro de ratos (Gibson e Blass, 1976). Além disso, esses investigadores demonstraram que estes cetoácidos também inibem a enzima ácido graxo sintetase, além de observar que os cetoácidos inibem a oxidação do piruvato em cérebro de ratos, o transporte mitocondrial de piruvato, a atividade do complexo piruvato desidrogenase e a atividade da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase. Os aminoácidos valina e isoleucina, por sua vez, inibiram alostericamente a enzima piruvato quinase em cérebro de ratos. Outros achados mostraram que o excesso de leucina na dieta provoca uma diminuição da serotonina cerebral (Yuwiler e Geller, 1965). Finalmente, como uma propriedade da leucina é estimular a secreção de insulina, Panten e colaboradores (1972) propuseram que essa ação poderia explicar os episódios de hipoglicemia apresentados pelos pacientes com a DXB.

Dentre os cetoácidos acumulados na doença, CIC é considerado o mais tóxico. O CIC inibe o consumo de oxigênio em cérebro de ratos, a oxidação do 3-hidroxi-butarato (Gibson e Blass, 1976) e provoca deficiência na formação da mielina no cerebelo de ratos. Alguns estudos demonstraram que a elevação sérica de leucina e de CIC no espaço extracelular altera a concentração no SNC dos aminoácidos transportados pelo transportador dos aminoácidos neutros de cadeia longa (sistema L) que incluem a metionina, valina, isoleucina, triptofano, tirosina, fenilalanina e glutamina (Araújo et al., 2001). Desta forma, a biossíntese celular de alguns neurotransmissores cerebrais como as catecolaminas e a serotonina poderia estar afetada pela diminuição na concentração cerebral de alguns destes aminoácidos (Huang et al., 1996; Zielke et al., 1996). Estes mesmos autores observaram que a adição de CIC à cultura de astrócitos de rato diminui o conteúdo de glutamato aumentando sua taxa de oxidação. O mecanismo sugerido foi a transferência do grupo amino do glutamato para o CIC levando a formação de leucina e  $\alpha$ -cetoglutarato. Também se demonstrou que além de aumentar a taxa de oxidação de glutamato, níveis elevados de CIC também aumentam a oxidação da glutamina (Zielke et al., 1997). Na presença de um excesso de CIC, o conteúdo de glutamato intracelular em cultura de astrócitos diminui em 50% (Yudkoff et al., 1993; Yudkoff et al., 1994). Outro efeito importante parece ser o da leucina ao ativar alostericamente a enzima glutamato desidrogenase (Yielding e Tomkins 1961). Estudos subsequentes demonstraram ativação semelhante em mitocôndrias de ratos (Coué e Tipton, 1989) e em sinaptossomas (Erecinska e Nelson, 1990). Por outro lado, o CIC inibe a síntese de glutamina em cultura de astrócitos (Yudkoff et al., 1994).

Jouvet e colaboradores (2000) descreveram os efeitos dos ACR e CCR sobre a viabilidade celular de fibroblastos cultivados da pele de um paciente com DXB. Pela proposição dos autores, a apoptose foi ativada pela presença de níveis de ACR e CCR que são comparáveis aos encontrados nos pacientes. Além disso, Funchal e colaboradores (2004a) demonstraram, em cultura de astrócitos, que os CCR levam a morte celular em concentrações comparáveis às alcançadas por indivíduos afetados e que estão no estado de descompensação metabólica. Estes autores demonstraram ainda que os CCR alteram a fosforilação de proteínas do citoesqueleto levando à reorganização da actina e da GFAP (proteína ácida fibrilar glial) do citoesqueleto celular (Funchal et al., 2002; Pessoa-Pureur et al., 2002; Funchal et al., 2004), bem como demonstraram que as células gliais tratadas com estes metabólitos apresentam morfologia distinta das células controles, distinguindo-se da característica poligonal e apresentando uma distribuição

fusiforme (Funchal et al, 2004a).

Por outro lado, estudos *in vitro* de metabolismo energético cerebral apontam para uma redução na atividade da enzima creatina quinase em homogeneizado de cérebro com concentrações elevadas de ACR, mas não de CCR (Pilla et al., 2003). Além disso, um efeito inibitório *in vitro* dos CCR sobre a produção de CO<sub>2</sub> e a atividade do complexo I-III (50-60 % de diminuição), justificado por um bloqueio na atividade do complexo I, foi encontrado embora não tenham sido demonstrados efeitos na liberação de lactato, utilização de glicose ou ainda na atividade dos outros complexos da cadeia respiratória (Sgaravatti, 2003). Outros resultados indicam a existência de peroxidação lipídica e redução da capacidade cerebral em modular eficientemente os danos associados com uma produção aumentada de radicais livres pelos aminoácidos, cetoácidos e hidroxíácidos de cadeia ramificada que se acumulam na DXB, medidas pelas técnicas de quimioluminescência, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, potencial antioxidante total e reatividade antioxidante total (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003).

Em relação ao glutamato, resultados apontam para uma diminuição da captação de glutamato por vesículas sinápticas de cérebro de ratos jovens. Nestes modelos foi demonstrado que os CCR e ACR inibem a captação de glutamato em concentrações similares a de pacientes em descompensação metabólica sendo sugerido inclusive um mecanismo de inibição competitiva entre estes metabólitos (Reis et al., 2000; Tavares et al., 2000).

Alterações comportamentais também têm sido atribuídas aos ACR e CCR acumulados na DXB. Utilizando um modelo crônico de injeções de leucina, Mello e colaboradores (1999) induziram déficit comportamental de longa duração quando os ratos eram submetidos a duas tarefas distintas de aprendizado (habituação ao campo aberto e esquiva ativa de duas vias). Por último, Coitinho e colaboradores (2001) investigaram o efeito da administração intraestriatal dos CCR que se acumulam na DXB sobre o comportamento convulsivante de ratos adultos. Os resultados revelaram a indução de convulsões após a injeção do CIV e que estas podem ser mediadas através de mecanismos de controle gabaérgicos e glutamatérgicos.

Deve-se enfatizar, no entanto, que a fisiopatologia da disfunção neurológica presente nos pacientes com DXB ainda não está completamente esclarecida.

## 1.4. Fosforilação Oxidativa

A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual o  $O_2$  é reduzido a  $H_2O$ , por elétrons doados pelo NADH e  $FADH_2$ , que fluem através de vários pares redox (cadeia respiratória), gerando ATP a partir de ADP e Pi (Nelson e Cox, 2000). Em eucariotos, a fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias, mais especificamente na cadeia respiratória, e é responsável pela maior parte da energia produzida pela célula.

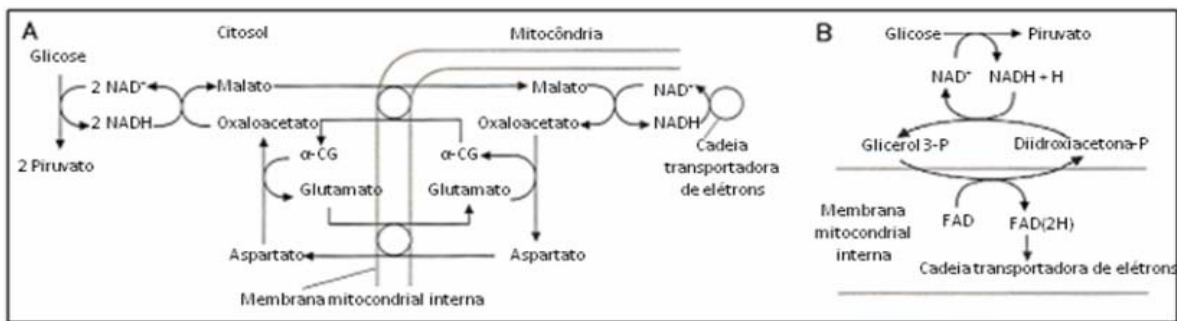
As mitocôndrias são corpúsculos envoltos por uma membrana externa, facilmente permeável a pequenas moléculas e íons, e por uma membrana interna, impermeável à maioria das moléculas e íons, incluindo prótons (Nelson e Cox, 2000). A membrana interna contém transportadores específicos para a passagem de substâncias como o piruvato, glicerolfosfato, malato, ácidos graxos e outras moléculas essenciais às funções mitocondriais (Abeles, Frey e Jencks, 1992). O fluxo de elétrons do NADH e  $FADH_2$  até o  $O_2$  se dá através de complexos enzimáticos ancorados na membrana mitocondrial interna. Essa transferência de elétrons é impulsionada por um crescente potencial redox existente entre o NADH e o  $FADH_2$ , os outros complexos enzimáticos da cadeia respiratória e o  $O_2$ , que é o aceptor final dessa cadeia de reações de oxidação.

A cadeia respiratória é composta por vários complexos enzimáticos e uma coenzima lipossolúvel, a coenzima Q ou ubiquinona (Di Donato, 2000). O complexo I conhecido como NADH desidrogenase ou NADH: ubiquinona oxidoredutase, transfere os elétrons do NADH para a ubiquinona. O complexo II (succinato desidrogenase) reduz a ubiquinona com elétrons do  $FADH_2$  provenientes da oxidação do succinato a fumarato no ciclo do ácido cítrico. O complexo III (citocromo  $bc_1$  ou ubiquinona-citocromo  $c$  oxidoredutase) catalisa a redução do citocromo  $c$  a partir da ubiquinona reduzida. Na parte final da cadeia de transporte de elétrons, o complexo IV (citocromo  $c$  oxidase) catalisa a transferência de elétrons de moléculas reduzidas de citocromo  $c$  para  $O_2$ , formando  $H_2O$ . São necessárias quatro moléculas de citocromo  $c$  para reduzir completamente uma molécula de  $O_2$ . Todos esses complexos possuem grupamentos prostéticos específicos para desempenharem o papel de aceptores e doadores de elétrons (Abeles, Frey e Jencks, 1992).

A respiração mitocondrial, portanto, é sustentada por substratos ligados a NADH ou a  $FADH_2$ . No entanto, a membrana mitocondrial interna é impermeável a essas



moléculas, necessitando sistemas de transferência desses equivalentes reduzidos do citosol para a matriz mitocondrial. Nesse contexto, a oxidação do NADH formado no citosol é possibilitada por sistemas chamados lançadeiras, que transferem elétrons do NADH do citosol para a matriz, através de moléculas capazes de ser transportadas através da membrana mitocondrial interna. Existem duas lançadeiras para este fim, designadas de lançadeira do glicerol-3-P e lançadeira do malato, conforme ilustra a figura 3. Uma vez formadas na matriz, as moléculas de NADH e FADH<sub>2</sub> podem ceder elétrons para os complexos I e II, suprindo a cadeia respiratória.



**Figura 3.** Lançadeira do malato (A) e lançadeira do glicerol-3-P (B) (Adaptado de Smith, Marks & Lieberman et al, 1996).

O fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Assim, cria-se um gradiente eletroquímico transmembrana, utilizado por um quinto complexo protéico, a ATP sintase, para a síntese de ATP. Dessa forma, a oxidação de substratos energéticos está acoplada ao processo de fosforilação do ADP, ou seja, quando o potencial de membrana é dissipado pelo fluxo de prótons a favor do gradiente eletroquímico, a energia liberada é utilizada pela ATP sintase, que atua como uma bomba de prótons ATP-dependente (Nelson e Cox, 2000).

#### 1.4.1. Estudo do consumo mitocondrial de oxigênio

A respiração mitocondrial pode ser estimada através da medida do consumo de O<sub>2</sub>. Apesar do fato de que essa medida determina diretamente apenas a velocidade de

uma única reação (transferência final de elétrons para  $O_2$ ), muitas informações sobre outros processos mitocondriais podem ser obtidos simplesmente pela adaptação das condições de incubação, de maneira que o processo cuja análise é desejada seja significativo na taxa de consumo final. Vários passos podem ser investigados, incluindo o transporte de substratos pela membrana mitocondrial, a atividade das desidrogenases, a atividade dos complexos da cadeia respiratória, o transporte de nucleotídeos de adenina pela membrana mitocondrial, a atividade da ATP sintase e a permeabilidade da membrana mitocondrial a  $H^+$  (Nicholls e Ferguson, 2001).

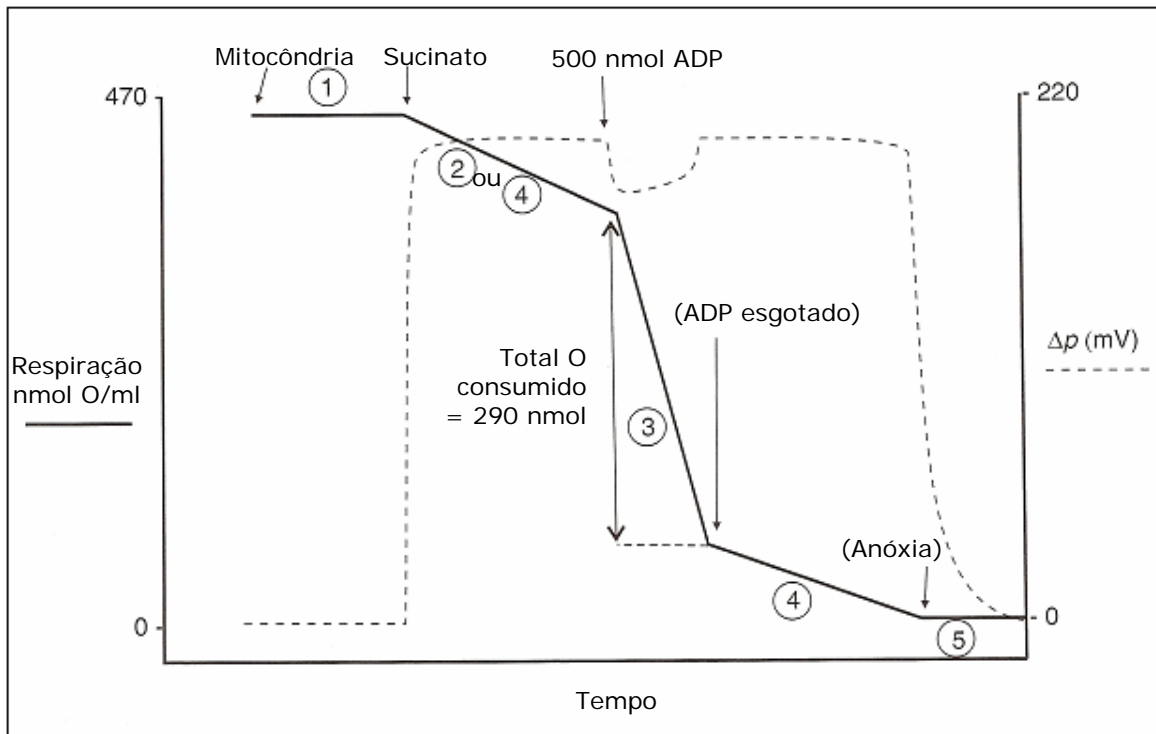
Experimentalmente, pode-se dividir a respiração mitocondrial em 5 estágios, conforme ilustra a figura 4. No entanto, apenas os parâmetros de estado III e estado IV continuam sendo comumente utilizados. O estado III é a taxa de consumo de oxigênio quando as mitocôndrias, em um meio contendo substrato oxidável, são expostas a ADP, estimulando o consumo de  $O_2$  e produzindo ATP (estado fosforilante). O estado IV reflete o consumo de  $O_2$  após as mitocôndrias já terem depletado todo o ADP disponível, reduzindo a taxa da respiração (estado não-fosforilante) (Nicholls e Ferguson, 2001).

A transdução de energia entre a cadeia respiratória e o gradiente eletroquímico de  $H^+$  é extremamente bem regulada, sendo que um pequeno desequilíbrio termodinâmico entre ambos pode resultar em um fluxo considerável de energia. Assim, quando o gradiente de prótons é dissipado pela ação da ATP sintase, devido à adição de ADP, há um desequilíbrio que estimula a transferência de elétrons pela cadeia respiratória e o consumo de oxigênio. Sendo assim, para que a ATP sintase esteja operante, são necessários dois fatores: alto potencial de membrana e disponibilidade de ADP (Nelson e Cox, 2000).

Nesse contexto, o acoplamento da respiração mitocondrial é definido como a capacidade da mitocôndria desencadear seu processo energético quando exposta ao ADP, ou seja, o acoplamento entre os processos de oxidação e de fosforilação. O aumento exacerbado da dissipação do gradiente eletroquímico de prótons no espaço mitocondrial intermembranas, em geral determinado pela lesão das membranas mitocondriais internas, desacopla o transporte de elétrons da síntese de ATP, resultando em uma taxa respiratória acelerada, com reduzida formação de ATP (Nicholls e Ferguson, 2001).

Baseando-se então na tendência de que mitocôndrias lesadas apresentam um vazamento de prótons do espaço intermembrana aumentado em relação a mitocôndrias

íntegras, pode-se avaliar a integridade e o acoplamento da preparação mitocondrial através de um parâmetro empírico chamado de razão de controle respiratório (RCR). O RCR é calculado pela razão do estado III, estado fosforilante (presença de ADP), pelo estado IV da respiração mitocondrial, estado não-fosforilante (ausência de ADP) (Nicholls e Ferguson, 2001).



**Figura 4.** Estados da respiração mitocondrial. (Adaptado de Nicholls e Ferguson, 2001).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Tendo em vista que os mecanismos pelos quais os principais metabólitos acumulados na DXB prejudicam o metabolismo energético cerebral não estão completamente esclarecidos, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito dos compostos que se acumulam em maiores concentrações na DXB (CIC, HIV e leucina), sobre os parâmetros respiratórios medidos pelo consumo de oxigênio, com auxílio de um eletrodo tipo Clark em mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos jovens, no intuito de verificar alterações nesses parâmetros que possam esclarecer os mecanismos responsáveis pelo comprometimento do sistema de produção de energia no SNC.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 1- Estudar os efeitos do CIC nas concentrações de 1 mM e 5 mM sobre os estados III, IV e o RCR em mitocôndrias de cérebro de ratos jovens.
- 2- Estudar os efeitos do HIV nas concentrações de 1 mM e 5 mM sobre os estados III, IV e o RCR em mitocôndrias de cérebro de ratos jovens.
- 3- Estudar os efeitos da leucina nas concentrações de 1 mM e 5 mM sobre os estados III, IV e o RCR em mitocôndrias de cérebro de ratos jovens.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais de experimentação**

Foram utilizados ratos Wistar de 30 dias de idade, de ambos os sexos, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Os ratos foram mantidos em ciclos de claro-escuro de  $\pm 12$  horas a uma temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os animais tinham livre acesso à água e ao alimento (ração Supra ou Purina, São Leopoldo, RS). A utilização dos animais seguiu um protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1985).

#### **3.2. Reagentes**

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau de pureza pró-análise (P.A.). O aminoácido leucina e os ácidos CIC e HIV foram sempre dissolvidos e diluídos na solução tampão utilizada na técnica no dia da realização dos ensaios e tiveram seu pH ajustado a 7,4.

Os reagentes utilizados foram:

$\alpha$ -cetogluturato – Sigma; ADP – Sigma; Albumina bovina – Sigma; Comassie – Sigma; Digitonina – Merck; DMSO – Nuclear; EGTA – Sigma; Glutamato – Sigma; HCl – Synth; HEPES – Sigma; KCl – Synth;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – Synth; KOH – Synth; Malato – Sigma; Manitol – Nuclear; MOPS – Sigma; Oligomicina – Sigma; Rotenona – Sigma; Sacarose – Synth; Succinato – Sigma.

#### **3.3. Equipamentos e outros materiais**

Agitador magnético Thermolyne modelo Maxi Mix Plus; Agitador de tubos Daigger;

Balança BEL Engineering; Balança analítica digital Sartorius; Banho-maria Fisatom; Destilador; Eletrodo de Clark; Freezer -20°C Prosdócimo modelo H5; Guilhotina; Ímã como agitador magnético; Material cirúrgico: tesouras, bisturis e espátulas; Membrana OD YSI; Micropipetas de volume regulável Gilson; Oxímetro 5100 YSI; Potenciômetro modelo Tec-2 (Tecnal); Seringas Hamilton; Tubos plásticos Eppendorffs; Vidraria: provetas, pipetas graduadas, potter de vidro, balões volumétricos, placas de Petri, pipetas Pasteur, tubos de ensaio, funis, béqueres, cubetas, cubas.

### **3.4. Preparações mitocondriais**

No dia do experimento, os animais foram sacrificados por decapitação, tiveram o cérebro separado e homogeneizado com homogeneizador manual em tampão contendo manitol 0,23 M, sacarose 0,075 M, EGTA 1 mM, BSA 0,1% e HEPES 4,58 mM (pH 7,4). O homogeneizado foi então centrifugado a 2000 g durante 3 minutos e o sobrenadante foi separado. Após, se ressuspendeu o sedimento e uma segunda centrifugação, semelhante à anterior, foi realizada. Os sobrenadantes foram reunidos para uma terceira centrifugação de 12000 g durante 8 minutos, obtendo-se a fração mitocondrial no sedimento. Este sedimento foi ressuspensão no mesmo tampão e foi adicionada uma quantidade de digitonina 10% para uma quarta centrifugação a 12000 g durante 10 minutos. Na quinta e última centrifugação, o sedimento resultante da centrifugação anterior foi ressuspensão em tampão contendo manitol 0,23 M, sacarose 0,075 M, BSA 0,1% e HEPES 4,58 mM (pH 7,4) e centrifugado a 12000 g durante 10 minutos. Finalmente, a fração mitocondrial resultante foi ressuspensa em 300 µL do mesmo tampão utilizado na última centrifugação, encontrando-se em torno de 20 mg proteína/mL. A fração mitocondrial foi mantida em gelo até o momento de seu uso. Os experimentos foram sempre realizados no mesmo dia da preparação mitocondrial (Maciel *et al.*, 2004).

### **3.5. Avaliação dos parâmetros respiratórios**

A taxa de consumo de oxigênio foi determinada utilizando um eletrodo de oxigênio tipo Clark em uma cuba termostaticamente controlada (37°C) e magneticamente agitada

(Cassina e Radi, 1996). O ensaio foi realizado com 0,75 mg/mL de proteína mitocondrial, quando glutamato/malato (2,5 mM cada) ou  $\alpha$ -cetoglutarato (5 mM) foram utilizados como substratos para estimular o fluxo de elétrons através do complexo I (produção de NADH), ou 0,5 mg/mL de proteína, quando succinato (5 mM) foi utilizado como substrato para estimular o fluxo de elétrons através do complexo II (produção de FADH<sub>2</sub>), sendo todos os substratos preparados em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM (pH 7,4). Nos experimentos onde o succinato foi o substrato respiratório utilizou-se rotenona (5  $\mu$ M), que é um inibidor clássico do complexo I. O tampão utilizado para a realização da técnica continha sacarose 0,3 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, EGTA 1 mM, BSA 0,1% e MOPS 5,26 mM. O estado III foi estimulado adicionando-se ADP (1 mM) preparado em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM (pH 7.4), enquanto que o estado IV foi obtido pela adição de oligomicina (1  $\mu$ g/mL) preparado em DMSO. A razão de controle respiratório (RCR - estado III/estado IV) foi determinada no final de cada ensaio. Os estados III, IV e o RCR foram calculados de acordo com Estabrook (1967) e as preparações mitocondriais utilizadas apenas quando o RCR era superior a 12, quando glutamato/malato foi o substrato, e 3, quando succinato ou  $\alpha$ -cetoglutarato foram os substratos, representando mitocôndrias viáveis e funcionais.

### **3.6. Determinação do conteúdo protéico**

O conteúdo protéico foi determinado pelo método de Bradford *et al.* (1976) utilizando albumina bovina como padrão.

### **3.7. Análise estatística**

Os resultados foram analisados usando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 16,0 em um computador PC compatível. Para os experimentos, utilizou-se análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de raios múltiplos de Duncan, quando o valor de F foi significativo. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

## 4. RESULTADOS

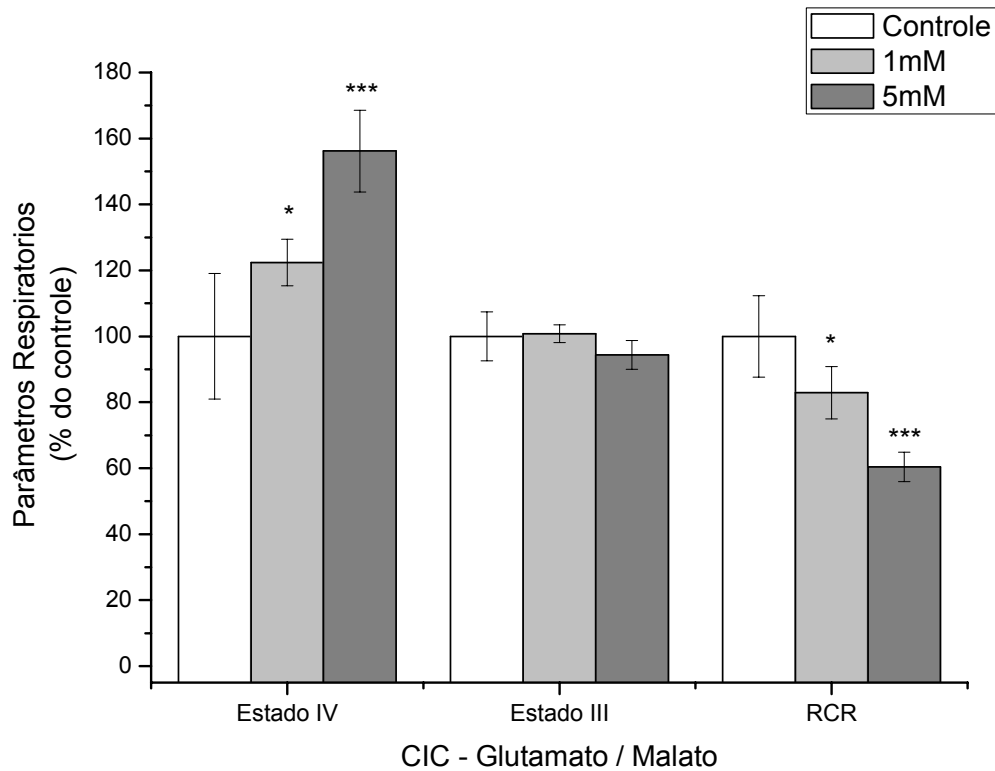
### 4.1. Efeito *in vitro* do ácido $\alpha$ -cetoisocapróico (CIC) sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 5 mostra o efeito do CIC sobre parâmetros respiratórios utilizando glutamato/malato como substrato. Foi observado que o CIC, nas concentrações de 1 mM e 5 mM, estimulou significativamente o estado IV [ $F_{(2,12)} = 21,169$ ;  $P < 0,001$ ] e diminuiu significativamente o RCR [ $F_{(2,12)} = 25,151$ ;  $P < 0,001$ ], sem alterar significativamente o estado III [ $F_{(2,12)} = 2,245$ ;  $P > 0,05$ ].

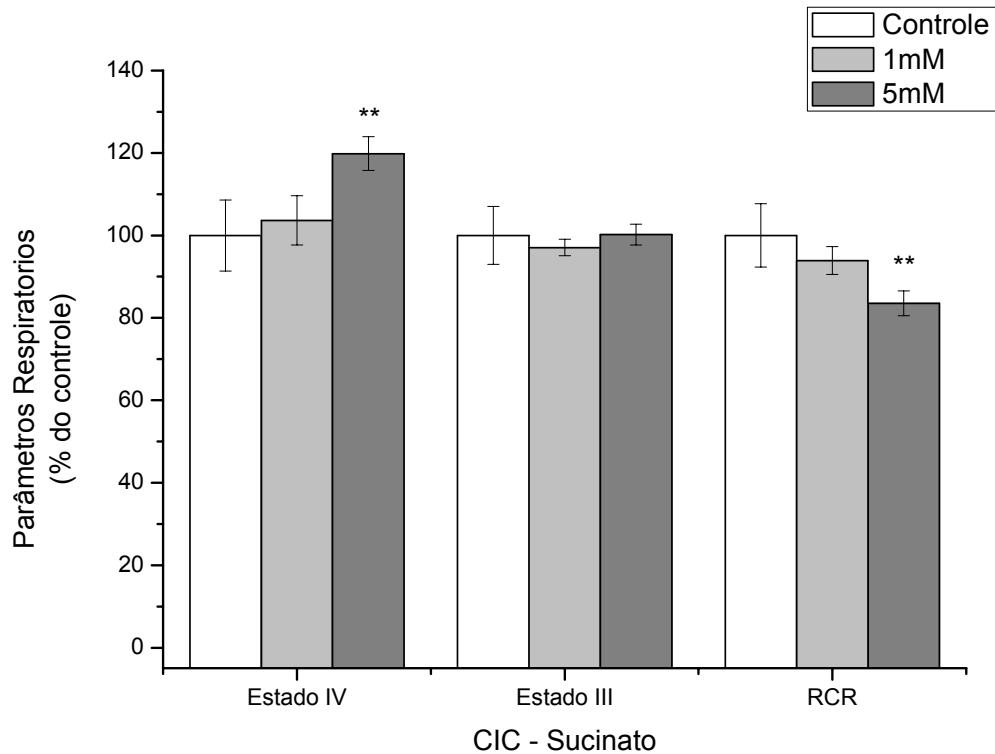
Quando succinato foi utilizado como substrato, o CIC, na concentração de 5 mM, estimulou significativamente o estado IV [ $F_{(2,9)} = 10,543$ ;  $P < 0,01$ ] e diminuiu significativamente o RCR [ $F_{(2,9)} = 10,507$ ;  $P < 0,01$ ], sem alterar significativamente o estado III [ $F_{(2,9)} = 0,628$ ;  $P > 0,05$ ] (Figura 6).

A Figura 7 demonstra que o CIC, na concentração de 5 mM, estimulou significativamente o estado IV [ $F_{(2,9)} = 8,185$ ;  $P < 0,01$ ] e diminuiu significativamente o RCR [ $F_{(2,9)} = 18,022$ ;  $P < 0,001$ ] e o estado III [ $F_{(2,9)} = 30,045$ ;  $P < 0,001$ ], quando  $\alpha$ -cetogluturato foi utilizado como substrato.

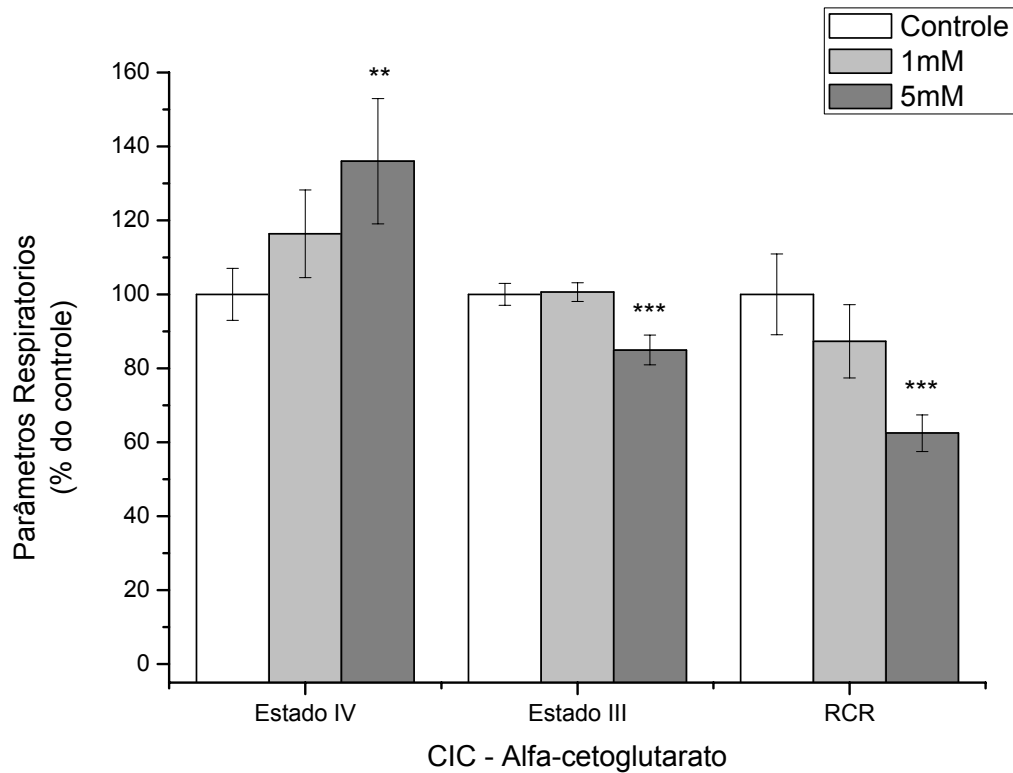




**Figura 5.** Efeito *in vitro* do ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico (CIC) sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando glutamato/malato como substrato. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=5) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle estado III:  $80,23 \pm 5,92$  nmol  $O_2$  .  $min^{-1}$  . mg proteína $^{-1}$ ; Controle estado III:  $6,01 \pm 1,15$  nmol  $O_2$  .  $min^{-1}$  . mg proteína $^{-1}$ ; Controle RCR:  $13,69 \pm 1,69$  nmol  $O_2$  .  $min^{-1}$  . mg proteína $^{-1}$ ). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (\*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001, comparados ao controle).



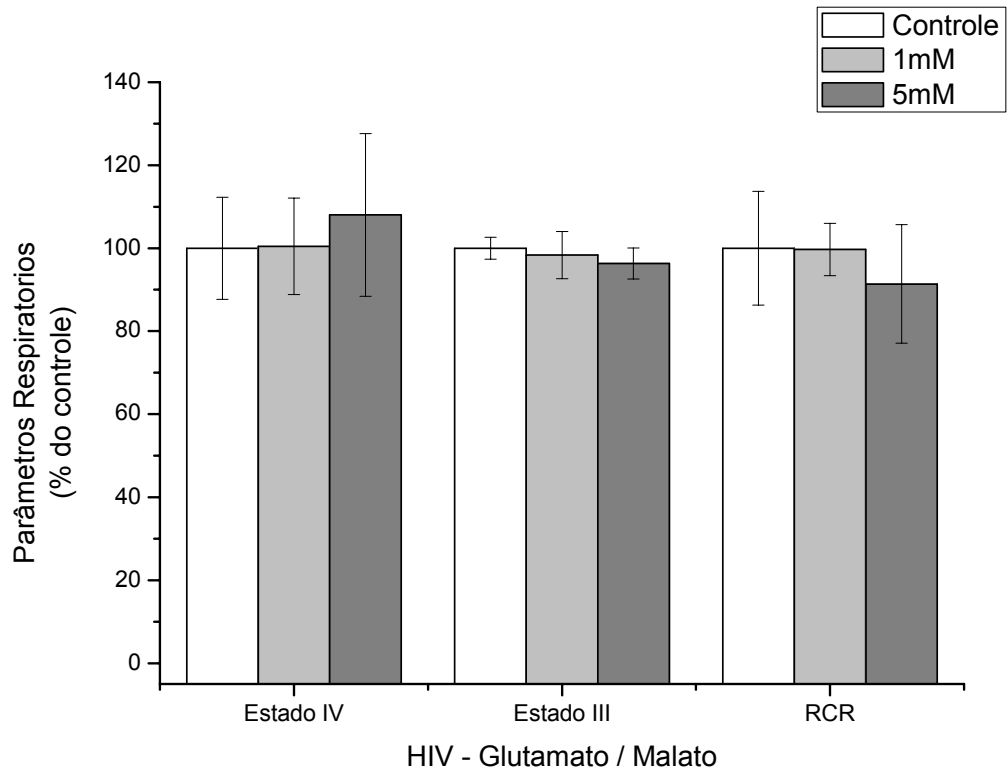
**Figura 6.** Efeito *in vitro* do ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico (CIC) sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando succinato como substrato. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=4) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle estado III:  $91,14 \pm 6,45$  nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteína $^{-1}$ ; Controle estado IV:  $16,92 \pm 1,46$  nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteína $^{-1}$ ; Controle RCR:  $5,41 \pm 0,42$  nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteína $^{-1}$ ). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (\*\*P < 0.01, comparados ao controle).



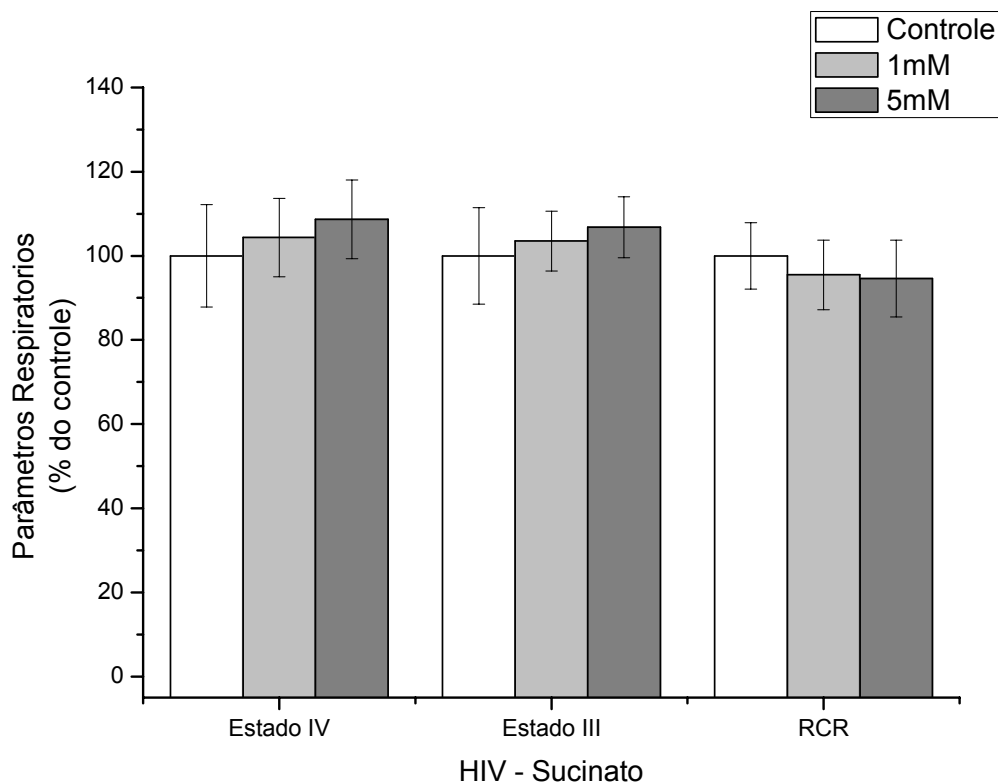
**Figura 7.** Efeito *in vitro* do ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico (CIC) sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando  $\alpha$ -cetoglutarato como substrato. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=4) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle estado III:  $34,46 \pm 1,01$  nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteína $^{-1}$ ; Controle estado IV:  $8,85 \pm 0,62$  nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteína $^{-1}$ ; Controle RCR:  $3,93 \pm 0,43$  nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteína $^{-1}$ ). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (\*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001, comparados ao controle).

#### **4.2. Efeito *in vitro* do ácido $\alpha$ -hidroxiisovalérico (HIV) sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens**

As figuras 8 e 9 mostram os resultados do HIV utilizando glutamato/malato e succinato como substrato, respectivamente. Foi observado que o HIV não alterou significativamente nenhum parâmetro testado tanto com glutamato/malato (estado IV [ $F_{(2,9)} = 0,364$ ;  $P > 0,05$ ]; estado III [ $F_{(2,9)} = 0,77$ ;  $P > 0,05$ ]; RCR [ $F_{(2,9)} = 0,667$ ;  $P > 0,05$ ]), como com succinato como substrato (estado IV [ $F_{(2,9)} = 0,699$ ;  $P > 0,05$ ]; estado III [ $F_{(2,9)} = 0,589$ ;  $P > 0,05$ ]; RCR [ $F_{(2,9)} = 0,47$ ;  $P > 0,05$ ]).



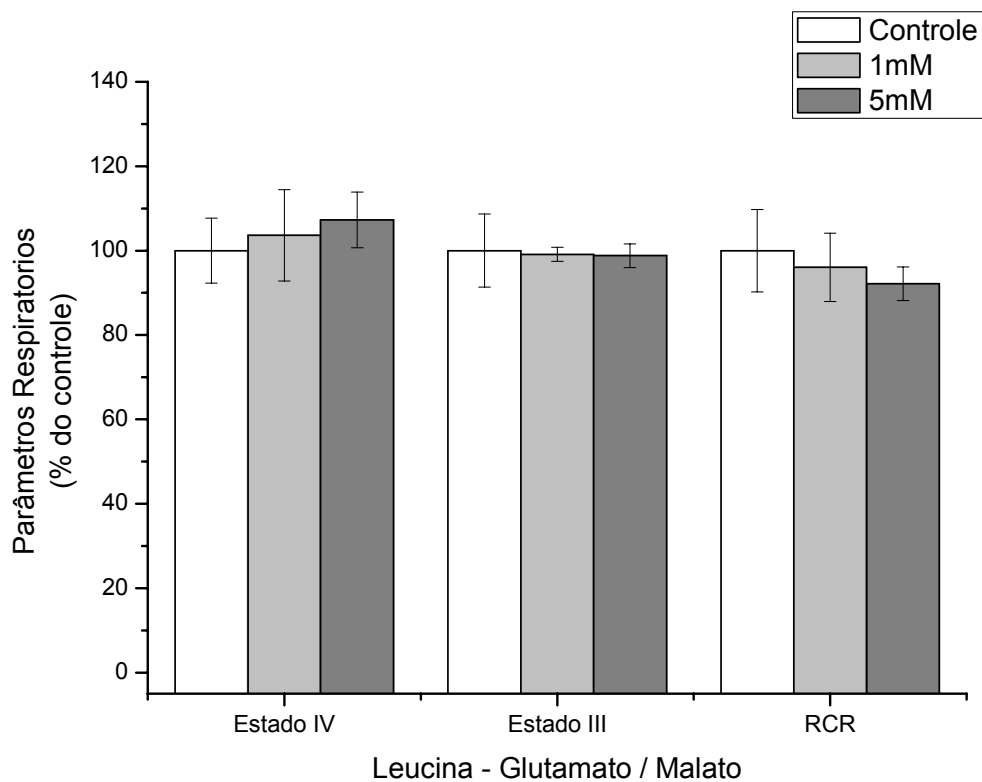
**Figura 8.** Efeito *in vitro* do ácido  $\alpha$ -hidroxiisovalérico (HIV) sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando glutamato/malato como substrato. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle estado III:  $70,76 \pm 1,86$  nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteína $^{-1}$ ; Controle estado IV:  $4,32 \pm 0,53$  nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteína $^{-1}$ ; Controle RCR:  $16,62 \pm 2,28$  nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteína $^{-1}$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA).



**Figura 9.** Efeito *in vitro* do ácido  $\alpha$ -hidroxiisovalérico (HIV) sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando succinato como substrato. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=4) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle estado III:  $94,46 \pm 10,83$  nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteína $^{-1}$ ; Controle estado IV:  $18,03 \pm 2,2$  nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteína $^{-1}$ ; Controle RCR:  $5,24 \pm 0,17$  nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteína $^{-1}$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA).

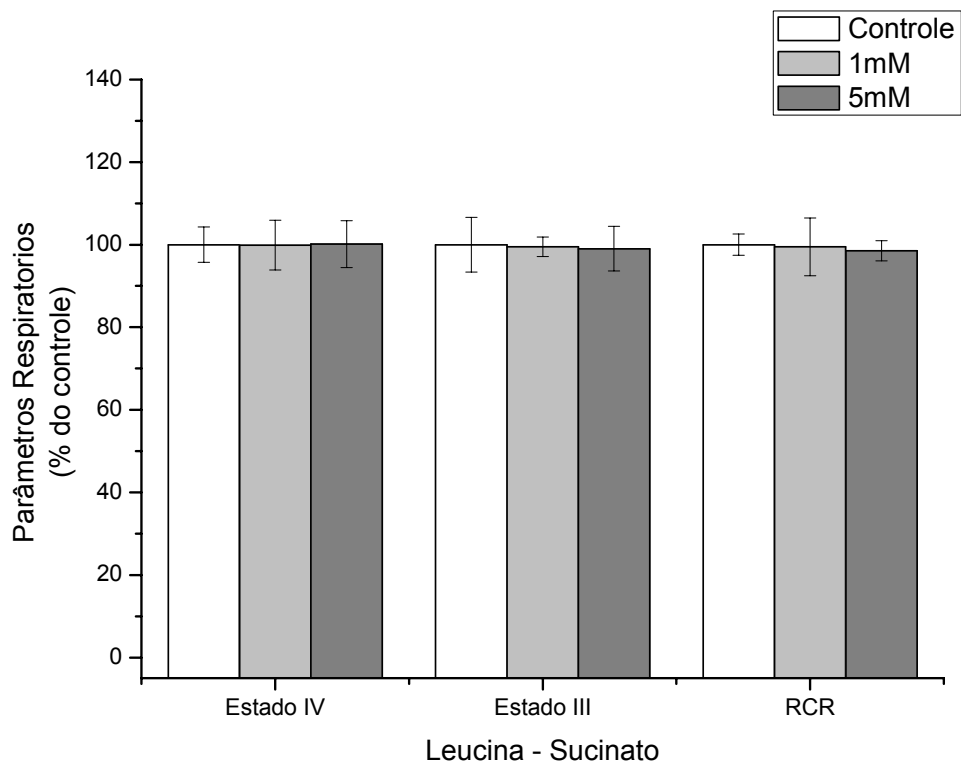
#### **4.3. Efeito *in vitro* da leucina sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens**

As figuras 10 e 11 mostram os resultados da leucina utilizando glutamato/malato e succinato como substrato, respectivamente. Foi observado que a leucina não alterou significativamente nenhum parâmetro testado tanto com glutamato/malato (estado IV [ $F_{(2,9)} = 0,718$ ;  $P > 0,05$ ]; estado III [ $F_{(2,9)} = 0,054$ ;  $P > 0,05$ ]; RCR [ $F_{(2,9)} = 1,040$ ;  $P > 0,05$ ]), como com succinato sendo o substrato (estado IV [ $F_{(2,9)} = 0,002$ ;  $P > 0,05$ ]; estado III [ $F_{(2,9)} = 0,036$ ;  $P > 0,05$ ]; RCR [ $F_{(2,9)} = 0,114$ ;  $P > 0,05$ ]).



**Figura 10.** Efeito *in vitro* da leucina sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando glutamato/malato como substrato. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle estado III:  $78,7 \pm 6,8$  nmol  $O_2$  .  $min^{-1}$  . mg proteína $^{-1}$ ; Controle estado IV:  $4,62 \pm 0,36$  nmol  $O_2$  .  $min^{-1}$  . mg proteína $^{-1}$ ; Controle RCR:  $17,11 \pm 1,67$  nmol  $O_2$  .  $min^{-1}$  . mg proteína $^{-1}$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA).





**Figura 11.** Efeito *in vitro* da leucina sobre o estado IV, estado III e RCR utilizando succinato como substrato. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=4) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle estado III:  $89,68 \pm 5,97$  nmol  $O_2$  .  $min^{-1}$  . mg proteína $^{-1}$ ; Controle estado IV:  $16,57 \pm 0,7$  nmol  $O_2$  .  $min^{-1}$  . mg proteína $^{-1}$ ; Controle RCR:  $5,43 \pm 0,14$  nmol  $O_2$  .  $min^{-1}$  . mg proteína $^{-1}$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA).

## 5. DISCUSSÃO

A Doença do Xarope do Bordo (DXB) é um erro inato do metabolismo caracterizado pela deficiência na atividade do complexo desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (CDCCR) provocando um acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), juntamente com seus respectivos cetoácidos de cadeia ramificada (CCR) e hidroxíácidos de cadeia ramificada (HCR), sendo a leucina, o ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico (CIC) e o ácido  $\alpha$ -hidroxiisovalérico (HIV) os metabólitos acumulados em maior quantidade nesta doença. Os pacientes afetados apresentam sintomas predominantemente neurológicos, como letargia, hipotonia e hipertonia, convulsões e coma, além de cetose, hipoglicemia e recusa alimentar. A intensidade destes sintomas varia de acordo com a forma da doença apresentada pelos pacientes, sendo a clássica a mais agressiva, apresentando um quadro neonatal de encefalopatia, seguida de morte em alguns casos.

Os mecanismos tóxicos dos ACR e CCR sobre o cérebro são pouco conhecidos, mas a leucina e o CIC parecem ser os metabólitos mais tóxicos, pois seu acúmulo durante as crises metabólicas está relacionado com o aparecimento de sintomas neurológicos severos.

Várias publicações procuram explicar a toxicidade dos CCR e ACR. Neste particular foi demonstrado que o CIC e o CIV inibem competitivamente a glutamato descarboxilase em homogeneizados de cérebro de rato (Tashian, em 1961), levando a uma diminuição da quantidade do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) (Dodd et al, 1992). Foi também observado que esses CCR inibem a oxidação da glicose e a síntese de acetilcolina, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos em fatias de cérebro de ratos (Gibson e Blass, 1976), bem como a oxidação do piruvato o transporte mitocondrial de piruvato, a atividade do complexo piruvato desidrogenase e a atividade da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (Gibson e Blass, 1976). Observou-se também o excesso de leucina na dieta provoca uma diminuição da serotonina cerebral (Yuwiler e Geller, 1965).

Por outro lado alguns estudos demonstraram que a elevação sérica de leucina e de CIC no espaço extracelular altera a concentração no SNC dos aminoácidos transportados pelo transportador dos aminoácidos neutros de cadeia longa (sistema L)

que incluem a metionina, valina, isoleucina, triptofânio, tirosina, fenilalanina e glutamina, levando a uma diminuição da biossíntese celular de neurotransmissores cerebrais como as catecolaminas e a serotonina (Zielke et al, 1996; Huang et al, 1996).

Entre os vários mecanismos propostos para explicar o dano neurológico dos pacientes afetados pela DXB está a disfunção mitocondrial, provocando uma alteração no metabolismo energético. Estudos *in vitro* de metabolismo energético cerebral apontam para um efeito inibitório dos CCR sobre a produção de CO<sub>2</sub> e a atividade do complexo I-III (50-60 % de diminuição) da cadeia respiratória, embora não tenham sido demonstrados efeitos na liberação de lactato, utilização de glicose ou ainda na atividade dos outros complexos da cadeia respiratória; como a atividade do complexo III não foi afetada presume-se que o efeito inibitório encontrado na atividade do complexo I-III foi causado por um bloqueio na atividade do complexo I pelos CCR (Sgaravatti et al., 2003). Ribeiro e colaboradores (2007) demonstraram que os ACR produziram um efeito inibitório *in vitro* sobre a produção de CO<sub>2</sub>, bem como sobre a cadeia respiratória, inibindo os complexos II-III, III e IV. Foi observado também que os ACR aumentaram a captação de glicose e não alteraram a atividade da piruvato desidrogenase e de enzimas chaves do ciclo do ácido cítrico. Em relação aos vários metabólitos acumulados na DXB, a leucina e o CIC têm sido considerados os principais agentes neurotóxicos nesta doença, visto que quando suas concentrações aumentam nos tecidos dos indivíduos afetados, os mesmos pioram sintomaticamente, apresentando sintomas neurológicos graves.

Com o objetivo de melhor esclarecer os mecanismos pelos quais os metabólitos que mais se acumulam na DXB (CIC, HIV e leucina) comprometem as funções mitocondriais, o presente estudo avaliou o efeito destes metabólitos sobre parâmetros respiratórios (estado III, estado IV e RCR) em preparações mitocondriais através da medida do consumo de oxigênio.

Em um primeiro momento, avaliamos o efeito do CIC sobre os parâmetros respiratórios estado III, estado IV e RCR nas concentrações de 1 mM e 5 mM utilizando glutamato/malato, succinato e  $\alpha$ -cetoglutarato como substratos. Foi observado que o CIC estimulou o estado IV e diminuiu o RCR significativamente em ambas as concentrações utilizadas, sem alterar o estado III. Utilizando succinato como substrato, o CIC apresentou os mesmos resultados, no entanto, somente na concentração de 5 mM, demonstrando um efeito mais brando com este substrato. Finalmente, quando o  $\alpha$ -cetoglutarato foi utilizado como substrato, o CIC significativamente estimulou o estado IV, diminuiu o estado III e o

RCR na concentração de 5 mM. Esses resultados sugerem que o CIC age provavelmente como um desacoplador da fosforilação oxidativa, sendo que as alterações dos parâmetros analisados foram mais relevantes quando a respiração mitocondrial foi estimulada por substratos ligados a NADH (glutamato/malato e  $\alpha$ -cetogluturato) que estimulam o fluxo de elétrons através do complexo I. A diminuição do estado III somente observada quando  $\alpha$ -cetogluturato foi utilizado como substrato pode ter ocorrido devido a uma inibição pelo CIC da atividade do complexo  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase demonstrada anteriormente (Gibson e Blass, 1976).

A inibição de 50-60% da atividade do complexo I pelo CIC demonstrada por Sgaravatti e colaboradores (2003) não foi refletida na respiração mitocondrial quando foi utilizado glutamato/malato como substrato. No presente estudo utilizaram-se preparações mitocondriais de ratos a fim de avaliar os parâmetros respiratórios, enquanto Sgaravatti e colaboradores utilizaram homogeneizados de córtex cerebral de ratos. Além disso, Davey e Clark (1996) demonstraram que é necessária uma inibição de mais de 70% na atividade do complexo I para ocorrerem modificações significativas na respiração mitocondrial, o que explicaria por que não foram verificadas alterações no consumo de oxigênio durante a avaliação do estado III em mitocôndrias expostas ao CIC.

O passo seguinte foi avaliar o efeito do HIV e da leucina nas concentrações de 1 mM e 5 mM sobre os mesmos parâmetros respiratórios utilizando glutamato/malato e succinato como substratos. Observamos que tanto o HIV como a leucina, que estão elevados de forma semelhante que o CIC nos pacientes afetados, não provocaram alteração significativa sobre os parâmetros respiratórios testados, sugerindo que estes metabólitos não são capazes de alterar o consumo de oxigênio pela mitocôndria e que os efeitos causados pelo CIC foram seletivos. Deve-se também enfatizar que nas condições experimentais que este estudo foi realizado, insignificantes quantidades de leucina se transformam no seu derivado CCR, o CIC (resultados não mostrados).

Tais resultados, aliados a achados anteriores mostrando redução do metabolismo energético e alterações de parâmetros bioquímicos fundamentais para o desenvolvimento e o funcionamento normais do SNC causados pelos metabólitos acumulados na doença (Sgaravatti et al., 2003; Ribeiro et al., 2007), indicam que o CIC é um dos principais metabólitos neurotóxicos na DXB. É, portanto, possível que vários efeitos deletérios, modificando mecanismos essenciais para a célula tais como uma alteração da bioenergética, possam interagir provocando lesão e morte nas células neurais.

## 6. CONCLUSÕES

1. O CIC estimula o estado IV da respiração celular e diminui o RCR significativamente, sem alterar o estado III, com glutamato/malato e succinato como substratos respiratórios em mitocôndrias isoladas de cérebro de cérebro jovens.

2. O CIC estimula o estado IV da respiração celular, diminui o RCR e inibe o estado III significativamente utilizando  $\alpha$ -cetoglutarato como substrato respiratório em mitocôndrias isoladas de cérebro de cérebro jovens.

3. O HIV, bem como a leucina, não altera nenhum parâmetro respiratório testado.

4. Tais resultados sugerem que o CIC interfere na homeostase energética celular.

## 7. PERSPECTIVAS

1. Verificar o efeito do CIC sobre o potencial de membrana em preparações mitocondriais de cérebro de ratos para determinar se este metabólito realmente age como um desacoplador.

2. Verificar o efeito do CIC sobre a razão ADP/O em preparações mitocondriais de cérebro de ratos para determinar se este metabólito prejudica a produção de ATP.

3. Estudar o efeito dos outros metabólitos acumulados na DXB sobre os mesmos parâmetros respiratórios avaliados neste trabalho.

## 8. REFERÊNCIAS

ABELES, R.H.; FREY, P.A.; JENKS, W.P. *Biochemistry*. London: Jones and Bartlett, p. 603-632, 1992.

ARAÚJO, P.; WASSERMANN, G.F.; TALLINI, K.; FURLANETTO, V.; VARGAS, C.R.; WANNMACHER, C.M.; DUTRA-FILHO, C.S., WYSE, A.T.; WAJNER, M. Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochemistry International*, v. 38, n. 6, p. 529-537, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRIDI, R.; ARALDI, J.; SGARBI, M.B.; TESTA, C.G.; DURIGON, K.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 21, n. 6, p. 327-332, 2003.

CASSINA, A.; RADI R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxyntirite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys*, v. 328, n. 2, p. 309-316, 1996.

CHALMERS, R.A.; LAWSON, A.M. *Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias*. 1.ed. London: Chapman and Hall, 1982.

CHUANG, D.T. Maple syrup urine disease: it has come a long way. *Journal of Pediatrics*, v. 132, n. 3, p. S17-S23, 1998.

CHUANG, D.T.; SHIH, V.E. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (Eds). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8.ed. New York: McGraw-Hill, p. 1971, 2001.

COITINHO, A.S.; DE MELLO, C.F.; LIMA, T.T.; DE BASTIANI, J.; FIGHERA, M.R.; WAJNER, M. Pharmacological evidence that alpha-ketoisovaleric acid induces convulsions through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *Brain Research*, v. 894, n. 1, p. 68-73, 2001.

COOK, K.G.; LAWSON, R.; YEAMAN, S.J. Multi-site phosphorylation of bovine kidney branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex. *FEBS Letters*, v. 157, n. 1, p. 59, 1983.

COOK, K.G.; LAWSON, R.; YEAMAN, S.J.; AITKEN, A. Amino acid sequence at the major phosphorylation site on bovine kidney branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex. *FEBS Letters*, v. 164, n. 1, p. 47, 1983a.

CORNEJO, V. e RAIMAN, E.M. Errores inatos del metabolismo de los aminoacidos. In: COLOMBO, C.; CORNEJO, V. e RAIMAN, E. (Eds). *Errores inatos en el metabolismo del niño*. 2.ed. Santiago de Chile: Editorial Universitaria, p. 92-8, 2003.

COUEÉ, I.; TIPTON, K.F. Activation of glutamate dehydrogenase by L-leucine. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 995, n. 1, p. 97-101, 1989.

DANNER, D.J., LEMMON, S.K., BESHARSE, J.C., ELSAS, L.J. Purification and characterization of branched chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 254, n. 12, p. 5522-5526, 1979.

DANNER, D.J.; ELSAS, L.J. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (Eds). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 6.ed. New York: McGraw-Hill, p. 671-692, 1989.

DAVEY, G.P.; CLARK, J.B. Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. *Journal of Neurochemistry*, v. 66, n. 4, p. 1617-1624, 1996.

DEL RIO, R.M. *Aminoacidopatias congenitas y sus repercusiones en el desarrollo del SNC*. Madrid, 1962.

DI DONATO, S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 23, n. 3, p. 247-63, 2000.

DODD, P.R.; WILLIAMS, S.H.; GUNDLACH, A.L.; HARPER, P.A.W.; HEALY, P.J.; DENNIS, J.A.; JOHNSTON, G.A.R. Glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid neurotransmitter systems in the acute phase of maple syrup urine disease and citrullinemia encephalopathies in newborn calves. *Journal of Neurochemistry*, v. 59, n. 2, p. 582-590, 1992.

ERECINSKA, M.; NELSON, D. Activation of glutamate dehydrogenase by leucine and its nonmetabolizable analogue in rat brain synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*, v.54, n. 4, p. 1335-1343, 1990.

ESTABROOK, R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol*, v. 10, p. 41-47, 1967.

FISCHER, M.H.; GERRITSEN, T. Biochemical studies on a variant of branched chain ketoaciduria in a 19-year-old female. *Pediatrics*, v. 48, n. 5, p. 795, 1971.

FONTELLA, F.U.; GASSE, E.; PULRONIK, V.; WANNMACHER, C.M.; KLEIN, A.B.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metabolic Brain Disease*, v. 17, n. 1, p. 47-54, 2002.

FUNCHAL, C.; DE LIMA PELAEZ, P.; LOUREIRO, S.O.; VIVIAN. L.; DALL BELLO PESSUTO, F.; DE ALMEIDA, L.M.; TCHERNIN WOFCHUK, S.; WAJNER, M.; PESSOA PUREUR, R. Alpha-Ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediate filaments in postnatal rat cortical slices through ionotropic glutamatergic receptors. *Brain Research Developmental Brain Research*, v. 139, n. 2, p. 267-276, 2002.

FUNCHAL, C.; ROSA, A.M.; WAJNER, M.; WOFCHUCK, S.; PUREUR, R.P. Reduction of glutamate uptake into cerebral cortex of developing rats by the branched-chain alpha-keto



acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochemical Research*, v. 29, n. 4, p. 747-753, 2004.

FUNCHAL, C.; DALL BELLO PESSUTTO, F.; DE ALMEIDA, L.M.; DE LIMA PELAEZ, P.; LOUREIRO, S.O.; VIVIAN, L.; WAJNER, M.; PESSOA-PUREUR, R. Alpha-keto-beta-methylvaleric acid increases the in vitro phosphorylation of intermediate filaments in cerebral cortex of young rats through the gabaergic system. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 217, n. 1, p. 17-24, 2004a.

GIBSON, G.E.; BLASS, J.P. Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohydrate utilization by maple syrup urine disease metabolites. *Journal of Neurochemistry*, v. 26, n. 6, p. 1073-1078, 1976.

GONZALES-RIOS, M.D.C.; CHUANG, D.T.; COX, R.P.; SCHMIDT, K.; KNOPF, K.; PACKMAN, S. A distinct variant of intermediate maple syrup urine disease. *Clinical Genetics*, v. 27, n. 2, p. 153, 1985.

HUANG, Y.; ZIELKE, H.R.; TILDON, J.T.; ZIELKE, C.L.; BAAB, P.J. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: leucine infusion. *Developmental Neuroscience*, v. 18, n. 5-6, p. 415-419, 1996.

JAN, W.; ZIMMERMAN, R.A.; WANG, Z.J.; BERRY, G.T.; KAPLAN, P.B.; KAYE, E.M. MR diffusion imaging and MR spectroscopy of maple syrup urine disease during acute metabolic decompensation. *Neuroradiology*, v. 45, n. 6, p. 393-399, 2003.

JOUVET, P.; KOZMA, M.; MEHMET, H. Primary human fibroblasts from a maple syrup urine disease patient undergo apoptosis following exposure to physiological concentrations of branched chain amino acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 926, p. 116-121, 2000.

KLEIJER, W.J.; WORSMAN, D.; MANCINI, G.M.; FOIS, A.; BOUE, J. First-trimester diagnosis of maple syrup urine disease on intact chorionic villi. *New England Journal of Medicine*, v. 313, n. 25, p. 1608, 1985.

LAU, K.S.; PHILIPS, C.E.; RANDLE, P.J. Multi-site phosphorylation in ox-kidney branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex. *FEBS Letters*, v. 160, n. 1-2, p. 149, 1983.

MACIEL, E.N.; KOWALTOWSKI, A.J.; SCHWALM, F.D.; RODRIGUES, J.M.; SOUZA, D.O.; VERCESI, A.E.; WAJNER, M.; CASTILHO, R.F. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by  $Ca^{2+}$  and respiratory chain complex II inhibition. *Journal of Neurochemistry*, v. 90, p. 1025-1035, 2004.

MENKES, J.H.; HURST, P.L.; CRAIG, J.M. A new syndrome: Progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics*, v. 14, n. 5, p. 462, 1954.

MENKES, J.H. Maple syrup urine disease. Isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics*, v. 23, n. 2, p. 348, 1959.

MULLER, H.; BICKEL, H.; FEIST, D.; LUTZ, P. Maple syrup urine disease with an intermittent relatively benign course. *Verlauf. Deutsche Medizinische Wochenschrift*, v. 96, n. 40, p. 1552, 1971.

NAYLOR, E.W. Newborn screening for maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: *Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism*. BICKEL, H.; GUTHRIE, R.; HAMMERSEN, G. (Eds). Berlin: Springer-Verlag, p. 19, 1980.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger, Principles of biochemistry*. 3.ed. New York: Worth Publishers, p. 623-721, 2000.

NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. *Bioenergetics*. 4.ed. London: Academic Press, p. 57-87, 2001.

NOBUKUNI, Y.; MITSUBUCHI, H.; OHTA, K.; AKABOSHI, I.; INDO, Y.; ENDO, F.; MATSUDA, I. Molecular diagnosis of maple syrup urine disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 15, n. 5, p. 827-833, 1992.

PANTEN, U.; KRIGSTEIN, W.V.; POSER, W.; SCHONBORN, J.; HASSELBLATT, A. Effects of L-leucine and  $\alpha$ -ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS letters*, v. 20, n. 2, p. 225, 1972.

PARRELLA, T.; SURREY, A.; IOLASCON, A.; SARTORE, M.; HEIDENREICH, R.; DIAMOND, G.; PONZONE, A.; GUARDAMAGNA, O.; BURLINA, A.B.; CERONE, R.; PARINI, R.; DIONISI-VICI, C.; RAPPAPORT, E.; FORTINA, P. Maple syrup urine disease (MSUD): screening for known mutations in italian patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 17, n. 6, p. 652-660, 1994.

PAXTON, R.; KUNTZ, M.; HARRIS, R.A. Phosphorylation sites and inactivation of branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase isolated from rat heart, bovine kidney, and rabbit liver, kidney, heart, brain and skeletal muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 244, n. 1, p. 187, 1986.

PEINEMANN, F.; DANNER, D.J. Maple syrup urine disease 1954-1993. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 17, n. 1, p. 3-15, 1994.

PESSOA-PUREUR, R.; FUNCHAL, C.; DE LIMA PELAEZ, C.; VIVIAN, L.; OLIVEIRA LOUREIRO, S.; DE FREITAS MIRANDA, R.; WAJNER, M. Effect of the branched-chain alpha-ketoacids accumulating in maple syrup urine disease on the high molecular weight neurofilament subunit (NF-H) in rat cerebral cortex. *Metabolic Brain Disease*, v. 17, n. 2, p. 65-75, 2002.

PILLA, C.; CARDOZO, R.F.; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochemical Research*, v. 28, n. 5, p. 675-679, 2003.

REED, L.J.; HACKERT, M.L. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 265, n. 16, p. 8971-8974, 1990.

REIS, M.; FARAGE, M.; WOLOSKER, H. Chloride-dependent inhibition of vesicular glutamate uptake by alpha-keto acids accumulated in maple syrup urine disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1475, n. 2, p. 114-118, 2000.

RIBEIRO, C.A.; SGARAVATTI, A.M.; ROSA, R.B.; SCHUCK, P.F.; GRANDO, V.; SCHMIDT, A.L.; FERREIRA, G.C.; PERRY, M.L.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M. Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochemistry Research*, v. 33, n. 1, p. 114-24, 2007.

ROGERS, Q.R.; SPOLTER, P.D.; HARPER, A.E. Effect of leucine-isoleucine antagonism on plasma amino acid pattern of rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 97, p. 497-504, 1962.

SCHADEWALDT, P. L.; WENDEL, U. Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *European Journal of Pediatrics*, v. 156, suppl. 1, p. S62-S66, 1997.

SCHONBERGER, S.; SCHWEIGER, B.; SCHWAHN, B.; SCHWARZ, M.; WENDEL, U. Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 82, n. 1, p. 69-75, 2004.

SCRIVER, C.R.; BEAUDET A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8.ed. New York: McGraw-Hill Inc, p. 3-45, 2001.

SGARAVATTI, A.M.; ROSA, R.B.; SCHUCK, P.F.; RIBEIRO, C.A.; WANNMACHER, C.M.; WYSE, A.T.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M. Inhibition of brain energy metabolism by the alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1639, n. 3, p. 232-238, 2003.

SHIGEMATSU, Y.; KIKUCHI, K.; MOMOI, T.; SUDO, M.; KIKAWA, Y.; NOSAKA, K.; KURIYAMA, M.; HARUKI, S.; SANADA, K.; HAMANO, N. et al. Organic acids and branched-chain amino acids in body fluids before and after multiple exchange transfusions in maple syrup urine disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 6, n. 4, p. 183-189, 1983.

SMITH, C.M.; MARKS, A.D.; LIEBERMAN, M.A. *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*. 2.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1996.

SNYDERMAN, S.E.; NORTON, P.M.; ROITMAN, E.; HOLT, L.E.Jr. Maple syrup urine disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics*, v. 34, p. 454-472, 1964.

TASHIAN, R.E. Inhibition of brain glutamic acid decarboxylase by phenylalanine, valine, and leucine derivatives: a suggestion concerning the etiology of the neurological defect in phenylketonuria and branched-chain ketonuria. *Metabolism*, v. 10, p. 393,402, 1961.

TAVARES, R.G.; SANTOS, C.E.; TASCA, C.I.; WAJNER, M.; SOUZA, D.O.; DUTRA-FILHO, C.S. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 181, n. 1-2, p. 44-49, 2000.

TREACY, E.; CLOW, C.L.; READE, T.R.; CHITAYAT, D.; MAMER, O. A.; SCRIVER, C.R. Maple syrup urine disease: interrelations between branched-chain, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; Associations with CNS dysmyelination. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 15, n. 1, p. 121-135, 1992.

WENDEL, U.; LANGENBECK, U.; LOMBECK, I.; BREMER, H.J. Maple syrup urine disease – therapeutic use of insulin in catabolic states. *European Journal of Pediatrics*, v. 139, n. 3, p. 172, 1982.

WESTALL, R.G.; DANCIS, J.; MILLER, S. Maple syrup urine disease. *American Journal of Diseases of Children*, v. 94, p. 571-572, 1957.

YEAMAN, S.J. The mammalian 2-oxo acid dehydrogenases: a complex family. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 11, p. 293-296, 1986.

YEAMAN, S.J. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochemical Journal*, v. 257, n. 3, p. 625-632, 1989.

YIELDING, K.L.; TOMKINS, G.M. An effect of L-leucine and other essential amino acids on the structure and activity of glutamic dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 47, p. 983-990, 1961.

YUDKOFF, M.; NISSIM, I.; DAIKHIN, Y.; LIN, Z.P.; NELSON, D.; PLEASURE, D.; ERECINSKA, M. Brain glutamate metabolism: neuronal-astroglial relationships. *Developmental Neuroscience*, v. 15, n. 3-5, p. 343-350, 1993.

YUDKOFF, M.; DAIKHIN, Y.; NISSIM, I.; PLEASURE, D.; STERN, J.; NISSIM, I. Inhibition of astrocyte glutamine production by alpha-ketoisocaproic acid. *The Journal of Neurochemistry*, v.63, n. 4, p. 1508-1515, 1994.

YUWILER, A.; GELLER, E. Serotonin depletion by dietary leucine. *Nature*, v. 208, n. 5005, p. 83-84, 1965.

ZIELKE, H.R.; HUANG, Y.; TILDON, J.T.; ZIELKE, C.L.; BAAB, P.J. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: alpha-ketoisocaproate infusion. *Developmental Neuroscience*, v. 18, n. 5-6, p. 420-425, 1996.

ZIELKE, H.R.; HUANG, Y.; BAAB, P.J.; COLLINS, R.M.; ZIELKE, C.L.; TILDON, J.T. Effect of  $\alpha$ -ketoisocaproate and leucine on the *in vivo* oxidation of glutamate and glutamine in the rat brain. *Neurochemical Research*, v. 22, n. 9, p. 1159-1164, 1997.