

TIAGO DOMINGUES

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO
INTRACEREBROVENTRICULAR DE ÁCIDO OCTANOICO
SOBRE PARÂMETROS BIOENERGÉTICOS EM CÉREBRO DE
RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para a obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia
Fernanda Schuck

CRICIÚMA,

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

D671e Domingues, Tiago.

Efeitos da administração intracerebroventricular de ácido octanoico sobre parâmetros bioenergéticos em cérebro de ratos / Tiago Domingues ; orientadora: Patrícia Fernanda Schuck. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

81 p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Ácido octanoico. 2. Disfunção mitocondrial. 3. Oxidação mitocondrial. 4. Metabolismo energético. 5. Deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média. I. Título.

CDD 22. ed. 616.042

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendada pela CAPES – Homologada pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DA 262ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO

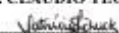
Ata da Defesa Pública de Dissertação do Mestrado de **Tiago Domingues**. Aos nove dias do mês de setembro do ano de dois mil e dezesseis às 10h00, na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, reuniram-se os membros da Banca Examinadora, composta pelos senhores professores: **Dra. JOSIANE BUDNI** (Membro Relator - UNESC), **Dr. RICARDO AURINO DE PINHO** (Membro Externo - UNESC) e **Dra. SILVANA GIULIATTI** (Membro Externo – USP – Ribeirão Preto) e designados pelo Colegiado de Coordenação, a fim de argüerem a dissertação de Mestrado de **Tiago Domingues** no título: “**Efeitos da administração Intracerebroventricular de ácido octanoico sobre parâmetros bioenergéticos em cérebro de ratos**”. Aberta a sessão pela Presidente da mesma, coube ao candidato, de forma regimental, expor o tema de sua dissertação, findo o que, dentro do tempo regulamentar, foi questionado pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida, procedeu às explicações que se faziam necessárias. Após esse procedimento, a Banca Examinadora reuniu-se individualmente, para a avaliação final do candidato. Retornando à sessão, a Presidente, lendo o Termo de Apresentação de Dissertação, declarou, **Tiago Domingues** APROVADO.

ALTERAÇÕES SUGERIDAS PELA BANCA EXAMINADORA:

Revisar a descrição metodológica
trazer a discussão nos resultados.


Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza
Coordenador PPGCS

Prof. Dr. **CLÁUDIO TEODORO DE SOUZA** (Presidente do Colegiado de Coordenação)


Prof.ª Dra. **PATRICIA FERNANDA SCHUCK** (Orientadora)

BANCA EXAMINADORA:


Prof.ª Dra. **JOSIANE BUDNI** (Membro Relator - UNESC)


Prof. Dr. **RICARDO AURINO DE PINHO** (Membro Externo - UNESC)


Prof.ª Dra. **SILVANA GIULIATTI** (Membro Externo – USP – Ribeirão Preto)

CANDIDATO: 
TIAGO DOMINGUES

Criciúma, SC, 09 de setembro de 2016.

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo e do Laboratório de Bioenergética do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

“As pessoas boas merecem o nosso amor, as pessoas ruins precisam dele...”

Madre Tereza de Calcutá

AGRADECIMENTOS

À UNESC por me proporcionar uma formação digna e acessível e a UniRV pela oportunidade da docência.

A todos os companheiros do Minter, pelo incentivo e cumplicidade e em especial ao Bruno, companheiro de aulas e viagens e por tornar-se um amigo verdadeiro.

Ao professor Renne Peixoto, por ter me conduzido a UniRV e consequentemente a este mestrado.

Ao Professor Alberto Barella Netto e Fernando Fernandes pela amizade sempre justa e perfeita.

Aos amigos Antonio Itamar e Joana pela amizade e pelos conselhos de vida.

Aos amigos Alexandre e Janaina pelo carinho e cumplicidade sempre presentes.

Ao amigo José Ronaldo pela confiança, por compreender a minha ausência e pelo incentivo na realização deste mestrado. Ao compadre Alemão pelo companheirismo.

A professora Dra Maria Inês da Rosa, pelas sugestões e pelo carinho. Ao professor Dr Ricardo Pinho pela amizade e por me permitir ser “seu pediatra”, e a todos os professores do Minter que não mediram esforços em orientar.

Ao Professor Dr Emilio Luiz Streck pelas aulas, orientações e sugestões, à Meline pela atenção e pelo auxílio providencial e a todos os membros do laboratório de bioenergética.

À Maria Carolina, companheira de minter e de laboratório, pela amizade, ajuda e incentivo na conclusão deste.

Ao Hugo, pelas orientações, pela ajuda na realização da cirurgia estereotáxica e pelo auxílio sempre disponível.

A Doutoranda Ândrea, pela atenção, auxílio, dicas, companheirismo e principalmente pela enorme paciência comigo e com as minhas solicitações. Muito obrigado mesmo.

A todos os colegas do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo pela incomensurável ajuda na realização deste trabalho.

Aos Professores Dr. Eduardo Pacheco Rico e Profa Dra. Samira da Silva Valvassori e todos os membros do laboratório de Sinalização Neural e Psicofarmacologia pela receptividade e carinho.

A Professora Josiane Budni pela relatoria deste trabalho.

A Dra Viviane, Dr Julemarcus, Dra Meire e Dr Afonso e a todos os meus colegas de plantões que sempre me auxiliaram “nas trocas” e no incentivo para que pudesse realizar as atividades desse mestrado.

À Profa Dra Silvana Giuliatti, que abriu o meu caminho para a pesquisa, aceitando-me como bolsista de iniciação científica ainda na graduação.

Aos meus compadres, Livio e Alessandra, Maria Eduarda e Rodrigo pelos conselhos e carinho.

A minha família espiritual, que me guiou e protegeu e a todos que passaram pela minha vida, pois deixaram ensinamentos que me auxiliaram a chegar até aqui.

Ao tio Amarolino e tia Ana pelo amor dedicado a mim e minha família.

Aos meus tios Paulo e Silvia e primos Paulo e Tarsila pelo carinho e bem querer de sempre.

A toda a família Vieira-Roldão, à qual hoje faço parte.

Aos meus cunhados, Eduardo, Débora, Antônio e Ludmilla pelo incentivo e pelo carinho no cuidado com minhas filhas.

Aos meus sogros Antonio e Mafalda por terem me acolhido e cuidarem de mim como um verdadeiro filho.

À minha irmã Juliana Ogawa, pela amizade e amor fraterno.

Aos meus irmãos, André, Lucas e Pedro, agradeço as palavras de estímulo, os auxílios e até pelos “puxões de orelha”. Juntos somos mais fortes.

Ao meu Pai Nilton, pela oportunidade desta encarnação e a minha mãe Jussara pelos ensinamentos e incentivo na realização deste mestrado.

À minha Orientadora, Professora Dra Patricia Fernanda Schuk, primeiramente, por me aceitar como seu orientado (apesar das “estórias”) e por durante todo o tempo, pela sua ajuda, pela dedicação, pelo estímulo e incentivo. Agradeço também pelo fato de ter conhecido uma verdadeira mestre, tanto na vida acadêmica como na pessoal... A você “Pati” (até que enfim consegui chamar assim), tenho a certeza de que o Pai Celestial reserva muitas bênçãos sempre e que qualquer palavra minha de agradecimento não demonstraria a gratidão e o carinho verdadeiro que tenho pela senhora. Espero não tê-la decepcionado.

Aos meus avós, Romeu e Sylvia que sempre acreditaram em mim dando-me suporte emocional e financeiro e que do oriente eterno, onde hoje se encontram, continuam a zelar por mim.

Às minhas filhas Julia e Alice, que diariamente me ensinam a maravilha que é ser Pai e que me provaram que o amor incondicional realmente existe.

Ao Pai Celestial que me abençoou nesses 38 anos de existência, fornecendo-me uma família amorosa e uma profissão digna, e que em todas as provas do caminho deu-me forças para atravessá-las com resignação e honradez.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha esposa, Livia, meu “Love”, amor desde a juventude, companheira das alegrias e dificuldades, o meu muito obrigado por acreditar que eu posso tornar-me melhor a cada dia. Obrigado por nunca ter desistido de mim. Te amo. Sempre Seu.

RESUMO

A deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (MCADD) é o mais comum defeito da oxidação de ácidos graxos. Esta doença é caracterizada bioquimicamente por níveis elevados de ácido octanoico (AO) em tecidos e fluidos corporais de pacientes acometidos por essa deficiência. Os principais sintomas incluem letargia, vômitos, hipoglicemia e paralisia cortical, podendo evoluir para coma e morte. Considerando-se que a fisiopatologia do dano cerebral apresentado por pacientes acometidos pela MCADD não está bem estabelecida, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade de enzimas mitocondriais em estruturas cerebrais de ratos submetidos à administração intracerebroventricular de AO. Ratos Wistar machos com 60 dias de vida foram divididos em dois grupos experimentais: grupo AO, cujos animais receberam uma administração intracerebroventricular de AO (1,66 μ mol), e grupo controle, cujos animais receberam administração intracerebroventricular de líquido cefalorraquidiano artificial no mesmo volume. Uma hora após a administração, os animais sofreram eutanásia por decapitação e o córtex cerebral, o hipocampo, o estriado e o cerebelo foram retirados e limpos. Estas estruturas foram utilizadas para avaliar as atividades dos complexos I-IV da cadeia respiratória, bem como das enzimas creatina cinase (CK), citrato sintase (CS), succinato desidrogenase (SDH) e malato desidrogenase (MDH). Observou-se uma diminuição da atividade do complexo I da cadeia respiratória em estriado e hipocampo de ratos que receberam AO. Além disso, as atividades dos complexos II e II-III foram inibidas pela administração de AO em todas as estruturas cerebrais estudadas, enquanto que a atividade do complexo IV foi inibida em córtex cerebral, corpo estriado e cerebelo. Em adição, a atividade da SDH foi diminuída em córtex cerebral, estriado e cerebelo de animais do grupo AO. Por outro lado, a atividade da MDH encontrou-se aumentada apenas em córtex cerebral, ao passo que a atividade da CS foi aumentada no hipocampo destes animais em comparação ao grupo controle. Adicionalmente, a atividade da CK foi aumentada no córtex cerebral, mas se encontrou inibida em hipocampo e cerebelo. Estes resultados sugerem que a administração de AO induz disfunção mitocondrial em cérebro de ratos, o que poderia estar implicada na fisiopatologia dos danos cerebrais encontrados em pacientes afetados pela MCADD.

Palavras-chave: ácido octanoico; cérebro; disfunção mitocondrial; MCADD; metabolismo energético.

ABSTRACT

Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD) is one of the most common fatty acid oxidation defects. The disease is characterized by high octanoic acid (OA) levels in tissues and body fluids of patients affected by this deficiency. The main symptoms include lethargy, vomiting, hypoglycemia, and cortical palsy, and can progress to coma or even death. Considering that the pathophysiology of the brain damage in patients suffering from MCADD is not well established, the aim of this work was to evaluate the activity of mitochondrial enzymes in brain structures of rats receiving intracerebroventricular administration of OA. Sixty-day-old male Wistar rats were divided into two groups: OA group, which received one intracerebroventricular administration of OA (1.66 μmol), and control group, that received artificial cerebrospinal fluid in the same volume. One hour after the administration, the animals were euthanized and cerebral cortex, hippocampus, striatum, and cerebellum were dissected and homogenized in specific buffers. The structures were used to assess the activities of the respiratory chain complexes I-IV, as well as creatine kinase (CK), citrate synthase (CS), succinate dehydrogenase (SDH), and malate dehydrogenase (MDH) activities. It was observed a decrease of complex I activity in striatum and hippocampus of rats receiving OA. Furthermore, complexes II and II-III activities were inhibited by OA administration in all brain structures studied, while complex IV activity was inhibited in cerebral cortex, striatum, and cerebellum. Moreover, SDH activity was diminished in cerebral cortex, striatum, and cerebellum of animals receiving OA. On the other hand, MDH activity was increased only in cerebral cortex, while CS activity was activated in hippocampus of these animals in comparison to control group. In addition, CK activity was increased in cerebral cortex, while it was inhibited in hippocampus and cerebellum. These results suggest that OA administration elicits mitochondrial dysfunction in brain of rats, which could be implicated in the pathophysiology of brain damage found in MCADD patients.

Keywords: brain; energy metabolism; MCADD; mitochondrial dysfunction; octanoic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral da via metabólica esquemática da oxidação mitocondrial de ácidos graxos.....	30
Figura 2. Via metabólica afetada na MCADD.....	31
Figura 3. Principais vias metabólicas envolvidas na síntese de ATP...	36
Figura 4. Ciclo do ácido cítrico.....	38
Figura 5. Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa..	40
Figura 6. Reação catalisada pela enzima creatina cinase (CK)..	41
Figura 7. Visão geral do desenho experimental.	46
Figura 8. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre as atividades dos complexos (A) I, (B) II, (C) II-III e (D) IV da cadeia transportadora de elétrons em estriado de ratos com 60 dias de vida.....	51
Figura 9. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre as atividades dos complexos (A) I, (B) II, (C) II-III e (D) IV da cadeia transportadora de elétrons em hipocampo de ratos com 60 dias de vida.....	52
Figura 10. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre as atividades dos complexos (A) I, (B) II, (C) II-III e (D) IV da cadeia transportadora de elétrons em cerebelo de ratos com 60 dias de vida.....	53
Figura 11. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima creatina cinase (CK) em (A) córtex cerebral, (B) estriado, (C) hipocampo e (D) cerebelo de ratos com 60 dias de vida.....	54
Figura 12. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade das enzimas (A) citrato sintase (CS), (B) succinato desidrogenase (SDH) e (C) malato desidrogenase (MDH) em córtex cerebral de ratos com 60 dias de vida.....	55

Figura 13. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade das enzimas (A) citrato sintase (CS), (B) succinato desidrogenase (SDH) e (C) malato desidrogenase (MDH) em estriado de ratos com 60 dias de vida..... 56

Figura 14. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade das enzimas (A) citrato sintase (CS), (B) succinato desidrogenase (SDH) e (C) malato desidrogenase (MDH) em hipocampo de ratos com 60 dias de vida..... 57

Figura 15. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade das enzimas (A) citrato sintase (CS), (B) succinato desidrogenase (SDH) e (C) malato desidrogenase (MDH) em cerebelo de ratos com 60 dias de vida.. 58

Figura 16. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade das enzimas (A) citrato sintase (CS), (B) succinato desidrogenase (SDH) e (C) malato desidrogenase (MDH) em cerebelo de ratos com 60 dias de vida.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AD – ácido decanoico
ADP – difosfato de adenosina (do inglês *adenosine diphosphate*)
AO – ácido octanoico
ATP – trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)
cDA - ácido *cis*-4-decenoico (do inglês *cis-4-decenoic acid*)
CEUA – Comissão de ética no uso de animais
CG-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês *gas chromatography coupled to mass spectrometer*)
CoA – coenzima A
CoQ – coenzima Q
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CK – creatina cinase (do inglês *creatine kinase*)
Cr - Creatina
CS – citrato sintase (do inglês *citrate synthase*)
CPTI – carnitina-palmitoil transferase I
CTPII - carnitina-palmitoil transferase II
DCIP – 2,6-diclorofenolindofenol (do inglês *2,6-dichlorophenolindophenol*)
DTNB – 5',5''-ácido ditiobis-(2-nitrobenzoico) (do inglês *5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)*)
EDTA – ácido etilendiaminotetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*)
FAD – dinucleotídeo de flavina e adenina, forma oxidada (do inglês *flavin adenine dinucleotide, oxidized form*)
FADH₂ - dinucleotídeo de flavina e adenina, forma reduzida (do inglês *flavin adenine dinucleotide, reduced form*)
GABA – ácido γ -aminobutírico (do inglês *γ -aminobutyric acid*)
GDP – difosfato de adenosina (do inglês *guanosine diphosphate*)
GLUT – transportador de glicose (do inglês *glucose transporter*)
GSH - glutationa, forma reduzida
GTP – trifosfato de guanosina (do inglês *guanosine triphosphate*)
ICV - intracerebroventricular
IDH – isocitrato desidrogenase (do inglês *isocitrate dehydrogenase*)
KGDH - α -cetoglutarato desidrogenase (do inglês *α -ketoglutarate dehydrogenase*)
LDH – lactato desidrogenase (do inglês *lactate dehydrogenase*)
MCAD – desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (do inglês *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*)

MCADD – deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (do inglês *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*)
MDH - malato desidrogenase (do inglês *malate dehydrogenase*)
NAD⁺- dinucleotídeo de nicotinamida de adenina, forma oxidada (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form*)
NADH - dinucleotídeo de nicotinamida de adenina, forma reduzida (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form*)
PCr – fosfocreatina (do inglês *creatine phosphate*)
PDH – piruvato desidrogenase (do inglês *pyruvate dehydrogenase*)
Pi – fosfato inorgânico (do inglês, *inorganic phosphate*)
SDH – succinato desidrogenase (do inglês *succinate dehydrogenase*)
SNC - sistema nervoso central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 OXIDAÇÃO MITOCONDRIAL DE ÁCIDOS GRAXOS	29
1.2 DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DE ACIL-COA DE CADEIA MÉDIA.....	31
1.2.1 Fisiopatologia da MCADD	33
1.3 METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL.....	35
1.4 JUSTIFICATIVA.....	42
2 OBJETIVOS	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 ANIMAIS.....	44
3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	44
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	45
3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS	46
3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	46
4 RESULTADOS	50
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO	64
ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 OXIDAÇÃO MITOCONDRIAL DE ÁCIDOS GRAXOS

A oxidação mitocondrial de ácidos graxos constitui uma via importante para a disponibilização de energia para a síntese de trifosfato de adenosina (ATP), principalmente durante períodos de jejum ou catabolismo exacerbado (Lunt e Vander Heiden, 2011; Nelson e Cox, 2014). A maior parte da reserva de ácidos graxos do organismo encontra-se armazenada sob a forma de triacilgliceróis no tecido adiposo. Estes podem ser hidrolisados por enzimas chamadas lipases em glicerol e ácidos graxos livres. Os ácidos graxos, então, são direcionados para os diferentes tecidos que os utilizam como substrato energético, tais como músculo esquelético, músculo cardíaco e fígado (Saudubray et al., 1999; Bennett et al., 2000).

A via metabólica pela qual os ácidos graxos são convertidos a acetil-CoA para a entrada deste no ciclo do ácido cítrico é chamada de β -oxidação, via que ocorre na matriz mitocondrial. Esse processo remove sequencialmente uma molécula de 2 carbonos (acetil-CoA) pela oxidação do carbono na posição β (C2) da molécula de acil-CoA (Figura 1) (Berg et al., 2008). Nessa mesma via metabólica, há formação de coenzimas reduzidas dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) e dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH₂), ambas direcionadas para a oxidação na cadeia respiratória (Lunt e Vander Heiden, 2011).

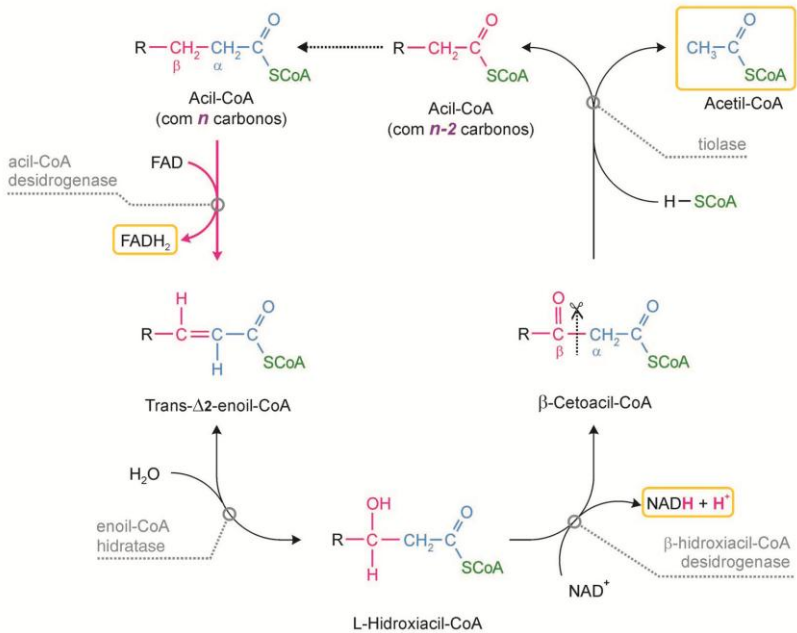


Figura 1. Visão geral da via metabólica esquemática da oxidação mitocondrial de ácidos graxos. Inicialmente, o acil-CoA graxo é oxidado na matriz mitocondrial pela desidrogenase de acil-CoA específica para cada comprimento da cadeia carbônica, formando um trans- Δ^2 -enoil-CoA. Este, por sua vez, é hidratado pela enoil-CoA hidratase, produzindo um L-hidroxiacil-CoA, que será oxidado a β -cetoacil-CoA pela β -hidroxiacil-CoA desidrogenase. Por fim, em uma reação catalisada pela enzima tiolase, há a liberação de uma molécula de acetil-CoA, destinada principalmente ao ciclo de Krebs, e uma molécula de acil-CoA com 2 carbonos a menos do que o acil-CoA inicial. CoA: coenzima A; FAD: dinucleotídeo de flavina e adenina, forma oxidada; FADH₂: dinucleotídeo de flavina e adenina, forma reduzida; n : número indefinido; NAD⁺: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada; NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida. Fonte: Nelson e Cox, 2014.

Defeitos da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos são doenças hereditárias causadas pela deficiência de uma das enzimas presentes nas diferentes fases da degradação destes compostos, bem como no transporte e na ativação desses ácidos orgânicos, levando ao seu acúmulo e de seus metabólitos. Esse defeito pode ocorrer em diferentes etapas da oxidação de ácidos graxos, incluindo o ciclo da carnitina, o transporte da carnitina, a carnitina-palmitoil transferase I (CPTI; EC 2.3.1.21), a translocase de carnitina/acilcarnitina, a carnitina-palmitoil transferase II

(CPTII; 2.3.1.21) e as enzimas da espiral de β -oxidação (Roe e Ding, 2001).

1.2 DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DE ACIL-COA DE CADEIA MÉDIA

A desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (MCAD; EC 1.3.99.3) é uma flavoproteína mitocondrial homotetramérica constituída de 421 aminoácidos e com massa molecular de 45 kDa (Matsubara et al., 1986; Kelly et al., 1987). É classificada como oxirredutase e possui um dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) como grupo prostético. Essa enzima é responsável pela catálise do primeiro passo da oxidação de acil-Coenzima A (acil-CoA) de cadeia média (4-12 carbonos) na β -oxidação (Roe e Ding, 2001; Lunt e Vander Heiden, 2011) (Figura 2). A proteína MCAD é codificada pelo gene *ACADM*, que possui 12 éxons e está localizado na região 31 do braço curto do cromossomo 1 (1p31) (Zhang et al., 1992).



Figura 2. Via metabólica afetada na MCADD. A oxidação mitocondrial de ácidos graxos de cadeia média é constituída de 4 etapas. A enzima MCAD catalisa o primeiro passo dessa via, oxidando o acil-CoA de cadeia média. Na deficiência desta enzima, ocorre o acúmulo dos ácidos graxos AO, AD e cDA, compostos substratos da enzima. AD: ácido decanoico; AO: ácido octanoico; cDA: ácido cis-4-decenoico; CoA: coenzima A; MCAD: desidrogenase de acil-CoA de cadeia média. Elaborada pelo autor.

A deficiência de MCAD (MCADD; OMIM 201450) é o defeito da oxidação mitocondrial de ácidos graxos mais comum (Leao et al.,

2008), possuindo uma incidência de 1:10.000 a 1:20.000 nascidos vivos, a qual varia de acordo com a população (Andresen et al., 2001; Hoffmann et al., 2004; Oerton et al., 2011; Anderson et al., 2012; Andresen et al., 2012; Thodi et al., 2012). É um erro inato do metabolismo cujo padrão de herança mendeliana é autossômico recessivo (Matsubara et al., 1992).

A MCADD é caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo dos ácidos graxos de cadeia média ácido octanoico (AO), ácido decanoico (AD) e ácido *cis*-4-decenoico (cDA), bem como de seus conjugados acilcarnitinas e acilglicinas em tecidos e líquidos biológicos de indivíduos afetados. As concentrações plasmáticas de AO, metabólito acumulado em maiores concentrações na MCADD, podem atingir 22 – 672 μM em pacientes (indivíduos normais: 0-15 μM). Adicionalmente ao acúmulo dos ácidos graxos de cadeia média, são observadas alterações bioquímicas em situações de crise metabólica desencadeadas por alta demanda energética, tais como hipoglicemia hipocetótica, hiperamonemia, desequilíbrio hidroeletrólítico, acidose metabólica e acidemia láctica (Roe e Ding, 2001; Gramer et al., 2015).

Os primeiros sinais clínicos da MCADD surgem geralmente entre os primeiros dias de vida e os seis anos de idade (Wilcken et al., 2007), mas podem surgir até a fase adulta do indivíduo (Lang, 2009). Os sinais e sintomas incluem episódios de vômito, letargia, apneia, podendo levar a colapso cardiorrespiratório (Nelson, 2009), atraso no desenvolvimento psicomotor, paralisia cerebral, atraso no crescimento, alterações comportamentais, transtornos psiquiátricos, podendo levar ao coma e à morte súbita (Grosse et al., 2006). Estes sintomas são desencadeados por situações de catabolismo exacerbado, tais como períodos de jejum, exercícios físicos ou estresse metabólico, como infecções virais ou bacterianas, constituindo uma crise metabólica (Derks et al., 2006). Segundo Oerton et al. (2011), 25 % dos pacientes morrem na primeira crise e 16 % dos pacientes sobrevivem com sequelas neurológicas graves, tais como paralisia cerebral, edema cerebral e anomalias no lobo frontal (Heubi et al., 1987; Egidio et al., 1989; Iafoffa et al., 1994; Rhead, 1994; Leach et al., 2014).

O diagnóstico da MCADD pode ser realizado pela quantificação de metabólitos acumulados no plasma (octanoilcarnitina) ou na urina (conjugados com glicina de hexanoato e fenilpropinato) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS). O diagnóstico é confirmado pela medida da atividade da enzima deficiente em fibroblastos cultivados (Nelson, 2009) e por análise molecular,

identificando mutações conhecidas da MCADD (Roe e Ding, 2001; McKinney et al., 2004; Mattern e Rinaldo, 2015).

O tratamento atualmente tem como principal objetivo a prevenção de crises metabólicas, evitando a deficiência intelectual e a morte súbita precoce. A terapia atual de longo prazo enfatiza a prevenção do jejum, uma dieta com altos teores de carboidratos e baixos teores de lipídeos, cuidados especiais durante episódios de infecções, rápida correção da hipoglicemia e hidratação, além da administração contínua de L-carnitina (Roe e Ding, 2001; Lee et al., 2005). Entretanto, novas estratégias terapêuticas são necessárias para a melhora da qualidade de vida dos pacientes afetados pela MCADD.

1.2.1 Fisiopatologia da MCADD

A fisiopatologia da MCADD ainda é pouco compreendida. O dano tecidual, especialmente cerebral, apresentado por pacientes tem sido atribuído ao acúmulo de metabólitos tóxicos (Wajner e Amaral, 2015). Um defeito na oxidação mitocondrial de ácidos graxos de cadeia média leva à diminuição da disponibilidade de substratos energéticos através da cetogênese para tecidos periféricos. Outra consequência da impossibilidade de utilização dos ácidos graxos na síntese de corpos cetônicos é o acúmulo intramitocondrial de acil-CoA, consequentemente ocasionando uma elevação da razão acil-CoA:coenzima A (CoA), levando à inibição das enzimas piruvato desidrogenase (PDH; EC 1.2.4.1) e α -cetoglutarato desidrogenase (KGDH; EC 1.2.4.2), que utilizam CoA como substrato (Rinaldo et al., 2002). Com a inibição da PDH, ocorre uma diminuição da conversão de piruvato a acetil-CoA e, consequentemente, diminuição da disponibilidade deste último para o ciclo de Krebs e para a cetogênese. Adicionalmente, há diminuição da formação de citrato pela reação catalisada pela citrato sintase (CS; EC 2.3.3.1). O citrato é precursor de oxaloacetato, metabólito necessário para a síntese de glicose via gliconeogênese, bem como de malonil-CoA, o principal regulador inibitório da CPTI (Roe e Ding, 2001; Grosse et al., 2006; Lunt e Vander Heiden, 2011). Dessa forma, a diminuição dos níveis de citrato ocasionada pelo acúmulo do AO e outros ácidos graxos na MCADD agrava a hipoglicemia e induz o acúmulo de derivados de acil-CoA nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes (Roe e Ding, 2001).

De acordo com Olson et al. (1989), outro efeito atribuído ao AO, quando testado *in vitro*, é a inibição do controle do volume astrocitário e

da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase (EC 3.6.1.37) em cultura de células gliais. Neste contexto, Reis de Assis et al. (2004) mostraram que o AO inibe moderadamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos jovens. Adicionalmente, Scaini et al. (2012) demonstraram evidências de que o AO altera a bioenergética mitocondrial e induz danos oxidativos em tecidos periféricos de ratos. Schuck et al. (2007) observaram que o cDA provoca alterações em parâmetros de dano oxidativo e reduz defesas antioxidantes em córtex cerebral de ratos. Da mesma forma, foi demonstrado que os ácidos graxos AO e AD *in vitro* induzem estresse oxidativo em cérebro de ratos (Schuck et al., 2009a). Além disso, Tonin et al. (2012) mostraram que o acúmulo de acilcarnitinas também induz estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos. Nesse sentido, Derks et al. (2014) demonstraram alterações de parâmetros de danos oxidativos e defesas antioxidantes em plasma de pacientes acometidos pela MCADD. Os autores sugerem que o acúmulo dos metabólitos de ácidos graxos de cadeia média, ésteres de carnitina e ácidos dicarboxílicos, seriam responsáveis por tais alterações. Adicionalmente, foi observado em pacientes níveis aumentados de fosfatidilcolinas oxidadas em amostras de sangue de pacientes, corroborando o envolvimento do estresse oxidativo nos mecanismos fisiopatológicos da MCADD (Najdekr et al., 2015).

Adicionalmente, em estudos com coelhos, a administração de AO produziu achados patológicos semelhantes aos observados na MCADD, como encefalopatia, edema cerebral e esteatose hepática (Heubi et al., 1987). Reis de Assis et al. (2004) demonstraram que a incubação de homogeneizado de estruturas cerebrais e de mitocôndrias isoladas de cérebro total de ratos na presença de AO, AD e cDA induz alterações no metabolismo da glicose, nas atividades do ciclo de Krebs, no transporte de elétrons pela cadeia respiratória e na atividade da enzima creatina cinase (CK; EC 2.7.3.2). Os mesmos ácidos graxos também alteram parâmetros de respiração celular e a homeostase mitocondrial do cálcio, atuam como desacopladores e alteram o estado *redox* mitocondrial (Reis de Assis et al., 2004; Schuck et al., 2009b; Schuck et al., 2010; Amaral et al., 2016). Recentemente, foi demonstrado que ácidos graxos de cadeia média inibem o metabolismo mitocondrial, estimulando o transporte de lactato e corpos cetônicos entre astrócitos e neurônios (Thevenet et al., 2016).

1.3 METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL

As células do sistema nervoso central (SNC) utilizam energia para executar diversas funções, como transporte ativo de íons inorgânicos e moléculas, neurotransmissão e síntese de macromoléculas. A maior parte da energia necessária para realizar essas funções é obtida pela oxidação de substâncias por diversas vias metabólicas, principalmente a respiração celular (Zheng, 2012; Moussaieff et al., 2015). O ATP é a principal moeda energética celular para a maioria dos processos que demandam energia, a qual é obtida pela hidrólise das ligações fosfato presentes nesse nucleotídeo (Lunt e Vander Heiden, 2011; Zheng, 2012; Moussaieff et al., 2015).

O SNC possui uma intensa atividade metabólica e suas reservas energéticas são pequenas em relação à sua demanda. Assim, há a necessidade de constante oxidação de substratos energéticos nesse órgão, sendo a glicose o principal deles (Dickinson, 1996). Esta alta demanda energética torna esse órgão extremamente suscetível a diminuição da disponibilidade energética (Bolaños et al., 2010; Federico et al., 2012).

A glicose é transportada para dentro das células por proteínas transportadoras específicas (transportadores de glicose; GLUTs) e, ao entrar na célula, pode ser metabolizada em diferentes rotas metabólicas (Figura 3). A principal via de utilização da glicose é a glicólise, processo que ocorre no citoplasma de todas as células. Esta via é composta por uma sequência de 10 reações enzimáticas, cujo produto final é o piruvato (Lunt e Vander Heiden, 2011). Nessa via metabólica, uma molécula de glicose gera duas moléculas de piruvato, duas moléculas de ATP e duas moléculas de NADH. Quando há elevados níveis de ATP, a glicose é poupada e armazenada como glicogênio, forma de armazenamento prontamente mobilizável durante o jejum, especialmente no citoplasma de astrócitos (Clark et al., 1993; Berg et al., 2008).

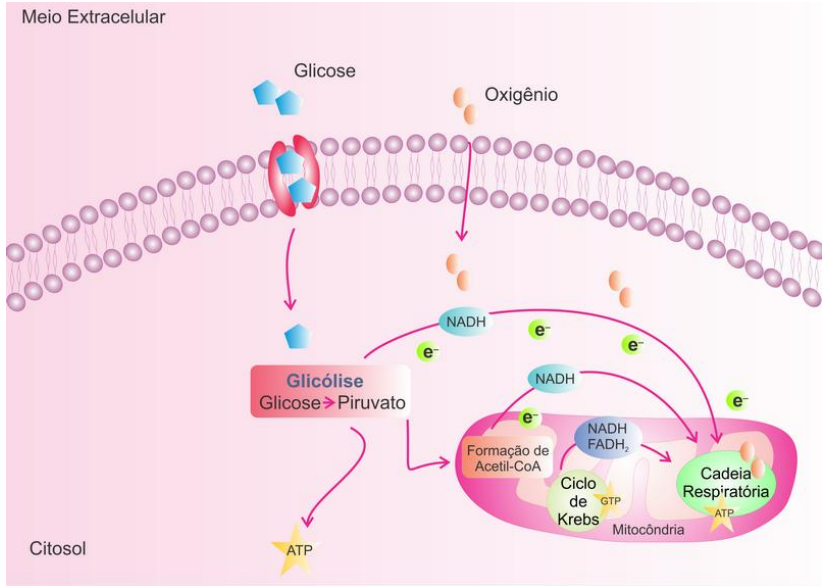


Figura 3. Principais vias metabólicas envolvidas na síntese de ATP. A glicose é captada pela célula por transportadores específicos e é oxidada na via glicolítica a piruvato. Este, por sua vez, entra na mitocôndria e é convertido a acetil-CoA, o qual é totalmente oxidado a CO₂ no ciclo de Krebs. Nesta via metabólica, há a formação de coenzimas reduzidas, que entregam seus elétrons aos complexos da cadeia respiratória, bem como de uma molécula de GTP, que pode ser utilizado como moeda energética ou pode ser convertido a ATP. A síntese de ATP culmina na fosforilação oxidativa, em que o ADP é fosforilado a ATP. ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; CoA: coenzima A; FADH₂: dinucleotídeo de flavina e adenina, forma reduzida; GTP: trifosfato de guanosina; NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida. Fonte: Castro, 2016.

O piruvato proveniente da glicólise apresenta dois principais destinos. No metabolismo anaeróbico, o piruvato é reduzido a lactato pela atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH; EC 1.1.1.27), reoxidando o NADH a NAD⁺. No metabolismo aeróbico, o piruvato é transportado para dentro da mitocôndria e sofre ação do complexo enzimático da PDH, formando acetil-CoA, que seguirá para o ciclo Krebs (Lunt e Vander Heiden, 2011).

O ciclo de Krebs, ou ciclo do ácido cítrico, ocorre na matriz mitocondrial e nele há a completa oxidação de uma molécula de acetil-CoA a CO₂ por volta do ciclo, através de uma série de oito reações

catalisadas por enzimas diferentes (Figura 4) (Zheng, 2012; Nelson e Cox, 2014). O ciclo inicia-se com a condensação de oxaloacetato e acetil-CoA para formar citrato pela ação da enzima CS. Este é isomerizado a isocitrato pela ação da enzima aconitase (EC 4.2.1.3). A descarboxilação do isocitrato pela isocitrato desidrogenase (IDH; EC 1.1.1.41) libera α -cetogluturato em uma reação em que há liberação de uma molécula de CO_2 . A segunda molécula de CO_2 é liberada na reação seguinte, na qual o α -cetogluturato é descarboxilado oxidativamente a succinil-CoA pelo complexo enzimático α -cetogluturato desidrogenase (KGDH; EC 1.2.4.2). As reações catalisadas pela CS, IDH e KGDH são os pontos cruciais de regulação de ciclo de Krebs (Lunt e Vander Heiden, 2011; Nichols e Ferguson, 2013; Schiaffino et al., 2015).

A seguir, a ligação tioéster do succinil-CoA é clivada pela enzima succinil-CoA sintetase (EC 6.2.1.4), produzindo succinato. Nesta reação, há concomitantemente a síntese de uma molécula de trifosfato de guanosina (GTP). O succinato, por sua vez, é oxidado a fumarato pela enzima succinato desidrogenase (SDH; EC 1.3.5.1). Este último transforma-se em malato pela enzima fumarase (EC 4.2.1.2). Finalmente, o malato é oxidado pela malato desidrogenase (MDH; EC 1.1.1.37), regenerando oxaloacetato (Nicholls e Ferguson, 2013). A cada volta do ciclo, são liberadas três moléculas de NADH nas reações catalisadas pela IDH, KGDH e MDH, uma de FADH_2 na reação catalisada pela SDH, duas moléculas de CO_2 nas reações catalisadas pelas enzimas IDH e KGDH e uma de GTP, pela enzima succinil-CoA sintetase. As coenzimas reduzidas NADH e FADH_2 liberadas no ciclo de Krebs serão posteriormente oxidadas na cadeia transportadora de elétrons (Lunt e Vander Heiden, 2011).

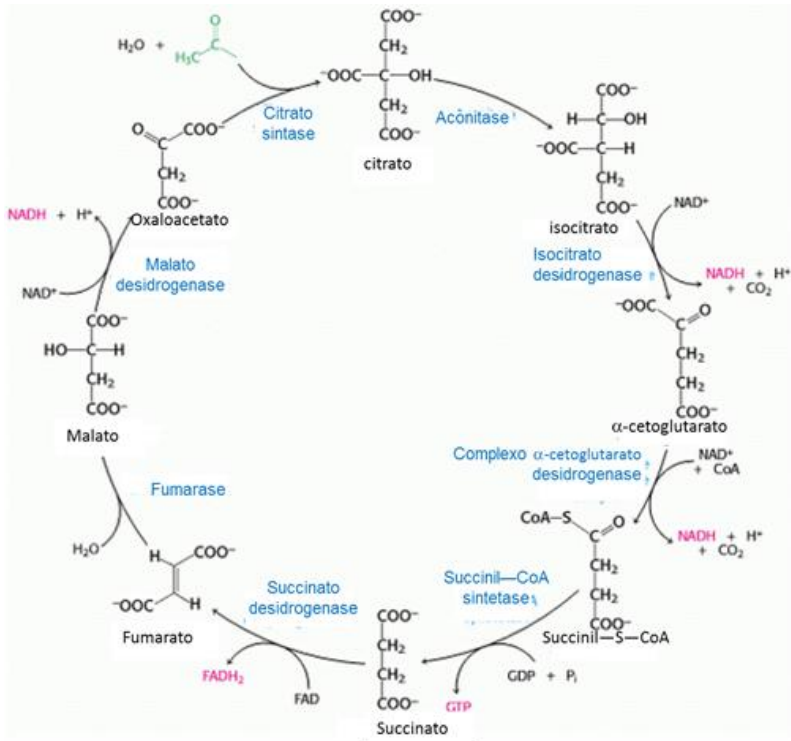


Figura 4. Ciclo do ácido cítrico. A condensação do acetil-CoA (em verde) com o oxaloacetato forma citrato, o qual é isomerizado a isocitrato. A descarboxilação oxidativa do isocitrato libera a primeira das três moléculas de NADH produzidas pelo ciclo e a primeira liberação de CO_2 . O α -cetoglutarato é convertido a succinil-CoA, liberando o segundo CO_2 e produzindo o segundo NADH. A clivagem de succinil-CoA a succinato produz uma molécula de GTP. Na sequência, o succinato é oxidado a fumarato, com concomitante redução de FAD a FADH_2 . O fumarato, por sua vez, é hidratado formando malato, que é oxidado a oxaloacetato, liberando o último NADH do ciclo. CoA: coenzima A; FADH_2 : dinucleotídeo de adenina e flavina, forma reduzida; GDP: difosfato de guanosina; GTP: trifosfato de guanosina; NADH: dinucleotídeo de nicotinamida adenina, forma reduzida; P_i : fosfato inorgânico. Fonte: Nelson e Cox, 2014.

A cadeia respiratória é composta por cinco complexos proteicos (I, II, III, IV e V) com potencial *redox* crescente ancorados na membrana mitocondrial interna (Figura 5) (Smith et al., 2007). O complexo I é formado por proteínas integrais de membrana e recebe os

elétrons do NADH, liberando NAD^+ . Esses elétrons são transportados por reações de oxirredução para a ubiquinona, formando ubiquinol. Essa reação faz com que quatro prótons sejam bombeados da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas (Grimm, 2013; Nicholls e Ferguson, 2013). Adicionalmente, o complexo II oxida o FADH_2 produzido na reação da SDH, liberando FAD. Os elétrons provenientes dessa oxidação são transferidos para a ubiquinona, reduzindo-a a ubiquinol. Diferentemente do complexo I, o complexo II não possui proteínas integrais de membrana e, portanto, não bombeia prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas (Grimm, 2013).

O complexo III recebe os elétrons do ubiquinol e, por reações de oxirredução de diferentes citocromos, os transfere para o citocromo c, outro carreador móvel presente na superfície externa da membrana mitocondrial interna. Durante esta transferência de elétrons, há o bombeamento de mais quatro prótons para o espaço intermembranas. Finalmente, o complexo IV oxida o citocromo c, transferindo seus elétrons para o oxigênio molecular, reduzindo-o completamente à água. Nessa última etapa, dois prótons são bombeados pela membrana mitocondrial interna (Wallace, 1999; Murray et al., 2002; Voet et al., 2008).

O bombeamento de prótons para o espaço intermembranas durante a transferência de elétrons gera um gradiente eletroquímico, também conhecido como potencial de membrana mitocondrial. Esse potencial é utilizado pelo complexo V da cadeia respiratória (ATP-sintase; EC 3.6.3.14) em um processo conhecido como fosforilação oxidativa. Neste processo, os prótons que estão no espaço intermembranas retornam à matriz mitocondrial por um canal de prótons existente na ATP-sintase, gerando uma força próton-motriz. Tal força permite que essa enzima fosforile o difosfato de adenosina (ADP), sintetizando assim o ATP (Heuvel, 2001; Smeitink, 2001; Bergman e Ben-Shachar, 2016).

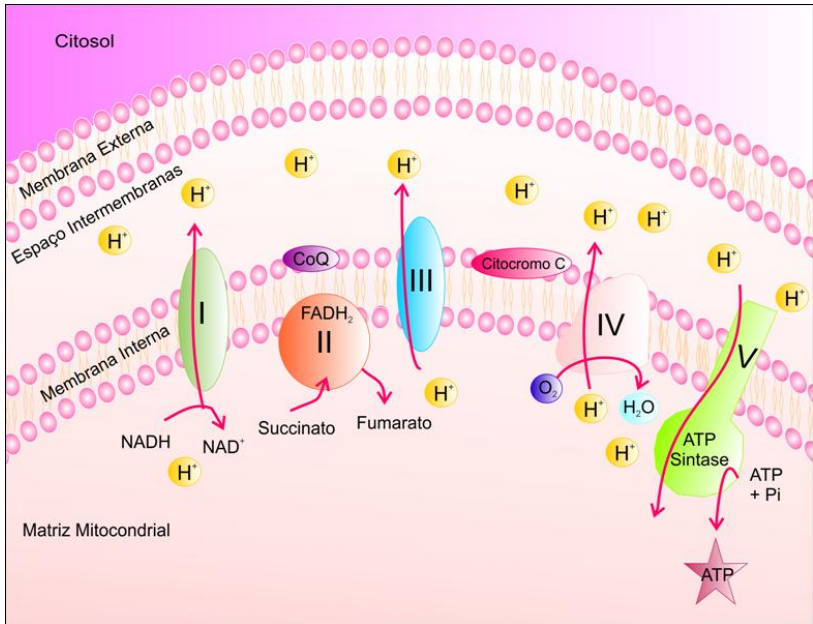


Figura 5. Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa. Moléculas ricas em energia química são metabolizadas por uma série de reações de oxirredução levando à produção de água ao final da cadeia respiratória. As coenzimas reduzidas NADH e FADH₂ provenientes das oxidações de substratos energéticos entregam seus elétrons ao complexo I e ao complexo II, respectivamente. À medida que os elétrons fluem através dos complexos da cadeia respiratória, há transporte de prótons (H⁺) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, gerando um gradiente eletroquímico. Este é dissipado pela ATP-sintase na fosforilação oxidativa para a síntese de ATP. ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; FAD: dinucleotídeo de adenina e flavina, forma oxidada; FADH₂: coenzima reduzida de adenina e flavina, forma reduzida; NAD⁺: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada; NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida; Pi: fosfato inorgânico. Fonte: Castro, 2016.

A redução da síntese de ATP no cérebro pode comprometer a síntese de neurotransmissores, tais como acetilcolina, glutamato, aspartato e ácido γ -aminobutírico (GABA), podendo induzir dano neuronal (Di Donato, 2000). Acredita-se que alterações no metabolismo energético cerebral estão envolvidos na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington, isquemia cerebral e esclerose lateral amiotrófica

(Brennan et al., 1985; Beal et al., 1992; Heales et al., 1999; Blass, 2001), bem como de alguns erros inatos do metabolismo (Latini et al., 2005; Ferreira et al., 2007; Viegas et al., 2008; Schuck et al., 2010; Macongonde et al., 2015).

Um mecanismo adicional de tamponamento energético celular inclui a enzima ubíqua creatina cinase (CK; EC 2.7.3.2) (Figura 6). A função dessa enzima é regular as concentrações intracelulares de ADP e ATP, catalisando a transferência reversível de um grupo fosforil entre a fosfocreatina (PCr) e o ADP, liberando ATP e creatina (Cr) (Brancaccio et al., 2007; Guimarães-Ferreira, 2014). O sistema PCr/CK possui elevada taxa de regeneração de ATP e é particularmente importante em situações de alta demanda metabólica, quando a taxa de utilização de ATP excede sua capacidade de síntese por outras vias metabólicas (Brancaccio et al., 2007; Wallimann et al., 2011; Guimarães-Ferreira, 2014). A CK exerce um papel crítico no processo neurodegenerativo (Tomimoto et al., 1993). Neste contexto, alterações da atividade da CK ou do sistema PCr/CK estão envolvidas na fisiopatologia de algumas doenças neurodegenerativas, tais como isquemia cerebral (Moshkova et al., 2009), doenças de Alzheimer (Zahid et al., 2014) e Huntington (Lin et al., 2013), fenilcetonúria (Costabeber et al., 2003) e acidemia metilmalônica (Schuck et al., 2004).

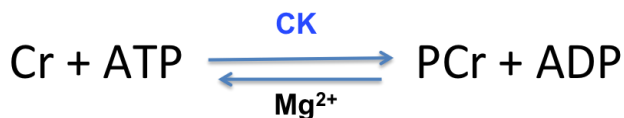


Figura 6. Reação catalisada pela enzima creatina cinase (CK). A transferência reversível de um grupo fosforil entre o ATP e a Cr produzem PCr e ADP. A CK utiliza Mg^{2+} como cofator. Essa reação ocorre tanto no citosol quanto na mitocôndria de todas as células de mamíferos. ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; CK: creatina cinase; Cr: creatina; PCr: fosfocreatina. Elaborada pelo autor.

1.4 JUSTIFICATIVA

A MCADD é o mais frequente defeito de β -oxidação de ácidos graxos, frequentemente levando à morte súbita infantil (Bennett et al., 1991; Boles et al., 1998; Wilhelm et al., 2006). Os pacientes que sobrevivem às crises metabólicas apresentam dano neurológico, incluindo deficiência cognitiva (Elkind et al., 2015; Matern e Rinaldo, 2015). Considerando-se que sintomas no SNC podem levar a déficit cognitivo, coma e morte (Matern e Rinaldo, 2015) e que a fisiopatologia do dano cerebral apresentado por pacientes acometidos pela MCADD ainda é pouco conhecida e que há evidências de que a função mitocondrial esteja prejudicada nos SNC (Longo et al., 2008; Schuck et al., 2009b; Schuck et al., 2010; Thevenet et al., 2016), torna-se de grande importância estabelecer os mecanismos pelos quais ocorre disfunção energética cerebral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da administração intracerebroventricular (ICV) de AO sobre parâmetros bioenergéticos em diferentes estruturas cerebrais de ratos com 60 dias de vida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da administração ICV de AO sobre a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos adultos;
- Avaliar os efeitos da administração ICV de AO sobre as atividades das enzimas do ciclo de Krebs CS, SDH e MDH em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos adultos;
- Avaliar os efeitos da administração ICV de AO sobre a atividade da enzima CK em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos adultos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para a realização deste estudo, foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar machos com 60 dias de vida, fornecidos pelo Biotério da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram mantidos em ciclos de claro-escuro de 12 horas a uma temperatura de 24 ± 1 °C. Os animais tiveram livre acesso à água e ao alimento. A utilização dos animais seguiu um protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob o protocolo número 090/2013-2 (ANEXO A), de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (CONCEA, 2013) e as Diretrizes para a Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013).

Foram utilizados animais com 60 dias de vida, pois essa idade corresponde à adolescência em humanos, época de intensa atividade metabólica.

3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Para a administração do AO, foi realizada cirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula no ventrículo lateral direito por trepanação. Durante o processo cirúrgico, os animais tiveram uma fonte de aquecimento para que a temperatura se mantivesse adequada para estes (aproximadamente 21 °C). Inicialmente, os animais foram anestesiados pela administração intramuscular de uma associação de cloridrato de cetamina (75 mg/kg de peso corporal) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg de peso corporal). Até a completa anestesia, permaneceram em suas respectivas gaiolas (todos os animais foram anestesiados em sequência). Após a anestesia, os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico (Insight[®], Brasil) sobre um pano limpo, para evitar o contato direto com o material metálico frio do equipamento, presos nas barras auriculares, de forma a permitir a leitura adequada das coordenadas. A seguir, realizou-se uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo, expondo a calota craniana. Foram utilizadas algumas gotas de peróxido de hidrogênio comercial a fim de retirar a camada restante do tecido

subcutâneo e permitir a melhor visualização das suturas; o excesso foi retirado com auxílio de uma tesoura cirúrgica. A torre do aparelho estereotáxico foi colocada em posição vertical (ângulo zero), com o intuito de se verificar as coordenadas para a correta implantação da cânula no ventrículo direito. A localização obtida pela leitura das coordenadas, levando-se em consideração as coordenadas anteroposterior 0,9 mm e mesolateral 1,5 mm, indicou o exato local de implantação da cânula. Para tanto, foi realizado um pequeno orifício no local determinado utilizando-se uma caneta de alta rotação de um aparelho de brocar utilizado por odontólogos e uma cânula de 9 mm foi introduzida com o auxílio do aparelho estereotáxico segundo a coordenada dorsoventral -2,6 mm. Esta cânula foi fixada na calota craniana com acrílico odontológico, formando um “capacete”. Os animais foram, então, devolvidos às suas gaiolas e mantidos no biotério desta instituição por 72 h para recuperação.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos randomicamente em 2 grupos experimentais: grupo controle e grupo AO. Cada grupo foi constituído de 12 animais. Após o período de recuperação, os animais do grupo controle receberam uma administração ICV de líquido cefalorraquidiano artificial (2 μ L), enquanto os animais do grupo AO receberam uma administração de AO (1,66 μ mol em 2 μ L). O AO foi dissolvido em líquido cefalorraquidiano artificial para uma solução de 333 mM, cujo pH foi ajustado para 7,4.

Posteriormente, cada grupo com 12 animais foi subdividido randomicamente em dois novos grupos, totalizando 4 grupos com 6 animais cada (dois grupos com 6 animais controle e dois grupos AO), sendo utilizado 12 animais (6 controle e 6 AO) para análises do complexo respiratório e 12 animais (6 controle e 6 AO) para dosagem das enzimas testadas.

Uma hora após as administrações ICV, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação com guilhotina e sem anestesia. O procedimento foi realizado sem anestesia para que não houvesse interações entre os compostos ou ação do anestésico no SNC que pudessem interferir nos resultados. A caixa craniana foi aberta e, por dissecação, as estruturas cerebrais córtex, estriado, hipocampo e cerebelo foram limpas e isoladas. Essas estruturas foram analisadas pelo fato de não se saber exatamente quais são as mais afetadas na MCADD. As estruturas foram imediatamente congeladas em freezer -80 °C até o momento da realização das técnicas bioquímicas.

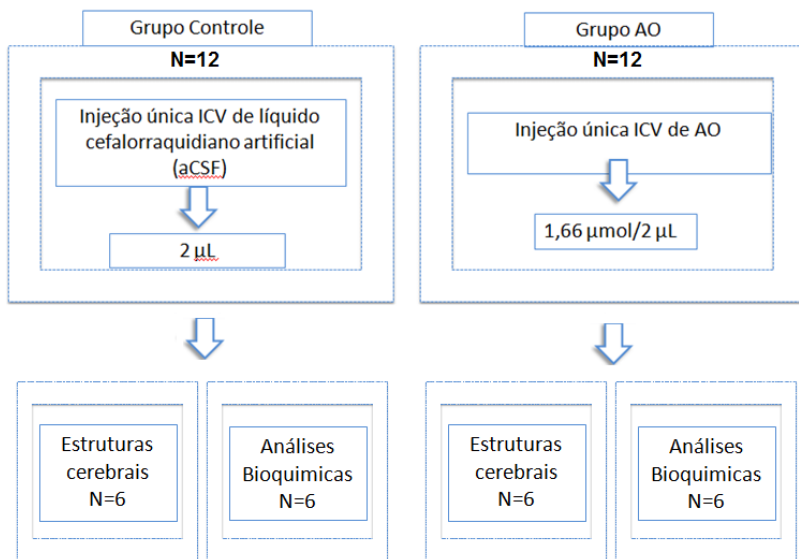


Figura 7. Visão geral do desenho experimental. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais, com 12 animais cada: grupo controle e grupo AO. Após a realização da administração intracerebroventricular (ICV) de líquido cefalorraquidiano no grupo controle e de ácido octanoico (AO) no grupo AO, cada grupo foi subdividido aleatoriamente em dois subgrupos para análises bioquímicas em estruturas cerebrais dos animais. Elaborado pelo autor.

3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

No dia dos experimentos, as estruturas cerebrais foram homogeneizadas (1:20, peso/volume) em tampão SETH (250 mM de sacarose, 2 mM de EDTA, 10 mM de Trizma base e 50 UI/mL de heparina), pH 7,4. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a $800 \times g$ por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi reservado em alíquotas e armazenado a -80°C até o momento da determinação das atividades enzimáticas.

3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Determinação da atividade do Complexo I (NADH: ubiquinona oxirredutase; EC 1.6.5.3): A atividade do complexo I da cadeia respiratória foi avaliada de acordo com o método descrito Cassina et al. (1996), utilizando-se o ferrocianeto de potássio como acceptor de elétrons. Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

Determinação da atividade do Complexo II (succinato: DCIP oxirredutase; EC 1.3.5.1): o meio de incubação foi constituído de tampão fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), 16 mM de succinato de sódio e 8 μM 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP). Inicialmente pré-incubou-se com 40-80 μg de proteínas de homogeneizado a 30° C por 20 minutos. Imediatamente após, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7 μM de rotenona e a reação foi iniciada com a adição de 40 μM de DCIP. As absorvâncias foram registradas por 5 minutos a 600 nm. A atividade do complexo II foi medida pela diminuição da absorvância causada pela redução do DCIP (Fischer et al., 1985). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

Determinação da atividade do Complexo II+CoQ+III (succinato: citocromo c oxirredutase): o meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 40 mM (pH 7,4) contendo 16 mM de succinato de sódio, foi pré-incubado com 40-80 μg de proteínas do homogeneizado a 30 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7 μM de rotenona e a reação se iniciou pela adição de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ de citocromo c e as absorvâncias foram registradas por 5 minutos a 550 nm. A atividade do complexo II+CoQ+III foi medida pelo aumento da absorvância causado pela redução do citocromo c (Fischer et al.,1985). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

Determinação da atividade do Complexo IV (citocromo c oxidase; EC 1.9.3.1): o meio de incubação continha tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0), 0,6 mM de n-dodecil-D-maltosídeo e 10-20 μg de proteínas (homogeneizado). A reação foi iniciada pela adição de 0,7 μg de citocromo c previamente reduzido. A atividade do complexo IV foi medida a 25 °C por 10 minutos pelo decréscimo da absorvância a 550 nm devido à oxidação do citocromo c reduzido (Rustin et al, 1994). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

Atividade da enzima CK: após um período de 15 minutos de pré-incubação, a reação foi iniciada com a adição de ADP a uma concentração final de 3,2 mM em meio contendo 7,08 mM de PCr e de 0,8-1 µg de proteínas (homogeneizado). Após 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida com ácido p-hidroximercuribenzoico 50 mM e a coloração rósea foi obtida pela adição de α-naftol 20 %, água MilliQ e diacetil 20 %. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 540 nm segundo o método de Hughes (1962). Para calcular a atividade enzimática, foi feita uma curva de calibração com Cr nas concentrações de 4 nmol/mL e 8 nmol/mL. Os resultados estão expressos em µmol de creatina . min⁻¹ . mg de proteína⁻¹.

Atividade da enzima CS: a atividade da enzima CS foi avaliada em um meio de incubação contendo 5',5''-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) 0,1 mM, ácido oxaloacético 0,2 mM, Triton X-100 0,1 % e acetil-CoA 0,1 mM, em um tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. A redução do DTNB foi acompanhada espectrofotometricamente a 412 nm por 3 minutos a 37 °C (Srere, 1969). A atividade está expressa em µM . min⁻¹ . mg de proteína⁻¹.

Determinação da atividade da enzima SDH: para a medida da atividade da enzima SDH, ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 62,5 mM, pH 7,4, Triton X-100 0,1 %, 1 mM de succinato de sódio e 9 µM de DCIP, foi adicionada amostra contendo 80-140 µg de proteína. O sistema foi pré-incubado a 30 °C em banho-maria por 30 minutos, após os quais foram adicionados azida sódica 4,3 mM, rotenona 7 µM, metassulfato de fenazina 1 mM e DCIP 42 µM. A redução do DCIP foi determinada em 600 nm durante 5 minutos a 25 °C (Fischer et al., 1985). A atividade está expressa em nmol . min⁻¹ . mg de proteína⁻¹.

Atividade da enzima MDH: a atividade da MDH foi medida em um meio contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4, contendo Triton X-100 0,1 %, rotenona 10 µM, NADH 0,14 mM e ácido oxalacético 0,30 mM. A atividade foi determinada pela oxidação do NADH em espectrofluorímetro em comprimentos de onda de excitação e emissão de 340 e 466 nm, respectivamente (Kitto, 1969). A atividade está expressa em µM . min⁻¹ . mg de proteína⁻¹.

Quantificação de Proteínas Totais: Foi realizada através do método de Lowry et al. (1951), utilizando-se a albumina sérica bovina como padrão.

3.6 Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Para a comparação entre as médias dos dois grupos experimentais, foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa IBM SPSS Statistics (IBM, Armonk, Estados Unidos). Foram consideradas diferenças significativas quando valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Inicialmente, foram avaliadas as atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo dos animais dos grupos controle e AO. A figura 7 demonstra que as atividades dos complexos II, II-III e IV foram diminuídas pela administração ICV de AO em comparação com o grupo controle em córtex cerebral.

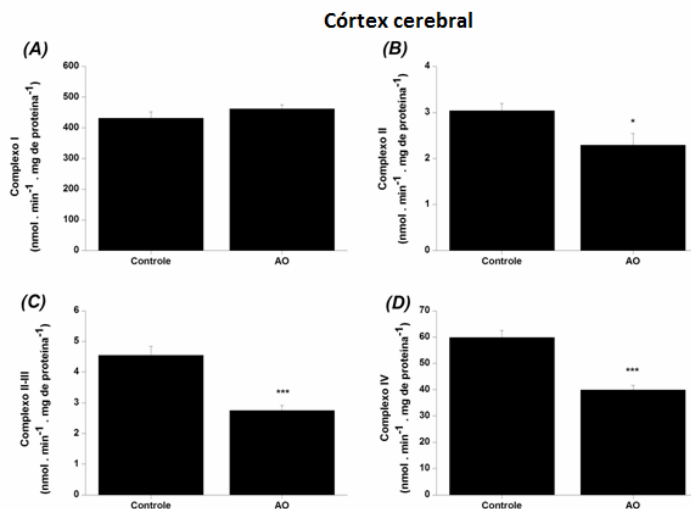


Figura 8. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre as atividades dos complexos (A) I, (B) II, (C) II-III e (D) IV da cadeia transportadora de elétrons em córtex cerebral de ratos com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

Adicionalmente, pode-se observar na figura 8 que a administração ICV de AO inibiu os complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial em estriado em comparação à administração de líquido cefalorraquidiano artificial (grupo controle).

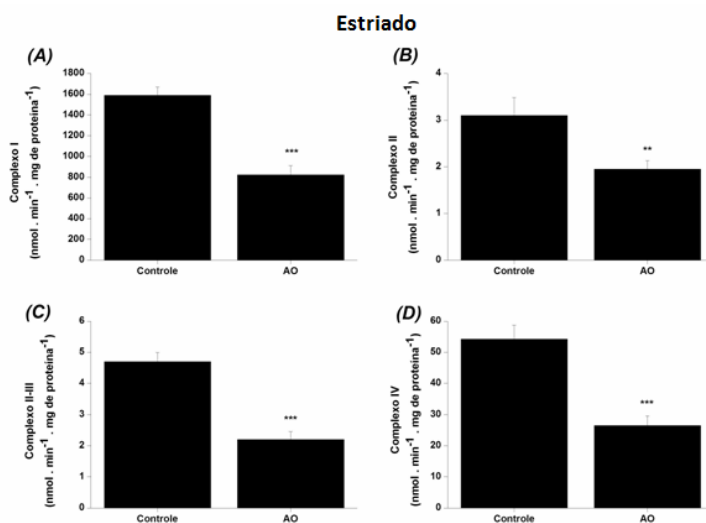


Figura 9. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre as atividades dos complexos (A) I, (B) II, (C) II-III e (D) IV da cadeia transportadora de elétrons em estriado de ratos com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

No hipocampo dos animais do grupo AO, foi evidenciada uma inibição dos complexos I, II e II-III em comparação ao grupo controle, sem qualquer alteração na atividade do complexo IV (Figura 9). Além disso, foram observadas inibições dos complexos II, II-III e IV da cadeia transportadora de elétrons em cerebelo (Figura 10).

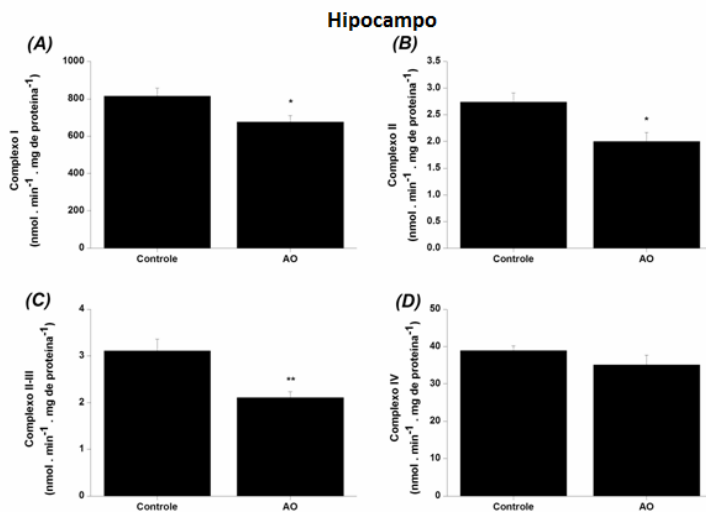


Figura 10. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre as atividades dos complexos (A) I, (B) II, (C) II-III e (D) IV da cadeia transportadora de elétrons em hipocampo de ratos com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle (Teste *t* de Student para amostras independentes).

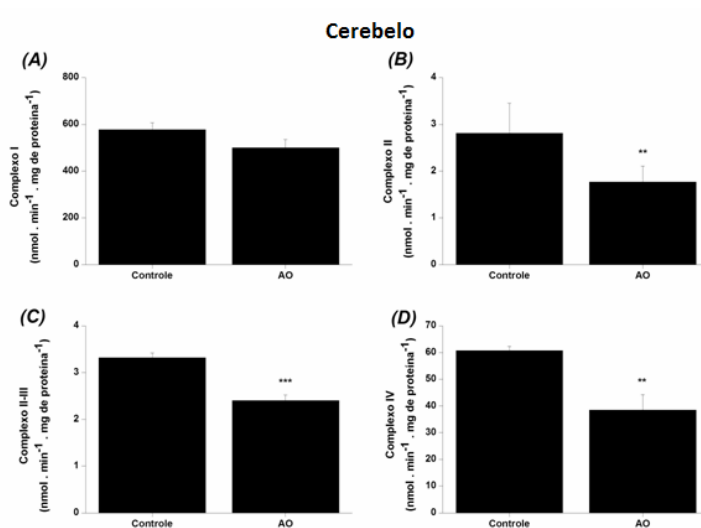


Figura 11. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre as atividades dos complexos (A) I, (B) II, (C) II-III e (D) IV da cadeia transportadora de elétrons em cerebello de ratos com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Na etapa seguinte deste estudo, foi avaliada a atividade da enzima CK nas estruturas cerebrais córtex, estriado, hipocampo e cerebello dos animais dos grupos controle e AO. A figura 11 demonstra que a administração ICV de AO aumentou a atividade dessa enzima em córtex cerebral (figura 11A) em comparação à administração de líquido cefalorraquidiano artificial. Por outro lado, esta mesma atividade enzimática foi inibida em hipocampo e cerebello desses animais (figuras 11C e 11D, respectivamente). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no corpo estriado desses animais (figura 11B).

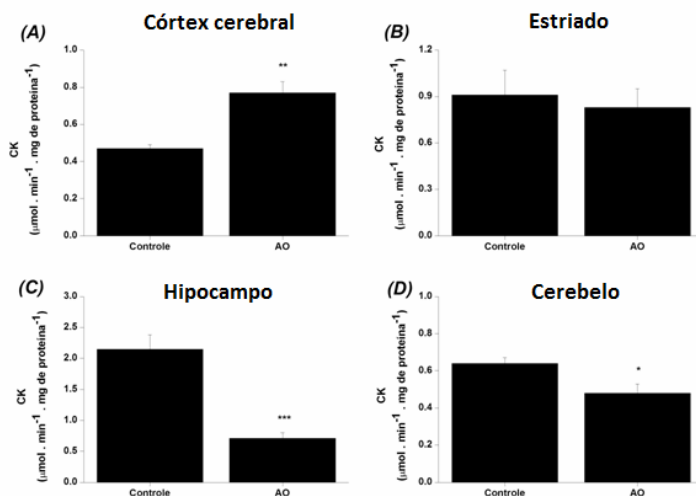


Figura 12. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima creatina cinase (CK) em (A) córtex cerebral, (B) estriado, (C) hipocampo e (D) cerebelo de ratos com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

Por fim, foram avaliadas as enzimas do ciclo de Krebs CS, SDH e MDH em estruturas cerebrais dos animais do grupo controle e do grupo AO. Houve uma diminuição da atividade da SDH em córtex cerebral dos animais do grupo AO em comparação ao grupo controle. Por outro lado, nessa estrutura houve um aumento estatisticamente significativo da atividade da enzima MDH no grupo de animais que receberam administração ICV de AO (figura 12).

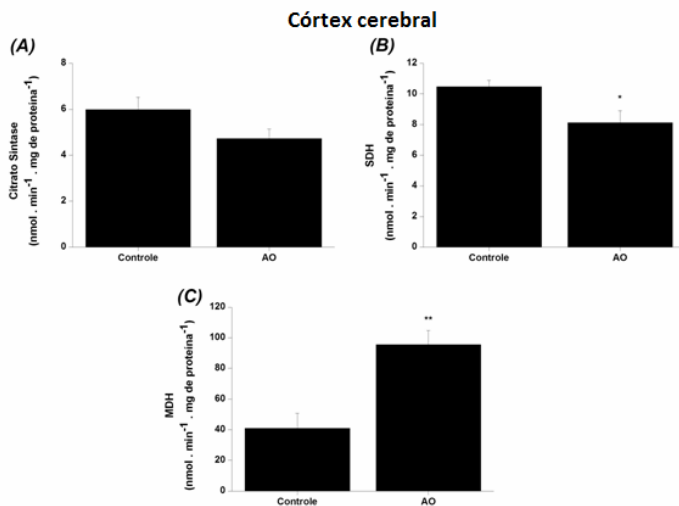


Figura 13. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade das enzimas (A) citrato sintase (CS), (B) succinato desidrogenase (SDH) e (C) malato desidrogenase (MDH) em córtex cerebral de ratos com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

Quando as mesmas atividades enzimáticas foram avaliadas em estriado, pôde-se observar uma inibição apenas da SDH nesta estrutura cerebral em ratos submetidos à administração ICV de AO (figura 13).

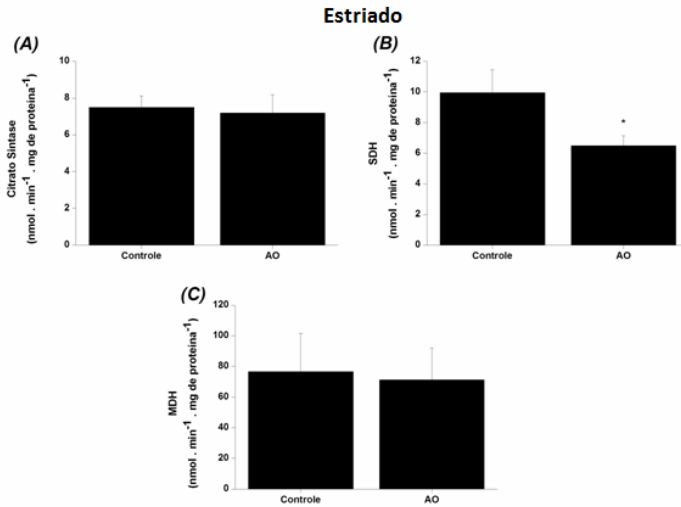


Figura 14. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade das enzimas (A) citrato sintase (CS), (B) succinato desidrogenase (SDH) e (C) malato desidrogenase (MDH) em estriado de ratos com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

A figura 14 mostra um aumento da atividade da enzima CS em hipocampo de animais 1 h após receberem administração ICV de AO em comparação ao grupo controle. Por outro lado, não houve alteração nas atividades das enzimas SDH e MDH.

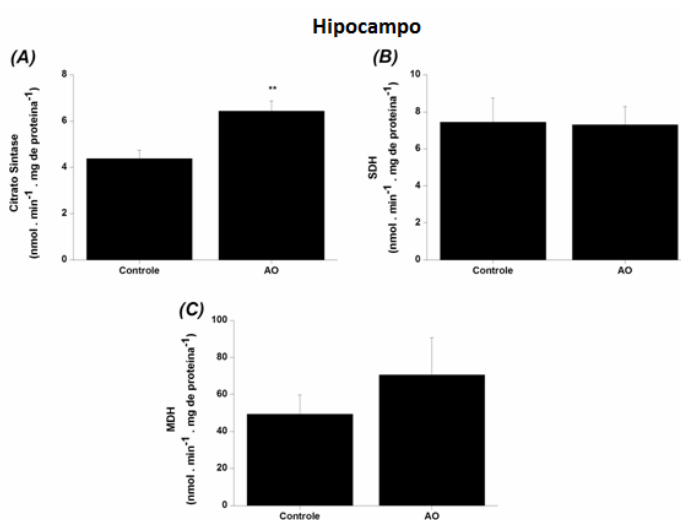


Figura 15. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade das enzimas (A) citrato sintase (CS), (B) succinato desidrogenase (SDH) e (C) malato desidrogenase (MDH) em hipocampo de ratos com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

Finalmente, foram avaliadas as atividades das enzimas CS, SDH e MDH em cerebelo de animais dos grupos que receberam uma administração de líquido cefalorraquidiano artificial (grupo controle) e AO (grupo AO). Nessa estrutura cerebral, a administração de AO inibiu a atividade da enzima SDH, sem afetar as demais atividades enzimáticas (figura 15).

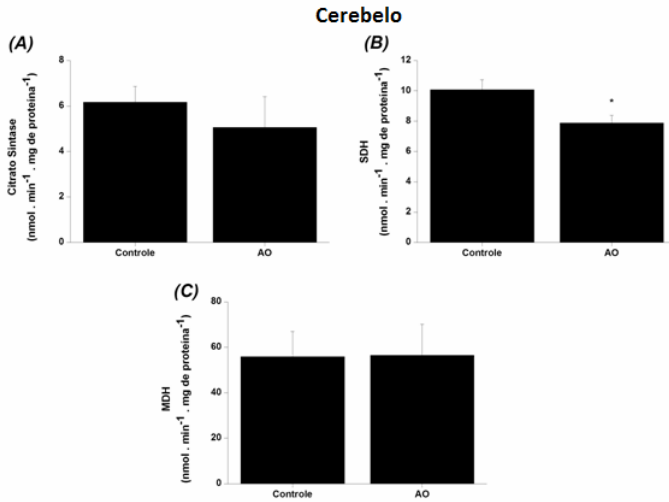


Figura 16. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade das enzimas (A) citrato sintase (CS), (B) succinato desidrogenase (SDH) e (C) malato desidrogenase (MDH) em cerebello de ratos com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média com 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou parâmetros bioenergéticos em estruturas cerebrais de ratos uma hora após serem submetidos à administração ICV de AO. Esse modelo experimental foi desenvolvido e utilizado tendo em vista que não há modelos animais in vivo de MCADD descritos na literatura, apenas estudos in vitro. A idade dos animais (60 dias) foi escolhida por corresponder à adolescência em seres humanos, período de intenso metabolismo, considerando-se que a MCADD pode se manifestar em qualquer período da vida, desde a infância até a idade adulta (Randall et al., 2015).

A MCADD é caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo do ácido graxo AO nos tecidos de pacientes e a sintomatologia é geralmente desencadeada após crises metabólicas provocadas por alta demanda energética (Jameson e Walter, 2015). Pacientes acometidos pela MCADD que sobrevivem às crises metabólicas apresentam dano neurológico grave (Lovera et al., 2012; Jameson e Walter, 2015), que tem sido atribuído à toxicidade dos metabólitos acumulados na doença (Wajner e Amaral, 2015). Carpenter et al. (2016) descrevem que as crises metabólicas cerebrais podem estar relacionadas a alterações na utilização de glicose como substrato energético e que a disfunção mitocondrial pode levar a um aumento de lactato com alto consumo de piruvato. Portanto, a acidemia láctica apresentada por pacientes afetados pela MCADD (Longo et al., 2008) é um forte indicativo de disfunção mitocondrial, o que torna a investigação do metabolismo energético cerebral de grande importância para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos dessa doença.

A investigação das atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons em diferentes estruturas cerebrais (córtex, corpo estriado, hipocampo e cerebelo) após a administração ICV de AO demonstrou um comprometimento da transferência de elétrons em todas as estruturas avaliadas. Os resultados aqui descritos vão de encontro a outros estudos anteriores, que demonstram que o AO in vitro não altera atividade de complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos (de Assis et al., 2003). Entretanto, deve-se considerar que in vivo tem-se um sistema complexo e intrincado, ocorrendo efeitos bioquímicos que não ocorrem in vitro. Além disso, o estudo publicado por de Assis et al (2003) avaliou apenas a atividade da cadeia respiratória mitocondrial em córtex cerebral, sem investigar o efeito do AO sobre outras estruturas cerebrais.

Neste contexto, a cadeia respiratória mitocondrial é responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico formado entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas através do bombeamento de prótons para este último. A manutenção desse gradiente eletroquímico é indispensável à síntese de ATP pela ATP sintase (Nicholls e Ferguson, 2013). Um comprometimento da transferência de elétrons, portanto, repercute na fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, na disponibilidade de energia para o adequado funcionamento celular. Reforçando a ideia de que a inibição de complexos da cadeia respiratória pelo AO pode levar a um prejuízo na síntese de ATP, Schuck et al. (2009b) demonstraram que esse ácido graxo altera o potencial de membrana bem como a eficiência na síntese de ATP. Esta situação torna-se mais grave em se tratando de tecidos com alta demanda energética, como o SNC. Torna-se importante ressaltar que a disfunção mitocondrial está envolvida em processos de neurodegeneração, visto que pode desencadear morte celular além da disfunção energética (Halliwell, 2001; Lee et al., 2009; Uittenbogaard e Chiamarello, 2014).

Alterações da transferência de elétrons também podem exacerbar a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), pela redução incompleta do oxigênio que se encontra no complexo IV da cadeia respiratória. Um excesso na produção de ERO em detrimento das defesas antioxidantes pode acarretar dano oxidativo a macromoléculas, tais como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge, 2015). Neste sentido, Schuck et al. (2009a) demonstraram que o AO in vitro induz dano oxidativo a lipídeos e diminui defesas antioxidantes não enzimáticas. Por outro lado, danos oxidativos causados a lipídeos, processo conhecido como peroxidação lipídica, produz como produto final aldeídos, dentre os quais se destaca o malondialdeído. Este metabólito, quando acumulado, inibe as atividades de complexos da cadeia respiratória e das enzimas mitocondriais PDH e KGDH em mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos (Long et al., 2009). Portanto, não se pode descartar o envolvimento de ERO, seja como causa ou como consequência, nas alterações da cadeia respiratória causadas pela administração de AO.

Adicionalmente ao prejuízo à transferência de elétrons, foram observadas alterações nas atividades de importantes enzimas do ciclo de Krebs, como CS, SDH e MDH. A atividade da CS, enzima regulatória do ciclo do ácido cítrico, foi aumentada em hipocampo de animais que

receberam AO em comparação ao grupo controle. De forma semelhante, a administração de AO provocou um aumento da atividade da enzima MDH em córtex cerebral. Esta enzima é uma oxirredutase que utiliza NAD⁺ como coenzima. Quando há um aumento desta atividade isoladamente, a razão NADH/NAD⁺ aumenta, diminuindo a disponibilidade de NAD⁺ para outras desidrogenases mitocondriais, incluindo a PDH, diminuindo a síntese de acetil-CoA para o ciclo de Krebs (Igamberdiev et al., 2014), bem como das enzimas IDH e KGDH, exacerbando a inibição desta via metabólica. Com uma inibição da PDH, há acúmulo de piruvato no citosol, o qual é destinado à redução a lactato pela enzima LDH. Assim, um aumento da atividade da MDH pode levar, indiretamente, a um aumento dos níveis de lactato (Igamberdiev et al., 2014), como observado por pacientes afetados pela MCADD. Por outro lado, a atividade da SDH foi inibida em córtex cerebral, estriado e cerebelo, sem apresentar qualquer alteração em hipocampo. A inibição da atividade da SDH poderia explicar, ao menos em parte, a inibição do complexo II da cadeia respiratória nesses tecidos, visto que é parte integrante deste complexo enzimático (Kirby et al., 2007; Lunt e Vander Heiden, 2011; Nelson e Cox, 2014). Neste contexto, Reis de Assis e colaboradores (2004) demonstraram que o AO *in vitro* inibe a produção de ¹⁴CO₂ a partir de [1-¹⁴C]acetato, corroborando os achados de inibição do ciclo de Krebs demonstrados no presente estudo..

A atividade da enzima CK também foi avaliada no modelo animal utilizado no presente estudo. Observou-se um aumento dessa atividade enzimática em córtex cerebral de animais submetidos à administração de AO. Por outro lado, esta atividade foi inibida em hipocampo e cerebelo desses mesmos animais em comparação aos animais do grupo controle. A CK apresenta diferentes isoformas, estando tanto no citosol quanto no espaço intermembranas na mitocôndria (Wegmann et al., 1991). A isoforma citosólica dessa enzima apresenta estrutura dimérica, enquanto que a mitocondrial é um octâmero. Sabe-se que ambas isoformas de CK possuem em seu sítio ativo resíduos de cisteína, aminoácido com grupo sulfidril suscetível à oxidação, especialmente o resíduo de cisteína 278, crítico para a atividade da enzima (Yuan et al., 1992). Além disso, grupos sulfidril desempenham papel importante na associação/dissociação dos dímeros e octâmeros da estrutura enzimática da CK (Lipskaya, 2001). Portanto, pode-se especular que o estresse oxidativo induzido pelo AO (Schuck et al., 2009a) provoque a oxidação de tais grupos sulfidril, levando à inibição

da atividade enzimática da CK. Nesse contexto, os diferentes resultados encontrados nas diferentes estruturas cerebrais podem se dever às diferenças de suscetibilidade das diferentes regiões do SNC às ERO, visto que, no SNC, a concentração de neutransmissores passíveis de serem oxidados e de íons ferro é diferente nas estruturas cerebrais (Barbosa et al.; 2006; Halliwell e Gutteridge, 2015).

Estudos demonstraram que a dissociação da estrutura octamérica é essencial para a correta função da CK mitocondrial, necessária para a manutenção da respiração celular, pois auxilia no transporte de ATP para o citosol e a regeneração de ADP para a fosforilação oxidativa (Khuchua et al., 1998; Schlattner and Wallimann, 2000; Guzun et al., 2012). Além disso, a estabilidade estrutural do octâmero da CK mitocondrial é fundamental para a regulação do poro de transição mitocondrial. A enzima interage funcionalmente com duas proteínas integrais, o translocador de nucleotídeos de adenina, localizado na membrana mitocondrial interna, e a porina, presente na membrana mitocondrial externa (Bessman and Carpenter, 1985; Wallimann et al., 1992; Wyss et al., 1992). A abertura do poro de transição mitocondrial leva à liberação de citocromo c da membrana mitocondrial interna para o citosol, desencadeando a ativação de caspases e, conseqüentemente, morte celular por apoptose (Datler et al., 2014).

A CK é de extrema importância para tecidos com alta demanda energética, como o cérebro. O sistema PCr/CK atua no tamponamento energético, com rápida regeneração de ATP e se localiza próximo a sítios celulares de consumo de ATP, tais como a Na⁺,K⁺-ATPase (Schlattner et al., 2016). Alterações no funcionamento desse sistema pode acarretar, portanto, alterações do gradiente iônico e do potencial de membrana celular e, conseqüentemente, da neurotransmissão. Adicionalmente, a apresentação clínica da deficiência congênita de Cr cerebral caracteriza-se por atraso no neurodesenvolvimento, como a linguagem nos primeiros anos de vida e, posteriormente, deficiência intelectual, movimentos extrapiramidais e epilepsia (Malheiro et al., 2012). Tais sintomas também são apresentados por pacientes acometidos pela MCADD que evoluem com sequelas neurológicas.

Dentre as estruturas cerebrais avaliadas, observou-se que o córtex foi a mais afetada pela administração ICV de AO, já que, no presente estudo, os resultados demonstraram alterações nas atividades dos complexos II, II e III e IV da cadeia respiratória e das enzimas CK, SDH

e MDH. O córtex cerebral é uma fina camada de substância cinzenta (1 a 4 mm) que reveste o centro branco medular do cérebro. Anatomicamente, pode-se classificar o córtex em sulcos, giros e lobos e, funcionalmente, em áreas de projeção e em áreas de associação. As principais funções do córtex são interpretação dos impulsos sensitivos, comando dos movimentos voluntários e também está relacionado a processos cognitivos e a transtornos psiquiátricos (Machado, 2006).

O metabolismo energético cerebral é crucial para a execução de processos celulares necessários para o desenvolvimento do cérebro e para seu funcionamento adequado, incluindo síntese de ATP, formação de sinapses e síntese, liberação e transporte de neurotransmissores, auxiliando também na manutenção dos gradientes iônicos e do estado redox celular (Mckenna e Scafidi, 2015). O cérebro utiliza primordialmente glicose como substrato energético, mas pode utilizar corpos cetônicos em casos extremos, como em situações de jejum prolongado ou catabolismo exacerbado (Schönfeld e Reiser, 2013). Neste cenário, associada à deficiência de disponibilidade de substratos energéticos devido à hipoglicemia e à hipocetose apresentada por pacientes acometidos pela MCADD (Lovera et al., 2012), a disfunção mitocondrial ocasionada por metabólitos acumulados como o AO pode comprometer a bioenergética cerebral dos pacientes, levando aos danos neurológicos por eles apresentados.

Tomados em conjunto, os achados do presente estudo demonstram que a administração ICV de AO induz significativas alterações no metabolismo energético cerebral, especialmente na função mitocondrial. Mais estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos pelos quais o AO exerce seus efeitos neurotóxicos, colaborando para o melhor entendimento da fisiopatologia do dano cerebral apresentado por pacientes acometidos pela MCADD.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração ICV de AO ocasionou alterações nas atividades dos complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons e em enzimas do ciclo de Krebs, bem como da atividade da enzima CK, indicando um comprometimento do metabolismo energético cerebral.

REFERÊNCIAS

- Alderson RF, Alterman AL, Barde YA, Lindsay RM. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron*. 1990; 297-306.
- Amaral AU, Cecatto C, da Silva JC, Wajner A, Godoy Kdos S, Ribeiro RT, Wajner M. cis-4-Decenoic and decanoic acids impair mitochondrial energy, redox and Ca(2+) homeostasis and induce mitochondrial permeability transition pore opening in rat brain and liver: Possible implications for the pathogenesis of MCAD deficiency. *Biochim Biophys Acta*. 2016 ;1857(9):1363-72.
- Andresen BS, Dobrowolski SF, O'Reilly L, Muenzer J, McCandless SE, Frazier DM, Udvari S, Bross P, Knudsen I, Banas R, Chace DH, Engel P, Naylor EW, Gregersen N. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mutations identified by MS/MS-based prospective screening of newborns differ from those observed in patients with clinical symptoms: identification and characterization of a new, prevalent mutation that results in mild MCAD deficiency. *American Journal of Human Genetics*. 2001;(68):1408–1418.
- Andresen BS, Lund AM, Hougaard DM. “MCAD de ciencia in Denmark,” *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012;(106): 175-188.
- Barbosa LF, Medeiros MHG, Augusto O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Quím. Nova*. 2006;(29): 1352-1360.
- Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurological illnesses?. *Annals of Neurology*. 1992; (31): 119-130.
- Bennett MJ, Rinado P, Staruss AW. Inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2000; 37(1):1-44.
- Bennett MJ, Rinaldo P, Millington DS, Tanaka K, Yokota I, Coates PM. Mediumchain acylCoA dehydrogenase deficiency: postmortem diagnosis in a case of sudden infant death and neonatal diagnosis of an affected sibling. *Pediatr Pathol*. 1991;(11):89-95.

Berg D, Youdim MB. Role of iron in neurodegenerative disorders. *Top. Magn. Reson. Imaging*. 2006; 5-17.

Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Bioquímica*. 6ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

Bergman O, Ben-Shachar D. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System (OXPHOS) Deficits in Schizophrenia: Possible Interactions with Cellular Processes. *Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne de Psychiatrie*. 2016; 61(8); 57-69.

Bessman SP; Carpenter CL. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annual Review of Biochemistry* 1985;(54): 831– 862.

Blass JP, Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *Journal of Neuroscience Research*. 2001;(66): 851-856.

Bolaños JP, Heales SJR. Persistent Mitochondrial Damage by Nitric Oxide and its Derivatives: Neuropathological Implications. *Frontiers in Neuroenergetics*. 2010;(2):1-10.

Brancaccio P, Maffulli N, Buonauro R, & Limongelli, FM. Serum Enzyme Monitoring in Sports Medicine. *Clinics in Sports Medicine*. 2008; 27(1): 1-18.

Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull* 2007;(1): 81-82.

Brennan WA; Bird ED; Aprille JR. Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *Journal of Neurochemistry*. 1985;(44): 1948-1950.

Brenner RR. Biosynthesis and interconversion of essential fatty acids. In: A. L. Willis. *Handbook of eicosanoids: prostaglandins and related lipids. Chemical and biochemical aspects, part A*, Florida (USA): CRC Press. 1987; (1):99-117.

Carpenter KLH, Czosnyka M, Jalloh I, Newcombe VFJ, Helmy A, Shannon RJ, et al;. *Systemic, Local, and Imaging Biomarkers of Brain*

Injury: More Needed, and Better Use of Those Already Established? *Front Neurol.* 2015;(6):26-29.

Cassina A, and Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxyntirite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996;(328):309-316.

Castro MB. Efeitos da administração aguda de galactose sobre o estado redox celular em estruturas cerebrais de ratos jovens [tese]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense;2016.

Clark JB; Bates TE; Cullingford T; Land JM. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. *Developmental Neuroscience.* 1993;(15):174-180.

Clarkson PM, Hubal MJ. Exercise-induced muscle damage in humans. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation.* 2002;(81):52-69.

Costabeber E, Kessler A, Severo Dutra-Filho C, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *Int J Dev Neurosci.* 2003;(2):11-6.

Datler C, Pazarentzos E, Mahul-Mellier A-L, et al. CKMT1 regulates the mitochondrial permeability transition pore in a process that provides evidence for alternative forms of the complex. *Journal of Cell Science.* 2014;127(8):1816-1828.

De Assis DR, Ribeiro CAJ, Rosa RR, Schuck PF, Dalcin KB, Vargas CR, Wannmacher CMD, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Briones P, Wajner M. Evidence that antioxidant prevent the inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity induced by octanoic acid in rat cerebral cortex in vitro. *Neurochemical Research.* 2003;(1):255-1263.

Derks TG, Reijngoud DJ, Waterham HR, Gerver WJ, Van Den Berg MP, Sauer PJ, Smit GP. The natural history of medium-chain acyl CoA dehydrogenase deficiency in the Netherlands. *Journal Pediatrics.* 2006; (148): 665-670.

Derks TG, Touw CM, Ribas GS, Biancini GB, Vanzin CS, Negretto G, Mescka CP, Reijngoud DJ, Smit GP, Wajner M, Vargas CR.

Experimental evidence for protein oxidative damage and altered antioxidant defense in patients with mediumchain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2014;(37):783-9.

Di Donato S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis.* 2000;(23):247-263.

Dickinson CJ, Cerebral Oxidative Metabolism in Hypertension. *Clinical Science.* 1996; 539-550.

Egidio RJ, Francis GL, Coates PM, Hale DE, Roesel AA. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *American Family Physician.* 1989; 221-226.

Elkind MS, Valerie Gartner M, Peter McGuire AJ, & Paul Lee, Mbbc. R. *Child Neurology: Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency.* *Neurology.* 2015; 37-40.

Federico A, Cardaioli E, Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences.* 2012; (322):254-262.

Ferreira GC, Tonin A, Schuck PF, Viegas CM, Ceolato PC, Latini A, Perry ML, Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM, Vargas CR, Wajner M. Evidence for a synergistic action of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids disturbing rat brain energy metabolism. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 2007;(25):391-398.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1985; (153):23-26.

Gramer, Gisela Haege, Junmin Fang-Hoffmann, Georg F. Hoffmann, Claus R. Bartram, Katrin Hinderhofer, Peter Burgard, Martin Lindner. *Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Evaluation of Genotype-Phenotype Correlation in Patients Detected by Newborn Screening.* *JIMD Rep.* 2015; (23): 101-112.

Gregersen N, Andresen BS, Pedersen CB, Olsen RK, Corydon TJ, Bross P. Mitochondrial fatty acid oxidation defects-remaining challenges. *Journal Inherit Metabolic Disease*.2008; 643-657.

Gregersen N, Lauritzen R, Rasmussen K. Suberylglycine excretion in the urine from a patient with dicarboxylic aciduria. *Clin Chim Acta*. 1976;(70):417-25.

Grimm S. Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;(5): 65-72.

Grosse SD. The epidemiology of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: An update. *Genetics in Medicine*. 2006; 205-212.

Guimarães-Ferreira L. Role of the phosphocreatine system on energetic homeostasis in skeletal and cardiac muscles. *Einstein (São Paulo)*. 2014;(1): 126-131.

Guzun R, Gonzalez-Granillo M, Karu-Varikmaa M, Grichine A, Usson Y, Kaambre T, Guerrero-Roesch K, Kuznetsov A, Schlattner U, Saks V. Regulation of respiration in muscle cells in vivo by VDAC through interaction with the cytoskeleton and MtCK within Mitochondrial Interactosome. *Biochim Biophys Acta*. 2012; (1818):1545-54.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5a edição. Oxford University Press, Oxford. 2015.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci*. 1996; (8):22-26.

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 2001;(18):685-716.

Heales SJ; Bolanos JP; Stewart VC; Brookes PS; Land JM; Clarck JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999; (1410): 215-228

Heubi JE, Partin JC, Partin JS, Schubert WK. Reye's syndrome: Current concepts. *Hepatology*. 1987; 155-164.

Heuvel L, L.V.; Smeitink, J. The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: nuclear genes and human genetic diseases. *BioEssays*. 2001;(23): 518- 525,.

Hoffmann GF, Von Kries R, Klose D, et al. Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur J Pediatr*. 2004;(163):76-80.

Hoffmann GF. Selective screening for inborn errors of metabolism – past, present and future. *Eur J Pediatr* 1994; (1): 2-8.

Iafolla AK, Thompson RJ, Roe CR .Medium-chain acylcoenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical course in 120 affected children. *J Pediatr*. 1994; (124):409-415.

Igamberdiev AU, Lernmark U, Gardeström P. Activity of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex in plants is stimulated in the presence of malate. *Mitochondrion*. 2014;(19):184-90.

Infante JP, Huszagh VA. On the molecular etiology of decreased arachidonic (20:4n-6), docosapentaenoic (22:5n-6) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids in Zellweger syndrome and other peroxisomal disorders. *Mol Cell Biochem*. 1997; 168(1-2): 101-115.

Jameson E, Walter JH. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Paediatr Child Health (Oxford)*. 2015; (3):145-148.

Kelly D, Gordon J, Alpers R, Strauss AW. The tissue-specific expression and developmental regulation of two nuclear genes encoding rat mitochondrial proteins. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase and mitochondrial malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem*. 1989;18921–18925.

Kelly DP, Kim JJ, Billadello JJ, Hainline BE, Chu TW, Strauss AW. Nucleotide sequence of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase mRNA and its expression in enzyme-deficient human tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(12):4068-4072.

Kelly DP, Whelan AJ, Ogden ML, Alpers R, Zhang ZF, Bellus G, Gregersen N, Dorland L, Strauss AW. Molecular characterization of

inherited medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Proc Nat Acad Sci.* 1990;(87):9236-4

Khuchua, ZA, Qin W, Boero J, Cheng J, Payne RM, Saks VA, Strauss AW. Octamer formation and coupling of cardiac sarcomeric mitochondrial creatine kinase are mediated by charged N-terminal residues. *J. Biol. Chem.* 1998; (273): 22990–22996.

Kirby DM, Thorburn DR, Turnbull DM, & Taylor RW. Biochemical Assays of Respiratory Chain Complex Activity. *Methods in Cell Biology.* 2007; (06): 93-119.

Kitto GB. Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart. *Methods Enzymol XIII.* 1969; 106-116.

Lang TF. Adult presentations of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD). *J Inherit Metab Dis.* 2009;(32):675-683.

Latini A, da Silva CG, Ferreira GC, Schuck PF, Scussiato K, Sarkis JJ, Dutra Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M. Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab.* 2005; (86):188-99.

Latini A, Scussiato K, Rosa RB, Leipnitz G, Llesuy S, Bello-Klein A, Dutra-Filho CS, Wajner M. Induction of oxidative stress by L-2-hydroxyglutaric. *Eur. J. Neurosci.* 2003a; 217-222.

Leach EL, Shevell M, Bowden K, Stockler-Ipsiroglu S, van Karnebeek CD. Treatable inborn errors of metabolism presenting as cerebral palsy mimics: systematic literature review. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2014; 9:197.

Leao, Letícia Lima; AGUIAR, Marcos José Burle de. Triagem neonatal: o que os pediatras deveriam saber. *J. Pediatr. (Rio J.), Porto Alegre.* 2008; (84): 80-90.

Lee J, Boo JH, Ryu H. The failure of mitochondria leads to neurodegeneration: Do mitochondria need a jump start? *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61(14):1316-23.

Lee PJ, Harrison EL, Jones MG, Jones S, Leonard JV, Chalmers RA. L-carnitine and exercise tolerance in medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD) deficiency: a pilot study. *Journal Inherited Metabolic Disease*. 2005; (28):141-152.

Lim KC, Lim ST, Federoff HJ. Neurotrophin secretory pathways and synaptic plasticity. *Neurobiology of Aging*. 2003; 1135-1145.

Lin Y S, Cheng TH, Chang CP, Chen H M, & Chern Y. Enhancement of brain-type creatine kinase activity ameliorates neuronal deficits in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2013; (6): 742-753.

Lipskaya, TY. Mitochondrial creatine kinase: properties and function. *Biochemistry*. 2001; (66): 1361-1376.

Long J, Liu C, Sun L, Gao H, Liu J. Neuronal mitochondrial toxicity of malondialdehyde: inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in rat brain mitochondria. *Neurochem Res*. 2009;(34):786-794,.

Longo N, Schrijver I, Vogel H, Pique LM, Cowan TM, Pasquali M, Steinberg GK, Hedlund GL, Ernst SL, Gallagher RC, Enns GM. Progressive cerebral vascular degeneration with mitochondrial encephalopathy. *Am J Med Genet A*. 2008;(3):361-367.

Lovera C, Porta F, Caciotti A, Catarzi S, Cassanello M, Caruso U, Gallina MR, Morrone A, Spada M. Sudden unexpected infant death (SUDI) in a newborn due to medium chain acyl CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency with an unusual severe genotype. *Ital J Pediatr*. 2012;(38):59.

Lowry OH, RosebroughvNJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;(193): 265-275.

Lunt SY, & Vander Heiden MG. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2011;(1): 441-464.

Machado, Angelo B.M.; Haertel, Lúcia Machado. *Neuroanatomia funcional*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

Macongonde EA, Vilela TC, Scaini G, Gonçalves CL, Ferreira BK, Costa NL, de Oliveira MR, Avila Junior S, Streck EL, Ferreira GC, Schuck PF. Evaluation of the In Vivo and In Vitro Effects of Fructose on Respiratory Chain Complexes in Tissues of Young Rats. *Dis Markers*. 2015;(31):25-30.

Malheiro R, Diogo L, Garcia P, Fineza I, & Oliveira G. [Cerebral creatine deficiency syndromes]. *Acta Médica Portuguesa*. 2012;(6): 89-98.

Matern D, Rinaldo P. Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. 2000 Apr 20 [Updated 2015 Mar 5]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016.

Matsubara Y, Kraus JP, Yang-Feng TL, Francke U, Rosenberg LE, Tanaka K. Molecular cloning of cDNAs encoding rat and human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase and assignment of the gene to human chromosome 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(17):6543-6547.

Matsubara Y; Narisawa K; Tada K. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: molecular aspects. *European Journal of Pediatric*. 1992; (151): 154-159.

McKenna MC, Scafidi S, Robertson CL. Metabolic alterations in developing brain after injury: knowns and unknowns. *Neurochem Res*. 2015;(12): 27-43.

McKinney TJ Long NS, Hahn H D. Matern,cP. Rinaldo AW. Strauss and SF Dobrowolskia, Rapid, comprehensive screening of the human medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2004; (82); 112-120.

Moshkova AN, Yerlykina EI, Khvatova EM, Dependence between mitochondrial creatine kinase activity and ATP level in the brain ischemia, *Biomeditsinskaya khimiya*. 2009; (55):759-765.

Moussaieff A, Kogan N. M., & Aberdam, D. Concise Reviews: Energy Metabolites: Key Mediators of the Epigenetic State of Pluripotency. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2011;(8):74-80.

Murray RK; Mayes DKG; Rodwell VW. Harper: bioquímica. 9.ed São Paulo: Atheneu. 2002.

Najdekr L, Gardlo A, Mádrová L, Friedecký D, Janečková H, Correa ES, Goodacre R, Adam T. Oxidized phosphatidylcholines suggest oxidative stress in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Talanta*. 2015; (1): 39-62.

Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. Worth Publishers, New York. 2000; 1152.

Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6a ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Nelson J, Lewis B, Walters B. The HELLP syndrome associated with fetal medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis*. 2000;(23):18-9.

Nelson. Tratado de Pediatria - Richard E. Behrman, Hal B. Jenson, Robert Kliegman. 18ª Edição. Elsevier. 2009.

Nicholls DG, Ferguson S. Bioenergetics. 4ª edição, Academic Press, 2013.

Oerton J, Khalid JM, Besley G, Dalton RN, Downing M, et al. Newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in England: prevalence, predictive value and test validity based on 1.5 million screened babies. *J Med Screen* 2011;(18):73-81.

Olson JE, Holtzman D, Sankar R, Lawson C, Rosenberg R. Octanoic acid inhibits astrocyte volume control: implications for cerebral edema in Reye's syndrome. *Journal of Neurochemistry*. 1989; 1197-1202.

Onkenhout W, Venizelos V, Van der poel PFH, Van der heuvel MPM, Poorthuis BJHM. Identification and quantification of intermediates of unsaturated fatty acid metabolism in plasma of patients with fatty acid oxidation disorders. *Clinical Chemistry*. 1995;1467-1474.

Randall M, Rolf C, Gibson SM, Hall PL, Rinaldo P, Davis GJ. Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Adulthood: A Potential

Diagnosis in a Patient with Mental Status Changes Suspected of Drug Toxicity. *J Forensic Sci.* 2015; (4):1-3.

Reis de Assis D, Maria RC, Borba Rosa R, Schuck PF, Ribeiro CA, da Costa Ferreira G, Dutra-Filho CS, Terezinha de Souza Wyse A, Duval Wannmacher CM, Santos Perry ML, Wajner M: Inhibition of energy metabolism in cerebral cortex of young rats by the mediumchain fatty acids accumulating in MCAD deficiency. *Brain Res* 2004;(1030):141-151.

Rhead WJ. Newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: A global perspective. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29 (2–3): 370–377.

Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ. Fatty acid oxidation disorders. *Annual Review of Physiology.*2002; 477-502.

Rinaldo P, Studinski AL, Matern D. Prenatal diagnosis of disorders of fatty acid transport and mitochondrial oxidation. *Prenat Diagn.* 2001;(21):2-4.

Roe CR, Ding J. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. NY, McGraw-Hill. 2001; 2297-2326.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich. A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta.* 1994;(228):35-51.

S. Anderson, C. Botti, B. Li et al., “Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency detected among Hispanics by New Jersey newborn screening,” *e American Journal of Medical Genetics.*2012; (158); 2100-2105.

Saudubray JM, Martin D, de Lonlay P, Touati G, Poggi TF, Bonnet D, Jouvet P, Boutron M, Slama A, Vianey SC, Bonnefont JP, Rabier D, Kamoun P, Brivet M Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. *J Inherit Metab Dis.* 1999; (22):488-502.

Scaini G, Simon KR, Tonin M, Busanello ENB, Moura AP, Ferreira GC, Wajner M, Streck EL, Schuck PF. Toxicity of octanoate and decanoate in rat peripheral tissues: evidences of bioenergetics dysfunction and oxidative damage induction in liver and skeletal muscle. *Molecular and Cell Biochemistry*. 2012; 329-335.

Schiaffino S, Reggiani C, Kostrominova TY, Mann M, Murgia M. Mitochondrial specialization revealed by single muscle fiber proteomics: focus on the Krebs cycle. *Scand J Med Sci Sports*. 2015; (4):41-8.

Schlattner U, Klaus A, Ramirez Rios S, Guzun R, Kay L, Tokarska-Schlattner M. Cellular compartmentation of energy metabolism: creatine kinase microcompartments and recruitment of B-type creatine kinase to specific subcellular sites. *Amino Acids*. 2016;(8):51-74.

Schlattner U; Wallimann T. Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. *The J. of Biological. Chem.*, 2000; (275): 17314-17320.

Schönfeld, P., Reiser, G. Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2013; (10): 3-9.

Schuck PF, Ceolato PC, Ferreira GC, Tonin A, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Latini A, Wajner M. Oxidative stress induction by cis-4-decenoic acid: relevance for MCAD deficiency. *Free Radic Res* 2007;41(11):1261-72.

Schuck PF, Ferreira GC, Moura AP, Busanello EN, Tonin AM, Dutra-Filho CS, Wajner M. Medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency elicit lipid and protein oxidative damage and decrease non-enzymatic antioxidant defenses in rat brain. *Neurochem Int*. 2009a; (8):519-25.

Schuck PF, Ferreira GC, Tonin AM, Viegas CM, Busanello E NB, Moura AP, Zanatta A, Klamt F, Wajner M. Evidence that the major metabolites accumulating in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency disturb mitochondrial energy homeostasis in rat brain. *Brain Research*. 2009b; 117-126.

Schuck PF, Busanello EN, Moura AP, Tonin AM, Grings M, Ritter L, Vargas CR, Ferreira GC, Wajner M. Promotion of lipid and protein oxidative damage in rat brain by ethylmalonic acid. *Neurochem Res.* 2010; (35): 298-305.

Schuck, P.F.; Rosa, R.B.; Pettenuzzo, L.F.; Sitta, A.; Wannmacher, C.M; Wyse, A.T.; Wajner, M. Inhibition of mitochondrial creatine kinase activity from rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochemistry International.* 2004;(45): 661-667.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS. and Valle D, editors . *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.* 2011;(3):34-38.

Smeitink J.; Van Den Heuvel, L.; Dimauro, S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nature, London,*2001; (2): 342-352.

Smith CM, Marks AD, Lieberman M. *Bioquímica médica básica de marks: uma abordagem clínica.* 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.

Smith CM, MARKS AD, Lieberman MA. *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach.* 2ª ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 2005.

Srere PA. Citrate synthase. *Methods in Enzymology .* 1969; (3):11-13.

Tanaka, K. Molecular cloning of cDNAs encoding rat and human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase and assignment of the gene to human chromosome 1. *Proc. Nat. Acad. Sci.*1986; (83): 6543-6547.

Thevenet J, De Marchi U, Domingo JS, Christinat N, Bultot L, Lefebvre G, Sakamoto K, Descombes P, Masoodi M, Wiederkehr A. Medium-chain fatty acids inhibit mitochondrial metabolism in astrocytes promoting astrocyte-neuron lactate and ketone body shuttle systems. *FASEB J.* 2016;30(5):13-26.

Thodi G, Georgiou V, Molou E, Loukas YL, Dotsikas Y, Biti S, Papadopoulos K, Doulgerakis E. Characterization of the molecular spectrum of Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in a

Greek newborns cohort: identification of a novel variant. *Clin Biochem.* 2012; (45):1167-72.

Tomimoto H; Yamamoto K; Homburger HA; Yanagihara T. Immunoelectron microscopic investigation of creatine kinase BB-isoenzyme after cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathologica.* 1993; (86): 447- 455.

Tonin A.M., Grings M., Knebel L.A., Zanatta A., Moura A.P., Ribeiro C.A., Leipnitz G., Wajner M. Disruption of redox homeostasis in cerebral cortex of developing rats by acylcarnitines accumulating in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2012;(30):383-390.

Uittenbogaard M, Chiaramello A. Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des.* 2014; (35):74-93.

Viegas CM; Da Costa Ferreira G; Schuck PF; Tonin AM; Zanatta A; De Souza Wyse AT; Dutra-Filho CS; Wannmacher CM; Wajner M. Evidence that 3-hydroxyisobutyric acid inhibits key enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of young rats. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 2008; 26: 293-299.

Voet D; Voet JG; Pratt CW. *Fundamentos de bioquímica.* 2 ed. Porto Alegre: Artmed. 2008; 931.

Wajner M, Amaral AU. Mitochondrial dysfunction in fatty acid oxidation disorders: insights from human and animal studies. *Biosci Rep.* 2015;(1):10-18.

Wajner M, Sirtori LR, Goulart L, Chiochetta M, Coelho DM, Latini A, Llesuy S, Bello-Klein A, Giugliani R, Deon M, Mello CF. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012: 26-32

Wajner M, Wannmacher CMD, Gaidzinski D, Dutra-Filho CS. Detection of inborn errors of metabolism in patients of paediatric intensive care units of Porto Alegre, Brazil. Comparison between the prevalence of such disturbances in a selected and an unselected sample. *Braz J Gen.* 1986; (9):31-40.

Wallace, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 1999. 283, 1482-1488

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka, D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis. *Biochem. J*. 1992; (1): 21-40

Wegmann G, Huber R, Zanolla E, Eppenberger HM, Wallimann T, Differential expression and localization of brain-type and mitochondrial creatine kinase isoenzymes during development of the chicken retina: Mi-CK as a marker for differentiation of photoreceptor cells. *Differentiation*. 1991; (46): 77-87.

Wilcken B, Haas M, Joy P, Wiley V, Chaplin M, Black C, Fletcher J, McGill J, Boneh A. Outcome of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: a cohort study. *Lancet*. 2007; (369):37-42.

Wyss M; Smeitin KJ; Wevers RA; Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochemical et Biophysica Acta*. 1992; (1102): 119-166.

Yuan G, Kaneko M, Masuda H, Hon RG, Kobayashi A, Yamazak N. Decrease in heart mitochondrial creatine kinase activity due to oxygen free radical. *Biochim. Biophys. Acta*. 1992; (140): 78-84.

Zahid S, Oellerich M, Asif AR, Ahmed N. Differential expression of proteins in brain regions of Alzheimer's disease patients. *Neurochem Res*. 2014; (1):8-15.

Zhang ZF, Kelly DP, Kim JJ, Zhou Y, Ogden ML, Whelan AJ, Strauss AW. Structural organization and regulatory regions of the human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Biochemistry*. 1992; (31): 81-89.

Zheng, J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (review). *Oncology Letters*. 2012; (6): 1151-1157.

ANEXO

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 090/2013-2

Professor Responsável: Patrícia Fernanda Schuck.

Equipe: Emilio Luiz Streck, Gustavo da Costa Ferreira, Alexandra Ioppi Zugno, Bruna Klippel Ferreira, Hugo Galvane Zapelini, Marina Lummerz Magenís, Clarissa Martinelli Comin, Diogo Dominguíni, Felipe Dal Pizzol, Fabricia Cardoso Petronilho, João Quevedo, Mauricio Reis Bogo, Luiza Wilges Kist, Giselli Scaini e Andrea Cristina Ramos.

Título: “Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanóico sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos: possível papel protetor do ômega 3”.

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização de 240 Ratos Wistar 60 dias 220 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 090/2013-2

Principal Investigator: Patrícia Fernanda Schuck.

Researchers: Emilio Luiz Streck, Gustavo da Costa Ferreira, Alexandra Ioppi Zugno, Bruna Klippel Ferreira, Hugo Galvane Zapelini, Marina Lummerz Magenís, Clarissa Martinelli Comin, Diogo Dominguíni, Felipe Dal Pizzol, Fabricia Cardoso Petronilho, João Quevedo, Mauricio Reis Bogo, Luiza Wilges Kist, Giselli Scaini e Andrea Cristina Ramos.

Project title: “Effects of intracerebroventricular administration of octanoic acid on biochemical and behavioral parameters in rats: possible protective effect of omega 3”.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 12 de novembro de 2013.

Wilson Heinzen Cardoso
Coordenador Adjunto da CEUA