

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

HUGO GALVANE ZAPELINI

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE ÁCIDO
OCTANOICO SOBRE A ATIVIDADE DA Na^+, K^+ -ATPase EM CÉREBRO DE
RATOS**

CRICIÚMA

2018

HUGO GALVANE ZAPELINI

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE ÁCIDO
OCTANOICO SOBRE A ATIVIDADE DA Na⁺,K⁺-ATPase EM CÉREBRO DE
RATOS**

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

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

CRICIÚMA

2018

A toda minha família, em especial, meu pai, minha mãe e minha irmã, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À UNESCO por ter me proporcionado um ensino de excelência, graças a sua ótima estrutura física e ambiente agradável.

À minha orientadora, Professora Patrícia, por ter me passado todo o conhecimento científico, por todas as lições, pela simpatia, pelo carinho e respeito que possui.

Às minhas colegas do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Malu, Camila, Priscila e Débora, que sempre me ajudaram em tudo o que foi preciso.

Ao meu pai, Alfredo, que com certeza é minha inspiração e me ensinou a ser a pessoa que sou hoje, pela parceria, por todas as palavras de incentivo, por todas as lições de moral e por nunca deixar de acreditar em minha capacidade.

À minha mãe, Adriana, que eu amo demais, por toda preocupação, incentivo, carinho, amor e por ser esse exemplo de mulher, batalhadora, dedicada e guerreira que me ensinou a nunca desistir e acreditar em mim mesmo.

À minha irmã, Natália, que com certeza deixa minha vida muito mais alegre e sempre esteve ao meu lado em todos os momentos.

À minha namorada, Bruna, que me incentivou, me apoiou e esteve sempre comigo tanto nos momentos bons, quanto ruins.

Aos meus avós, os quais eu me espelho muito, em especial, meu vô Zapa (em memória) que me ensinou a aproveitar e viver cada segundo que a vida nos proporciona.

Aos meus colegas que conheci durante o mestrado, por toda a parceria, trabalhos e risadas.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado.

À Deus, por me conceder uma vida iluminada, com pessoas maravilhosas e por ter me dado saúde e força de vontade durante o caminho percorrido até agora.

“Se você quer ser bem sucedido, precisa ter dedicação total, buscar seu último limite e dar o melhor de si”.

Ayrton Senna

RESUMO

A deficiência de desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (MCADD) é o mais frequente defeito de beta-oxidação dos ácidos graxos, cujos pacientes apresentam o acúmulo de ácidos graxos de cadeia média, principalmente dos ácidos octanoico (AO), decanoico e *cis*-4-decenoico, em tecidos e fluidos biológicos. Durante as crises, os indivíduos afetados podem apresentar vômito, hipotonia, letargia e convulsões, podendo evoluir para coma e morte. Cronicamente, os pacientes apresentam atraso no desenvolvimento psicomotor, paralisia cerebral, retardo no crescimento, alterações comportamentais e dificuldade de atenção. No presente trabalho, investigou-se o efeito da administração intracerebroventricular (ICV) de AO sobre a atividade e a expressão da enzimas Na^+, K^+ -ATPase, os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo de sulfidrilas e conteúdo de água em cérebro de ratos adultos. Para tanto, ratos Wistar machos com 60 dias de vida receberam uma única administração ICV de AO ($0,83 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$; grupo AO) ou líquido cefalorraquidiano artificial no mesmo volume (grupo controle). Os animais sofreram eutanásia uma hora após a administração e o cérebro foi retirado e as estruturas córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo foram isoladas, limpas e utilizadas para as análises. Observou-se que a administração de AO diminuiu significativamente a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral e hipocampo, sem alterar significativamente essa atividade em estriado e cerebelo. Além disso, a expressão de subunidades catalíticas da Na^+, K^+ -ATPase não foi alterada em córtex cerebral e hipocampo pela administração ICV de AO. Por outro lado, observou-se um aumento significativo do níveis de TBA-RS, um marcador de peroxidação lipídica, em todas as estruturas cerebrais analisadas no grupo que recebeu AO em comparação ao grupo controle. Adicionalmente, o conteúdo de grupos sulfidrila foi diminuído significativamente em córtex cerebral, estriado e cerebelo de animais do grupo AO. Por fim, não houve alteração no conteúdo de água no cérebro desses animais, quando comparados ao grupo controle, sugerindo que a administração de AO não induz edema cerebral. Diante dos resultados demonstrados, pode-se sugerir que a administração ICV de AO inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, enzima importante para a manutenção da homeostase cerebral, possivelmente por induzir oxidação de lipídeos de membrana plasmática. Estes dados podem contribuir para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que levam aos achados neurológicos característicos dos pacientes afetados por MCADD.

Palavras-chave: ácido octanoico; cérebro; estresse oxidativo; MCADD; membrana celular; Na^+, K^+ -ATPase

ABSTRACT

Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD) is the most frequent fatty acid oxidation defect, whose patients present the accumulation of medium chain fatty acids, mainly octanoic (OA), decanoic and cis-4-decenoic acids in tissues and biological fluids. During crises, affected individuals may experience vomiting, hypotonia, lethargy and convulsions, and may progress to coma and death. Chronically, the patients present delayed psychomotor development, cerebral palsy, growth retardation, behavioral changes and attention deficit. In the present study, it was investigated the effect of intracerebroventricular (ICV) OA administration on the activity and expression of Na^+, K^+ -ATPase, levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) and sulfhydryl and water contents in adult rat brain. Sixty-day-old male Wistar rats received a single ICV administration of OA ($0,83 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$; OA group) or artificial cerebrospinal fluid in the same volume (control group). The animals underwent euthanasia one hour after administration, the brain was removed and the cerebral cortex, striatum, hippocampus and cerebellum were isolated, cleaned and used for the analyzes. It was observed that OA administration significantly decreased Na^+, K^+ -ATPase enzyme activity in cerebral cortex and hippocampus, without significantly affecting this activity in striatum and cerebellum. In addition, the expression of Na^+, K^+ -ATPase catalytic subunits was not altered in cerebral cortex and hippocampus by ICV administration of OA. On the other hand, a significant increase in TBA-RS levels, a marker of lipid peroxidation, was observed in all brain structures analyzed in the OA group compared to the control group. In addition, the content of sulfhydryl groups was significantly decreased in cerebral cortex, striatum and cerebellum of OA group animals. Finally, there was no alteration in water content in the brain of these animals when compared to the control group, suggesting that the administration of OA does not induce cerebral edema. In view of the demonstrated results, it may be suggested that ICV administration of OA inhibits the activity of Na^+, K^+ -ATPase, an important enzyme for the maintenance of cerebral homeostasis, possibly by inducing oxidation of plasma membrane lipids. These data may contribute to the understanding of the pathophysiological mechanisms that lead to the characteristic neurological findings observed in patients affected by MCADD.

Key-words: brain; cell membrane; MCADD; Na^+, K^+ -ATPase; octanoic acid; oxidative stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via da oxidação dos ácidos graxos e deficiência enzimática da desidrogenase de acil-CoA	14
Figura 2 – Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	19
Figura 3 – Estrutura da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	20
Figura 4 - Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos com 60 dias de vida.....	28
Figura 5 - Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a expressão de RNAm de subunidades catalíticas da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em hipocampo de ratos com 60 dias de vida.....	29
Figura 6 - Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a expressão de RNAm de subunidades catalíticas da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em córtex cerebral de ratos com 60 dias de vida.....	30
Figura 7 - Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo de animais com 60 dias de vida.....	31
Figura 8 - Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre o conteúdo de sulfidrilas em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo de animais com 60 dias de vida.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos iniciadores para reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (RT-QPCR) utilizados no estudo.....	26
Tabela 2 – Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre o conteúdo cerebral de água de ratos com 60 dias de vida	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AcD - Ácido *cis*-4-decenoico
- AD - Ácido decanoico
- ADP – Difosfato de adenosina (do inglês *adenosine diphosphate*)
- AMPc – Monofosfato de adenosina cíclico (do inglês *cyclic adenosine monophosphate*)
- AO - Ácido octanoico
- ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)
- CoA – Coenzima A
- CoA-SH – Coenzima A livre
- CPT I - Carnitina palmitoiltransferase I
- CPT II - Carnitina palmitoiltransferase II
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)
- DNAc – Ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês *complementary deoxyribonucleic acid*)
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- FAD – Dinucleotídeo de flavina e adenina, forma oxidada (do inglês *flavine adenine dinucleotide, oxidized form*)
- FADH₂ - Dinucleotídeo de flavina e adenina, forma reduzida (do inglês *flavine adenine dinucleotide, reduced form*)
- GSH – Glutathiona reduzida
- ICV - Intracerebroventricular
- LCRa – Líquido cefalorraquidiano artificial
- MCAD - Desidrogenase de acil-coA de cadeia média (do inglês *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*)
- MCADD – Deficiência de MCAD (do inglês *MCAD deficiency*)
- NAD⁺ - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form*)
- NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form*)
- pH - Potencial hidrogeniônico
- Pi – Fosfato inorgânico
- PKA – Proteína cinase A (do inglês *protein kinase A*)

PKC – Proteína cinase C (do inglês *protein kinase C*)

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês *ribonucleic acid*)

SCAD - Desidrogenase de acil-coA de cadeia curta (do inglês *short-chain acyl-CoA dehydrogenase*)

SNC – Sistema nervoso central

TBA-RS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*)

VLCAD - Desidrogenase de acil-coA de cadeia muito longa (do inglês *very long-chain acyl-CoA dehydrogenase*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 DEFEITOS DE BETA-OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS.....	13
1.2 MCADD	14
1.2.1 Sinais e sintomas e Achados bioquímicos	15
1.2.2 Diagnóstico.....	16
1.2.3 Tratamento	16
1.2.4 Fisiopatologia.....	16
1.3 Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	18
1.4 JUSTIFICATIVA	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 ANIMAIS.....	23
3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	23
3.3 PREPARO DA AMOSTRA	24
3.4 PREPARO DAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS SINÁPTICAS.....	24
3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	24
3.6 EXPRESSÃO DAS SUBUNIDADES DA Na ⁺ ,K ⁺ -ATPASE.....	25
3.8 NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS).....	26
3.9 MEDIDA DE SULFIDRILAS TOTAIS.....	26
3.10 CONTEÚDO DE ÁGUA CEREBRAL	27
3.11 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	27
3.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	27
4 RESULTADOS	28
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFEITOS DE BETA-OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

A beta-oxidação de ácidos graxos é considerada uma importante fonte de energia para o organismo durante um estado de catabolismo exacerbado ou período de jejum. A rota de oxidação dos ácidos graxos é complexa e inclui muitos passos: captação celular de AG, ativação desses mesmos ácidos graxos a ésteres acil-CoA, trans-esterificação a acilcarnitinas, translocação através da membrana mitocondrial, reesterificação a acil-CoA e a espiral da beta-oxidação intramitocondrial, que fornece elétrons para coenzimas e acetil-CoA. Cada etapa da espiral de oxidação é catalisada por enzimas específicas para o comprimento da cadeia carbônica do AG (Smith et al., 2005). Estes são utilizados para a produção de corpos cetônicos, principal fonte energética para o cérebro em períodos de jejum prolongado, ou como combustível para o ciclo de Krebs produzindo coenzimas reduzidas que serão posteriormente utilizadas na cadeia transportadora de elétrons para a produção de trifosfato de adenosina (ATP). Existem 25 enzimas e proteínas transportadoras específicas envolvidas no processo da beta-oxidação (Saudubray et al., 1999; Bennett et al., 2000).

Os primeiros defeitos de oxidação dos ácidos graxos foram descritos na década de setenta, cujos pacientes apresentavam rabdomiólise e astenia induzidas por exercício (Kolvraa et al., 1982). Já são descritas, atualmente, pelo menos 23 deficiências diferentes dentro deste grupo de doenças, entre elas: deficiências das enzimas carnitina palmitoiltransferase I e II (CPT I e CPT II), carnitina/acilcarnitina translocase, desidrogenases de acil-coA de cadeia curta (SCAD), média (MCAD) e de cadeia muito longa (VLCAD) (Roe e Ding, 2001). Esses distúrbios de beta-oxidação abrangem um aspecto heterogêneo de manifestações clínicas que afetam principalmente os tecidos que dependem de ácidos graxos como substrato energético direta ou indiretamente (Rinaldo et al., 2002; Bastin et al., 2014). Em 1982, a deficiência de MCAD (MCADD) foi diagnosticada pela primeira vez em pacientes que apresentavam sintomas neurológicos durante o jejum (Kolvraa et al., 1982).

1.2 MCADD

A MCAD é a enzima mitocondrial responsável pela catálise do primeiro passo da oxidação de acil-CoA de cadeia média (4-12 carbonos; Figura 1) (Matsubara et al., 1992). A MCADD (OMIM 201450) é o mais comum defeito de beta-oxidação dos AG apresentando padrão de herança mendeliana autossômico recessivo. É causada por mutações no gene *ACADM*, gene composto por 12 éxons que está localizado na região 31.1 do braço curto do cromossomo 1 (Zang et al., 1992). É caracterizada pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia média, especialmente os ácidos octanoico (AO), decanoico (AD) e *cis*-4-decenoico (AcD) e seus ésteres de L-carnitina em tecidos e líquidos biológicos (Rinaldo et al., 2002). Esta doença apresenta uma prevalência entre 1:6.500 e 1:17.000 recém nascidos vivos, dependendo da população (Scriver et al., 2001).

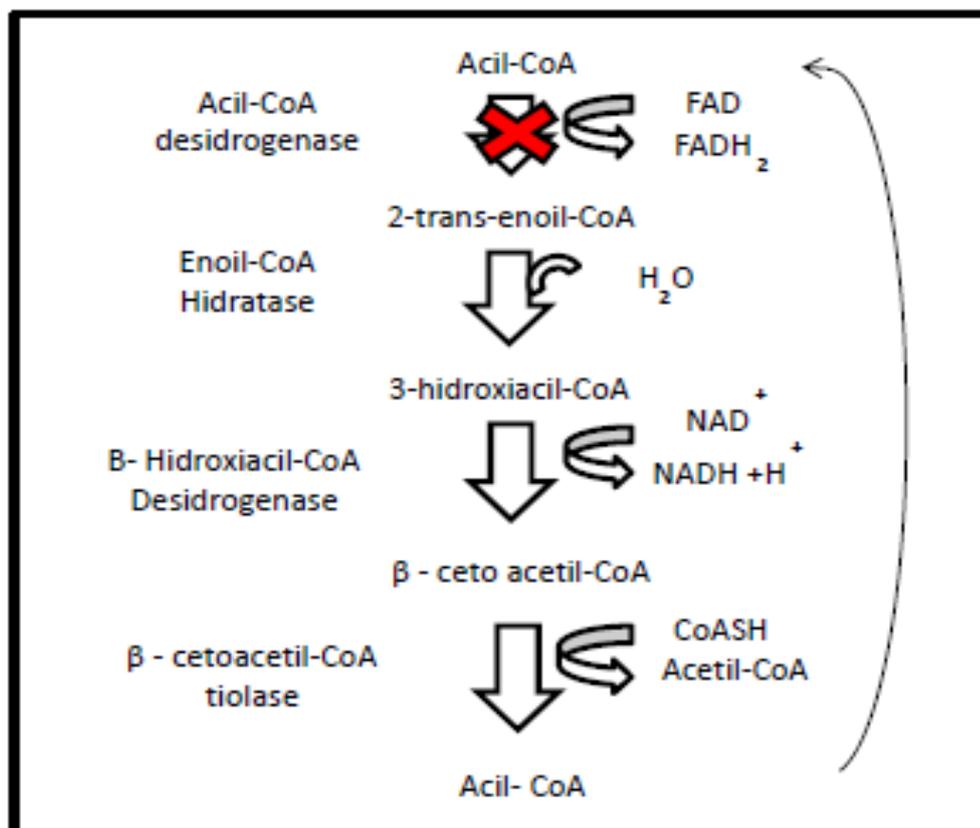


Figura 1. Via da oxidação dos ácidos graxos e deficiência enzimática da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média. (CoA: coenzima A; CoASH: coenzima A livre; FAD: forma oxidada do dinucleotídeo de flavina e adenina; $FADH_2$: forma reduzida do dinucleotídeo de flavina e adenina (forma reduzida); NAD^+ : forma oxidada do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; $NADH$: forma reduzida do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). Fonte: Gillespie, 2003.

Os primeiros sinais clínico-laboratoriais da MCADD geralmente aparecem nos primeiros meses de vida, embora possam se manifestar até mesmo na fase adulta (Ruitenbeek et al., 1995; Lang, 2009; Leydiker et al., 2011). Crises metabólicas causadas pelo aumento da demanda energética em situações de catabolismo exacerbado como jejum e infecções bacterianas e virais, são responsáveis por desencadear sintomas de intoxicação nos pacientes, tais como vômitos, tonturas, letargia, podendo evoluir a coma e morte. Dentre os pacientes acometidos pela MCADD, 25 % não sobrevivem à primeira crise metabólica e 16 % dos sobreviventes apresentam sequelas neurológicas graves, incluindo paralisia cerebral e deficiência intelectual (Oerton et al., 2011).

1.2.1 Sinais, sintomas e achados bioquímicos

Os pacientes afetados pela MCADD são geralmente assintomáticos e manifestam seus sintomas em períodos de jejum prolongado ou durante estados de catabolismo exacerbado (Derks et al., 2006). Cronicamente, podem apresentar paralisia e edema cerebral, atraso no desenvolvimento psicomotor, atraso de crescimento, deficiência intelectual, dificuldade de atenção e alterações comportamentais (Roe e Ding, 2001).

Bioquimicamente, além do acúmulo dos ácidos graxos AO, AD e AcD, também ocorre aumento na concentração plasmática de acilcarnitinas, tais como octanoilcarnitina, decanoilcarnitina e decenoilcarnitina (Onkenhout et al., 1995). Além disso, durante as crises metabólicas é visto crises de hipoglicemia, muitas vezes tida como a responsável pelo dano cerebral encontrado nos pacientes (Lovera et al., 2012). Adicionalmente, os pacientes acometidos pela MCADD apresentam hipocetose, hiperamonemia, desequilíbrio hidroeletrólítico, acidose metabólica e acidemia láctica (Costa, 2000; Sturm et al., 2012; Gramer et al., 2015).

1.2.2 Diagnóstico

Para identificar pacientes com distúrbios na oxidação de ácidos graxos, testes de triagem neonatal são realizados. A análise dos ácidos orgânicos acumulados tanto no plasma quanto na urina destes pacientes tem sido a principal forma de diagnóstico

da doença, sendo estes quantificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria em massa em sequência (*tandem*) (Vianey-Liaud et al., 1987). Em indivíduos saudáveis, a concentração plasmática de AO, o principal metabólito acumulado na doença, pode variar entre 0-15 $\mu\text{mol/L}$, enquanto nos pacientes sintomáticos os valores podem atingir entre 22 a 672 $\mu\text{mol/L}$ (Onkenhout et al., 1995). A confirmação do diagnóstico é realizada por análise molecular (mutações) e medida da atividade enzimática da MCAD (Roe e Ding, 2001).

1.2.3 Tratamento

Das (2012) sugere que o acompanhamento de pacientes com MCADD deve ser contínuo, para se evitarem as crises metabólicas, momento em que os níveis dos metabólitos acumulados aumentam drasticamente. A prevenção do desenvolvimento de deficiência intelectual com anormalidades cerebrais e morte súbita é o principal objetivo do tratamento da MCADD (Kompore e Rizzo, 2008). A terapia consiste em uma dieta rica em carboidratos e restrita na ingestão de ácidos graxos. Deve-se também evitar períodos de jejum prolongado e outras situações de estresse metabólico, além de infusão de glicose durante as crises metabólicas. Além disso, a suplementação com L-carnitina é recomendada para estes indivíduos, pois esta se liga a ácidos orgânicos, permitindo assim sua excreção na forma de acilcarnitinas (Roe e Ding, 2001).

1.2.4 Fisiopatologia

Pacientes acometidos pela MCADD possuem uma diminuição na síntese de corpos cetônicos. Neste cenário, os níveis de glicose sanguínea diminuem, ocasionando a hipoglicemia hipocetótica, característica da doença. A não utilização dos ácidos pela deficiência enzimática também provoca um aumento da razão acil-CoA:CoA, responsável pela consequente inibição das enzimas piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase, pois estas utilizam CoA como substrato. A inibição destas enzimas altera a velocidade do ciclo de Krebs, principalmente pelo fato de ocorrer uma inibição da conversão de piruvato a acetil-CoA na mitocôndria. Com a diminuição da disponibilidade de acetil-CoA, ocorre a consequente redução da síntese de malato, importante precursor para a

gliconeogênese. Além disso, o malato é precursor de malonil-CoA, regulador inibitório da CPT I, enzima responsável pela entrada de ácidos graxos para a mitocôndria. Portanto, o acúmulo dos ácidos graxos nesses pacientes provoca uma diminuição da gliconeogênese e um aumento na entrada de ácidos graxos para a mitocôndria, podendo ser um agravante para a hipoglicemia e provocar um aumento significativo na quantidade desses metabólitos (Roe e Ding, 2001).

Além disso, a exacerbação de processos catabólicos, dentre eles a proteólise, é característica da doença, devido à baixa disponibilidade de substratos energéticos. Com a degradação das proteínas e utilização dos aminoácidos como substratos energéticos, há um aumento na liberação de amônia, a qual apresenta alta toxicidade para os tecidos, especialmente para o sistema nervoso central (SNC) (Felipo e Butterworth, 2002).

Adicionalmente, alguns autores sugerem que sintomas como atraso no desenvolvimento psicomotor e comportamental e prejuízos de memória ocorrem devido ao acúmulo de ácidos graxos livres e seus ésteres de acilcarnitinas (Mayell et al. 2006; Saudubray et al., 2012; Leach et al., 2014; Wiles et al., 2014). Nesse sentido, alterações neurológicas como edema cerebral e anomalias no lobo frontal têm sido atribuídas à neurotoxicidade do AO e seus metabólitos secundários (Heubi et al., 1987; Egidio et al., 1989; Maegawa et al., 2008; Wilcken et al., 2010; Leach et al., 2014).

Nesse sentido, estudos anteriores evidenciaram que o acúmulo de AO e AD inibem o transporte de ácidos orgânicos pelo plexo coroide. Tal efeito impediria a depuração do AO e outros compostos, provocando um acúmulo desses metabólitos no cérebro e líquido cefalorraquidiano, contribuindo para a encefalopatia evidente nas doenças em que há o acúmulo dessas substâncias (Kim et al., 1983). Adicionalmente, foi demonstrado que o AO, AD e AcD alteram importantes parâmetros do metabolismo energético cerebral em ratos jovens *in vitro*, incluindo as atividades da creatina cinase, dos complexos da cadeia respiratória e a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glicose, $[\text{1-}^{14}\text{C}]$ acetato e $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ citrato (de Assis et al., 2003; 2006; Reis de Assis et al., 2004), bem como induzem disfunção mitocondrial (Schuck et al., 2009a). Também foi demonstrado que esses mesmos compostos induzem estresse oxidativo *in vitro* em córtex cerebral de ratos jovens, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e diminuindo as defesas antioxidantes (Schuck et al., 2007; 2009b). Adicionalmente, de Assis et al (2003) demonstraram inibição *in vitro* da atividade da

enzima Na^+, K^+ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos na presença dos ácidos AO, AD e AcD.

1.3 Na^+, K^+ -ATPase

A Na^+, K^+ -ATPase (E.C.3.6.1.37) é uma proteína integral membranar, responsável pelo transporte ativo de íons sódio e potássio contra seus gradientes de concentração através da membrana plasmática. A energia para que ocorra esse transporte é obtida a partir da hidrólise do ATP, transportando 3 íons Na^+ para o meio extracelular e 2 íons K^+ para o meio intracelular (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003) (Figura 2). Esse transporte é responsável por estabelecer um gradiente eletroquímico essencial para a manutenção dos potenciais de membrana, regulação do volume e pH intracelular e captação de nutrientes, como a glicose, aminoácidos, vitaminas e outras substâncias que participam da homeostase celular (Crambert et al., 2000; Jorgensen e Pedersen, 2001; Horisberger, 2004; Martin, 2005). Esta enzima consome aproximadamente 40 – 50% do ATP formado no cérebro e sua atividade está relacionada com a fluidez de membrana (Ericinska e Silver, 1994).

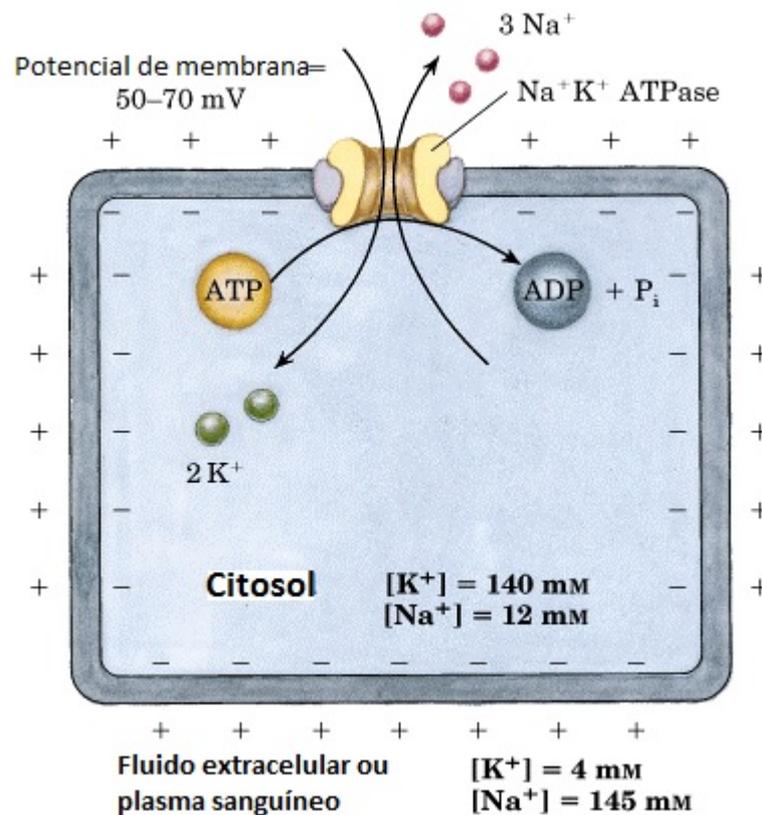


Figura 2. Na^+, K^+ -ATPase. Formação do potencial elétrico transmembrana. A Na^+, K^+ -ATPase transloca 3 íons Na^+ para o meio extracelular e 2 íons K^+ para o meio intracelular, utilizando uma molécula de ATP. (ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; P_i , fosfato inorgânico). Adaptado de Nelson e Cox (2000).

A Na^+, K^+ -ATPase é um tetrâmero constituído de duas subunidades diferentes (α e β) (Jorgensen, 1982; Renaud, 1991), as quais estão incorporadas na bicamada lipídica da membrana plasmática (Horowitz, 1990). A subunidade α é a catalítica e sofre fosforilação e mudança conformacional acoplada à hidrólise de ATP e transporte dos íons Na^+ e K^+ . A subunidade β não possui sítios catalíticos e é uma proteína de adesão intercelular direcionando a subunidade α para a membrana plasmática. Além destas subunidades, alguns estudos mostraram a presença de outra subunidade menor (γ) possivelmente reguladora da atividade enzimática (Geering, 2008) (Figura 3).

Foram identificados em mamíferos genes que codificam quatro isoformas da subunidade α (α_1 , α_2 , α_3 e α_4). As três primeiras isoformas se encontram em diferentes tipos de células do SNC, porém a α_4 não é expressa no cérebro (McGrail et al., 1991; Bottger et al., 2011). Por outro lado, a subunidade β em mamíferos possui três

isoformas (β_1 , β_2 e β_3). No entanto, apenas as isoformas β_1 e β_2 são expressas no cérebro (Geering, 2008; Benarroch, 2011).

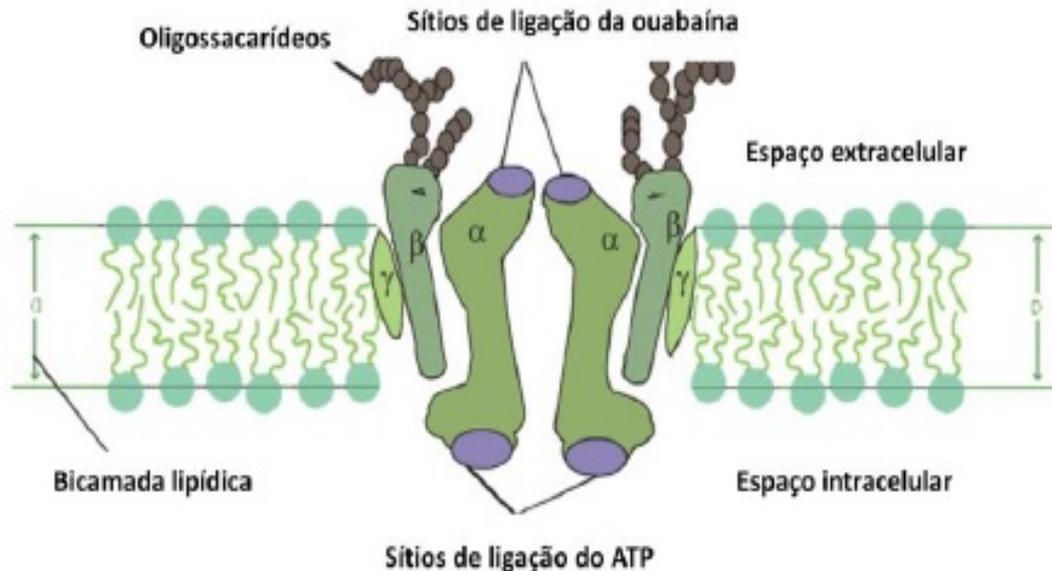


Figura 3. Estrutura da Na⁺,K⁺-ATPase. ATP: trifosfato de adenosina. Adaptada de Suhail (2010).

A regulação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase ocorre por diversos fatores, tais como hormonais, disponibilidade de substrato e componentes da membrana (Lopina, 2000). Adicionalmente, é dinamicamente regulada por proteínas cinases dependentes de segundos mensageiros (Wheeler e Bernard, 1999; Hotchkiss e Karl, 2003). Nesse contexto, foi demonstrado que a subunidade α-1 da Na⁺,K⁺-ATPase é substrato tanto para proteína cinase dependente de monofosfato de adenosina cíclico (PKA) quanto para proteína cinase C (PKC) e que a subunidade α-1 é fosforilada apenas por PKC (Beguin et al., 1994). Além desses fatores, a Na⁺,K⁺-ATPase é suscetível ao ataque de ERO, visto que apresenta resíduos de cisteína em seu sítio catalítico, bem como a dano oxidativo a lipídeos de membrana e alterações de fluidez da membrana plasmática, onde está embebida (Rauchova et al., 1999; Chakraborty et al., 2003; Wang et al., 2003; Dencher et al., 2007).

A Na⁺,K⁺-ATPase é essencial para a manutenção do gradiente iônico e excitabilidade neuronal (Ercinska e Silver, 1994), assim como para a diferenciação e a sobrevivência celular (Yu, 2003). Diversas doenças que afetam o SNC apresentam alterações da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, tais como isquemia cerebral (Wyse et al.,

2000), epilepsia (Grisar, 1984) e outras doenças neurodegenerativas (Lees, 1993). Modelos experimentais de alguns erros inatos do metabolismo, tais como modelos de fenilcetonúria, hiperprolinemia tipo II, deficiência de SCAD e acidemias metilmalônica e propiônica (Moreira et al., 1987, Dutra et al., 1991; Wyse et al., 1995; Schuck et al., 2013), também demonstraram alterações na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase. Adicionalmente, Renkawek et al. (1992) demonstraram que uma redução de 40 % na atividade enzimática em córtex cerebral de ratos neonatos está relacionada a processos convulsivantes e encefalopatia espongiiforme. Além disso, outros estudos encontraram uma diminuição de 60 % na atividade da enzima em córtex cerebral de pacientes que apresentavam convulsões generalizadas (Rapport et al., 1975).

1.4 JUSTIFICATIVA

Considerando-se que os pacientes acometidos pela MCADD apresentam importantes alterações cerebrais e que a manutenção da homeostase cerebral depende da função normal da enzima Na^+, K^+ -ATPase, torna-se importante a investigação de possíveis alterações na atividade dessa enzima em um modelo experimental de MCADD. Torna-se importante ressaltar que essa investigação é relevante para a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos do dano cerebral característico dessa doença, na tentativa de se estabelecer novas estratégias terapêuticas para a MCADD.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração intracerebroventricular (ICV) de AO sobre a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase e conteúdo de água em cérebro de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da administração ICV de AO sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos com 60 dias de vida;
- Avaliar o efeito da administração ICV de AO sobre a expressão das subunidades da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral e hipocampo de ratos com 60 dias de vida;
- Avaliar o efeito da administração ICV de AO sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos com 60 dias de vida;
- Avaliar o efeito da administração ICV de AO sobre o conteúdo de sulfidrilas em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos com 60 dias de vida;
- Avaliar o efeito da administração ICV de AO sobre o conteúdo de água em cérebro total de ratos com 60 dias de vida.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 48 ratos Wistar machos com 60 dias de vida, fornecidos pelo Biotério da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os ratos 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 número 090/2013-2 (Apêndice A) e seguiu 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).

3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Para a administração do AO, foi realizada uma cirurgia estereotáxica, seguida de uma única administração de AO no ventrículo lateral direito do cérebro dos animais via ICV. 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). Após a anestesia, os animais foram alocados em um aparelho estereotáxico (Insight®, Brasil), presos nas barras auriculares, de forma a permitir a leitura adequada das coordenadas. A localização obtida pela leitura das coordenadas, levando-se em consideração as coordenadas anteroposterior 0,9 mm e mesolateral 1,5 mm, indicou onde foi realizada a administração.

Após 3 dias de recuperação, os ratos do grupo controle receberam uma única administração via ICV de líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa, 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 LCRa, obtendo-se uma solução de 333 mM, cujo pH foi ajustado para 7,2-7,4.

3.3 PREPARO DA AMOSTRA

Uma hora após a administração de AO, os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina sem anestesia. A caixa craniana foi aberta e, por dissecação, as estruturas cerebrais córtex, estriado, hipocampo e cerebelo foram limpas e isoladas. As estruturas foram congeladas em freezer a -80°C até o momento da realização das técnicas bioquímicas.

3.4 PREPARO DAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS SINÁPTICAS

Membranas de plasma sinápticas foram preparados de acordo com o método de Jones e Matus (1974). Eles foram isolados utilizando um gradiente de densidade de sacarose descontínuo consistindo em camadas sucessivas de 0,3, 0,8 e 1,0 mm. após centrifugação a $69.000 \times g$ durante 110 min, a fração entre 0,8 e 1,0 do interface de sacarose foi tomado como a preparação da enzima da membrana.

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA Na^+, K^+ -ATPase

As atividades da Na^+, K^+ -ATPase e das ATPases foram avaliadas conforme o método de Tsakiris e Deliconstantinus (1984). O meio de reação continha cloreto de magnésio 5 mM, cloreto de sódio 80 mM, cloreto de potássio 20 mM, Tris-HCl 40 mM pH 7,4. A atividade de outras ATPases foi medida na presença de ouabaína 1 mM (inibidor específico da Na^+, K^+ -ATPase). A atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi então calculada como sendo o resultado da diferença entre a atividade obtida pelas ATPases no meio sem ouabaína e a atividade das ATPases do meio contendo ouabaína. As amostras de membranas sinápticas foram adicionadas ao meio (0,015 - 0,03 μg de proteína). A reação foi iniciada pela adição de ATP 3 mM e o término, após 5 minutos de incubação a 37°C , ocorreu pela adição de TCA 10%. O fosfato inorgânico (P_i) liberado durante a incubação foi medido pelo método de Chan et al. (1986). A atividade enzimática foi expressa em nmol de P_i liberado por min por mg de proteína.

3.6 EXPRESSÃO DAS SUBUNIDADES DA Na^+, K^+ -ATPASE

A expressão dos genes das subunidades da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral e hipocampo foram avaliados por PCR quantitativo em tempo-real. O RNA total de córtex cerebral e hipocampo foram isolados com o reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria e o ácido desoxirribonucleico (DNA) complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando-se o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Califórnia, USA) a partir de 1 µg de RNA total, seguindo as instruções do fabricante. A análise da reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (RT-QPCR) foi realizada usando SYBR® Green I (Invitrogen Carlsbad, Califórnia, USA). As reações foram feitas em um volume final de 25 µL usando 12,5 µL de cDNA diluído (1:50 para Gapd, Rlp13α e BDNF), contendo uma concentração final de 5 M de betaína (Sigma-Aldrich Louis, MO, EUA), 0,2 x SYBR® Green I (Invitrogen Carlsbad, Califórnia, USA), 100 µM de dNTP, 1 x Tampão PCR, 3 mM de MgCl_2 , 0,25 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen Carlsbad, Califórnia, USA) e 200 nM de cada iniciador *forward* e reverso (Tabela 1). As condições da ciclagem da PCR incluíram uma etapa inicial de ativação da polimerase por 5 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para desnaturação, 35 segundos a 60 °C para anelamento e 15 segundos a 72 °C para alongação. Ao final dos ciclos, uma curva de dissociação foi incluída e a medida da fluorescência resultante foi feita de 60 a 99 °C. Os níveis da expressão relativa foram determinados com 7500 Fast Real-Time System Sequence Detection Software v.2.0.5 (Applied Biosystems Califórnia, USA). A eficiência por amostra foi calculada usando o programa LinRegPCR 11.0 (<http://LinRegPCR.nl>) e a estabilidade dos genes de referência, Gapd e Rlp13α (M-value) e o número ótimo de genes de referência de acordo com a variação de pares (V) foi analisada pelo Software GeNorm 3.5 (<http://medgen.ugent.be/genorm/>). Os níveis da expressão relativa de RNA foram determinados usando o método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

Tabela1. Sequências dos iniciadores para reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (RT-QPCR) utilizados no estudo.

Gen	Iniciador <i>Forward</i>	Iniciador Reverso	Referência
<i>Gapd</i>	5'-TCACCACCATGGAGAAGGC- 3'	5'- CTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3'	Bonefeld et al., 2008
<i>Hprt1</i>	5'- CAGACTTTGCTTTCCTTGG-3'	5'- GAGAGGTCCTTTTCACCAG-3'	Bonefeld et al., 2008
<i>Rpl13α</i>	5'- CAAGAAAAGCGGATGGTG-3'	5'- TCCGGTAATGGATCTTTGC-3'	Bonefeld et al., 2008
<i>Atp1a1</i>	5'- GAAGGAAAGGGACATGGAC-3'	5'- TGGCTCCAATCCACAGTAA-3'	Wen, et al., 2014.
<i>Atp1a2</i>	5'- TGTGCTGGTGATGAAAGGT-3'	5'- CTGTGGGAAAGTTCAGCTC-3'	Wen, et al., 2014.
<i>Atp1a3</i>	5'-GCTTTGCCTTTGACTGTGAT- 3'	5'- ATGATGCCTACACCTTTGG-3'	Wen et al., 2014.

3.7 NÍVEIS DE TBA-RS

Para determinação dos níveis de TBA-RS em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo foram homogeneizados em tampão PBS gelado (pH 7,4). Logo após o homogeneizado foi precipitado por meio de uma reação ácida com ácido tricloroacético (TCA) a 10 % com sulfato de sódio adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67 % na proporção 1:1(v/v). A mistura foi levada a um banho fervente durante 25 min e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3-tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBARS/mg de proteína (Esterbauer e Cheeseman, 1990).

3.8 MEDIDA DE SULFIDRILAS TOTAIS

Essa medida foi realizada de acordo com o método de Aksenov e Markesbery (2001). O ácido ditionitrobenzoico (DTNB), reagente de cor, é reduzido pelos tióis não oxidados, gerando um derivado amarelo ácido tionitrobenzoico (TNB), lido espectrofotometricamente a 412 nm. Com isso o método determina os tióis totais da amostra. Os resultados estão expressos em nmol de TNB/mg de proteína.

3.9 CONTEÚDO DE ÁGUA CEREBRAL

O edema cerebral foi avaliado pelo método de pesagem e secagem com base na medição do teor de água do cérebro (Durmaz et al., 2003). Os ratos foram decapitados e o cérebro total foi retirado. Imediatamente após a remoção, o tecido cerebral foi colocado sobre um papel de filtro para a remoção da água em excesso. A cápsula de porcelana foi seca em estufa. Em seguida, a tara foi calculada. Depois disso, o tecido cerebral foi colocado na cápsula de porcelana e pesado. Em seguida, o tecido cerebral na cápsula de porcelana foi secado em uma estufa com temperatura e umidade constante para ser seco durante 24 h a 100 °C. O tecido cerebral então seco na cápsula de porcelana foi pesado novamente. A percentagem de água foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: % de H₂O = [(peso úmido - peso seco)/peso úmido] X 100.

3.10 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas totais nas amostras foi realizada através do método de Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para comparação das médias dos resultados obtidos entre os grupos, foi utilizado o teste *t* de Student de duas caudas para amostras independentes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SPSS (IBM Statistics). Foram consideradas diferenças significativas quando o *p* < 0,05.

4 RESULTADOS

Primeiramente, foi avaliado o efeito *in vivo* da administração ICV aguda de AO sobre a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em estruturas cerebrais de ratos adultos. Observou-se uma diminuição significativa desta atividade em córtex cerebral e hipocampo dos animais que receberam AO em comparação ao grupo controle. Por outro lado, não houve alteração significativa nessa atividade enzimática em estriado e cerebelo desses animais (Figura 4).

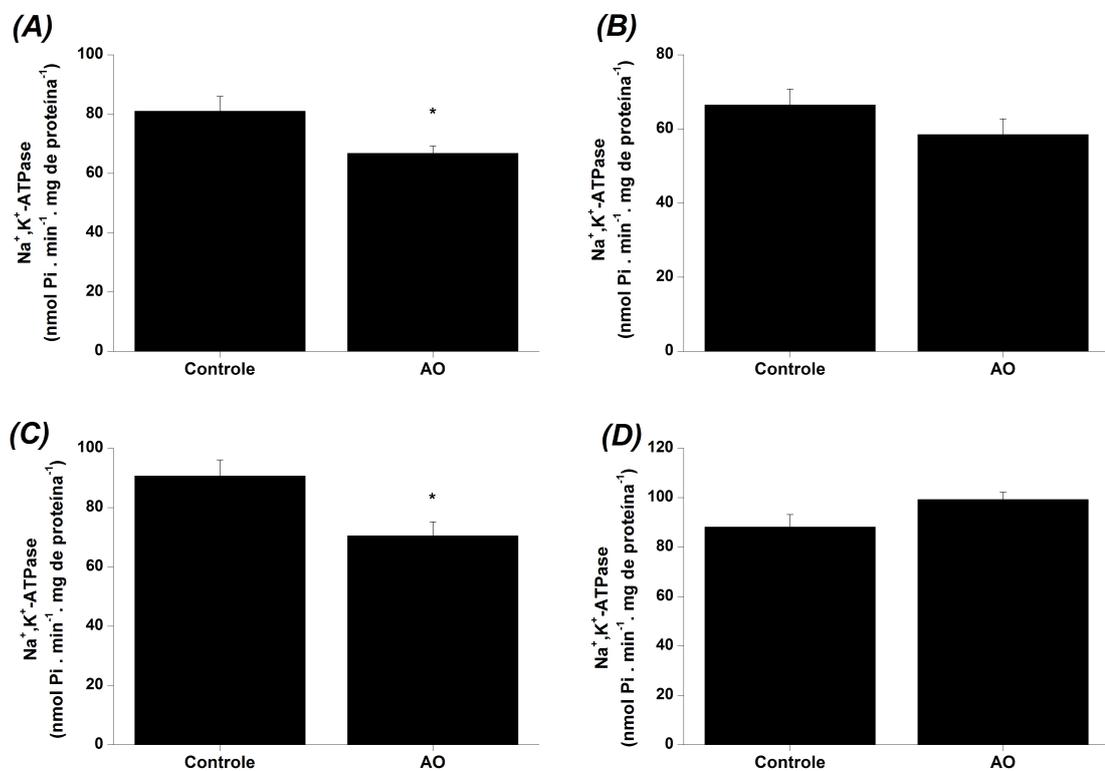


Figura 4. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral (A), estriado (B), hipocampo (C) e cerebelo (D) de ratos com 60 dias de vida. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 6 experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em $\text{nmol de Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Em seguida foi avaliada a expressão relativa de RNAm das subunidades catalíticas *Atp1a1*, *Atp1a2* e *Atp1a3* da enzima Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos com 60 dias de vida após administração ICV de AO. Pode-se observar na figura 5 que não houve diferença significativa entre os grupos AO e controle em nenhuma das subunidades analisadas.

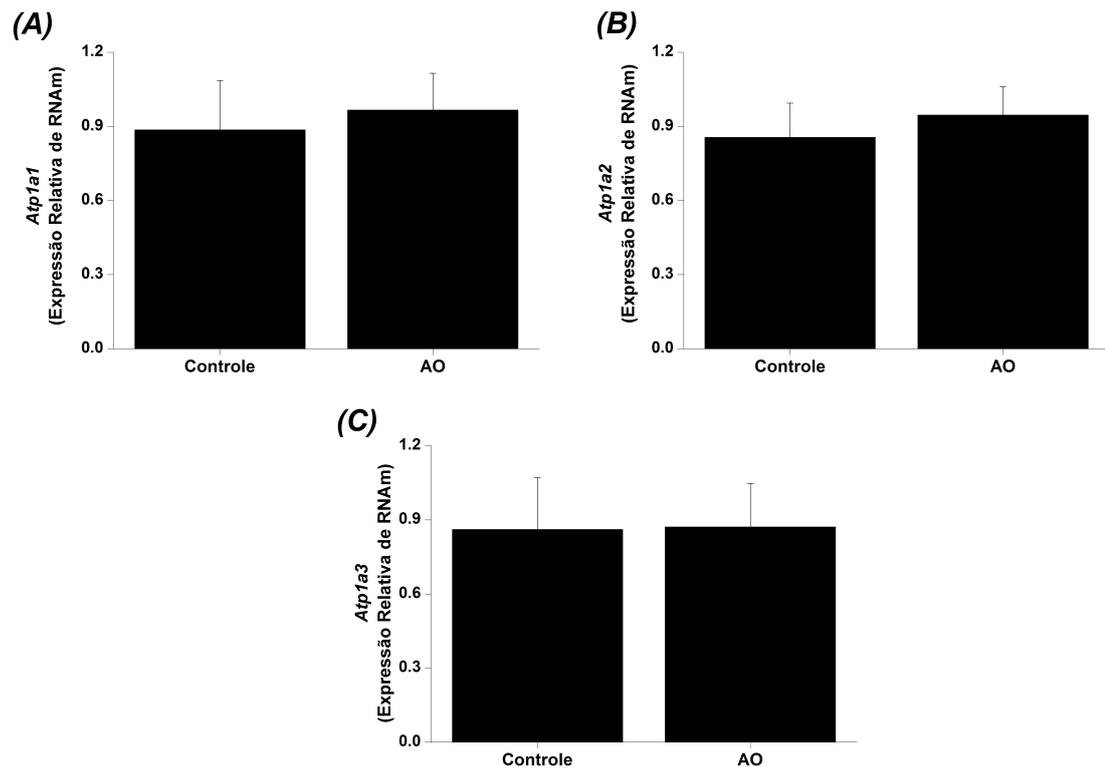


Figura 5. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a expressão relativa de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) das subunidades catalíticas *Atp1a1* (A), *Atp1a2* (B) e *Atp1a3* (C) da enzima Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos com 60 dias de vida. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 6 experimentos independentes realizados em duplicata. Não foi observada diferença significativa entre os grupos (Teste *t* de Student para amostras independentes).

A seguir, avaliou-se a expressão relativa de RNAm das mesmas subunidades catalíticas da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo de ratos com 60 dias de vida após administração de AO. De forma semelhante ao córtex cerebral, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos em nenhuma das subunidades avaliadas.

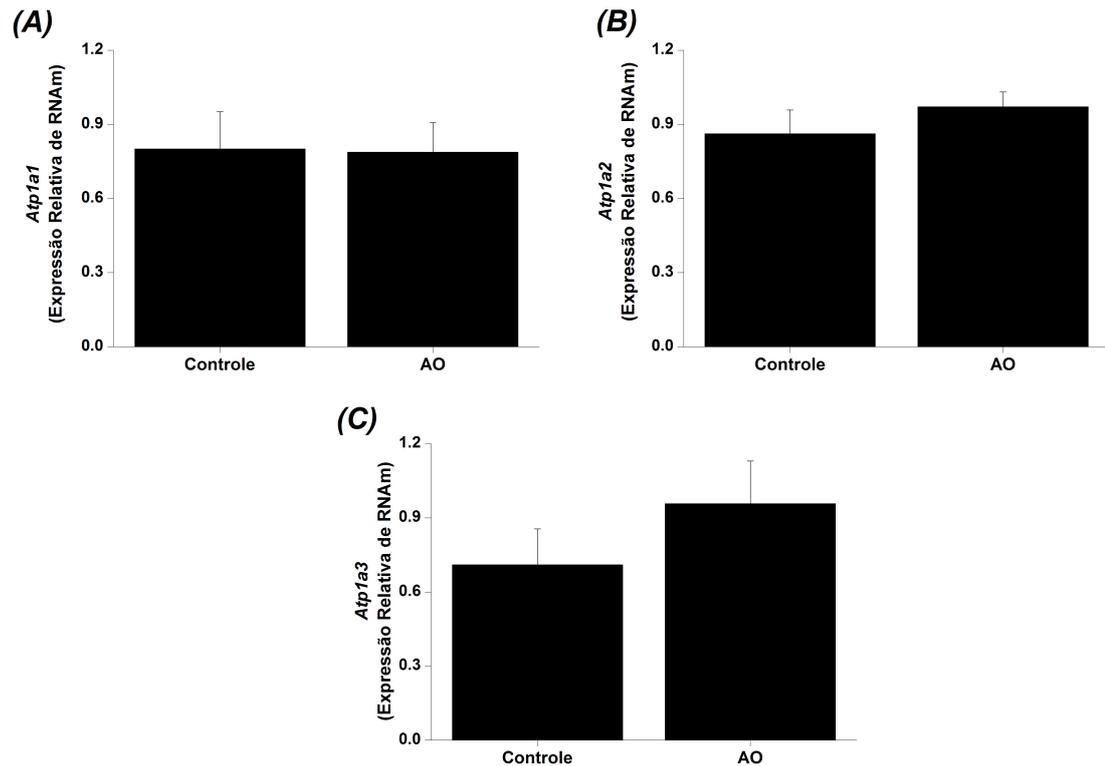


Figura 6. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a expressão relativa de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) das subunidades catalíticas *Atp1a1* (A), *Atp1a2* (B) e *Atp1a3* (C) da enzima Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo de ratos com 60 dias de vida. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 6 experimentos independentes realizados em duplicata. Não foi observada diferença significativa entre os grupos (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Adicionalmente, avaliou-se o efeito da administração ICV de AO sobre os níveis de TBA-RS em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos com 60 dias de vida. Foi observado um aumento significativo dos níveis de TBA-RS em todas as estruturas analisadas dos animais do grupo que recebeu AO em relação ao grupo controle (Figura 7).

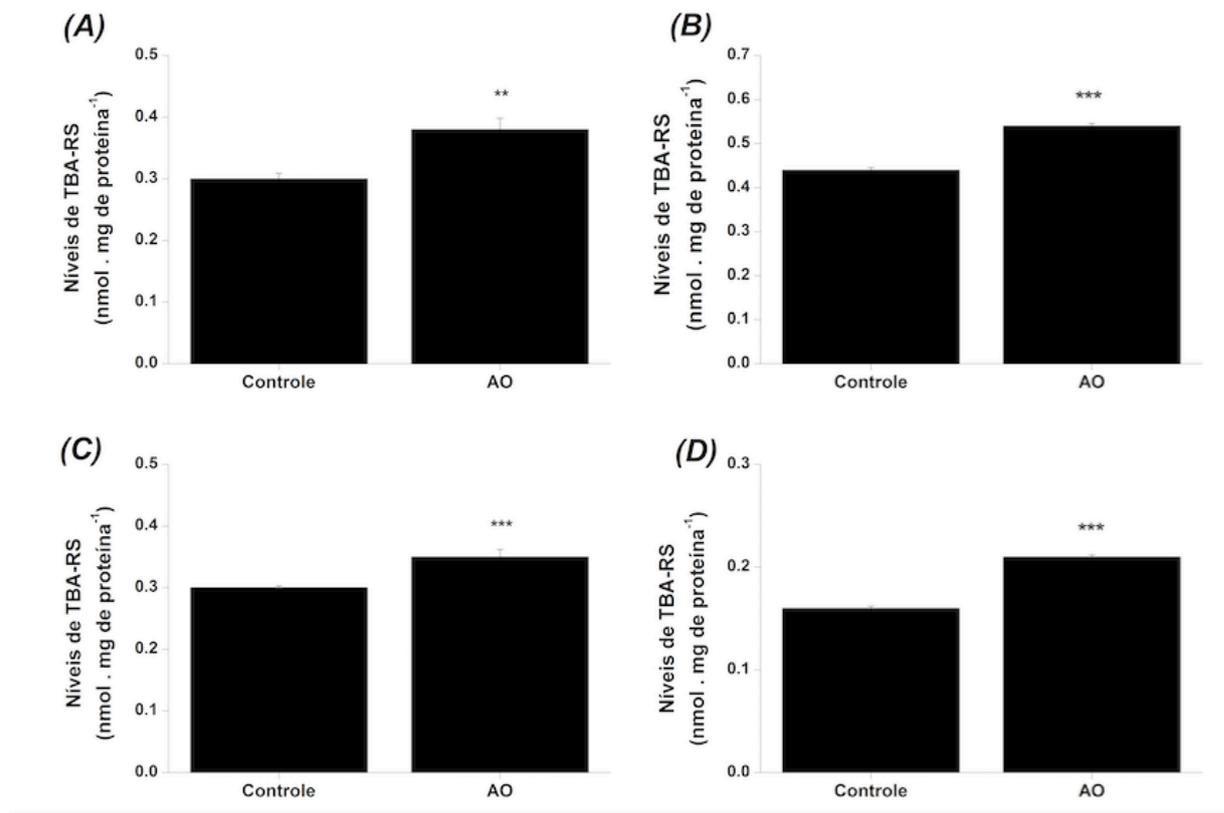


Figura 7. Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral (A), estriado (B), hipocampo (C) e cerebelo (D) de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em nmol/mg de proteína. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

O próximo passo foi avaliar o efeito da administração ICV de AO sobre os conteúdos de grupos sulfidrilas em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos com 60 dias de vida. A figura 8 mostra uma diminuição significativa do conteúdo de sulfidrilas em córtex cerebral, estriado e cerebelo dos animais do grupo que recebeu AO em comparação ao grupo controle. Por outro lado, não houve diferença significativa no conteúdo de sulfidrilas em hipocampo entre os animais dos grupos AO e controle.

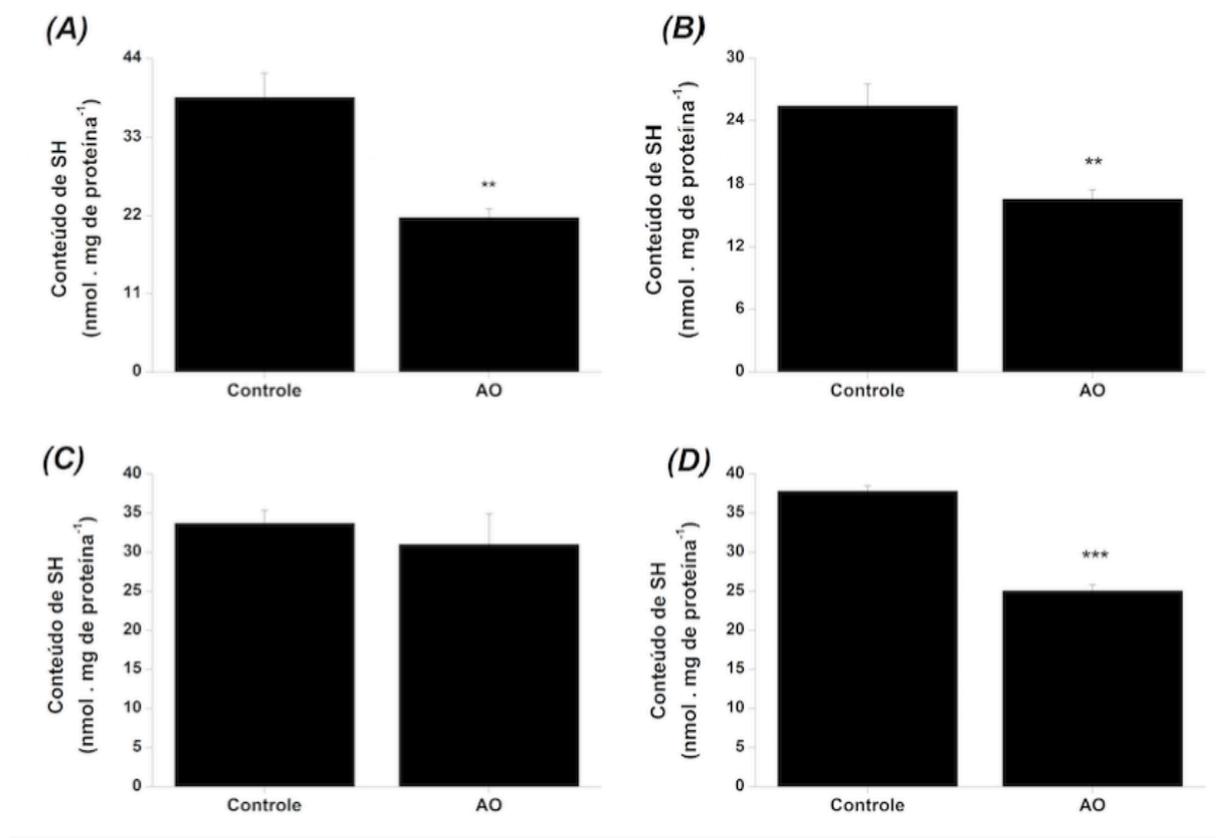


Figura 8. Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre o conteúdo de sulfidrilas em córtex cerebral (A), estriado (B), hipocampo (C) e cerebelo (D) de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em nmol/mg de proteína. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

Por fim, foi avaliado o conteúdo de água no cérebro total de ratos adultos que receberam administração ICV de AO. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa no conteúdo de água cerebral dos animais em comparação ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre o conteúdo cerebral de água de ratos com 60 dias de vida.

Grupo	Conteúdo de Água (%)
Controle	79,93 ± 0,13
AO	79,94 ± 0,07

Os dados representam média ± erro padrão da média de 6 experimentos independentes por grupo e estão expressos em porcentagem da massa total do cérebro. Não foi observada diferença significativa entre os grupos (Teste *t* de Student para amostras independentes).

5 DISCUSSÃO

Embora a MCADD seja um dos erros inatos do metabolismo mais frequentes, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiopatológicos do dano cerebral que acomete os pacientes afetados por essa doença. Nesse contexto, no presente trabalho investigou-se o efeito da administração aguda ICV de AO sobre a atividade e a expressão da enzima Na^+, K^+ -ATPase, bem como sobre os níveis de TBA-RS e o conteúdo de grupos sulfidrilas e de água em cérebro de ratos.

Inicialmente, observou-se que a administração ICV de AO inibiu significativamente a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmática sináptica em córtex cerebral e hipocampo em comparação ao grupo controle, sem alterar essa atividade em cerebelo e estriado. Tais achados corroboram estudos que demonstraram uma inibição da Na^+, K^+ -ATPase causada pelo AO *in vitro* em membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos (de Assis et al., 2003) e em culturas primárias de astrócitos (Olson et al., 1989).

Entretanto, a inibição da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase não foi acompanhada por uma alteração na expressão das suas subunidades Atp1a1, Atp1a2 e Atp1a3 em córtex cerebral e em hipocampo de animais que receberam administração ICV de AO, como demonstrado no presente estudo. Tal fato sugere que a inibição da atividade dessa enzima não se deve a alterações em sua expressão, incluindo alterações pós-traducionais.

Nesse sentido, sabe-se que a enzima Na^+, K^+ -ATPase apresenta resíduos de cisteína essenciais para a catálise (subunidade α) e regulação de sua atividade (subunidade β) (Geering, 2008). Grupos sulfidrilas, como os presentes nos resíduos de cisteína, são altamente suscetíveis à oxidação, formando dissulfetos (Yufu et al., 1993). Estudos demonstraram que alterações ocasionadas por alterações no estado *redox* celular no resíduo de cisteína 46 (Cys46) na subunidade β dessa enzima levariam a inibições de aproximadamente 20 % da atividade em cardiomiócitos submetidos à isquemia (Figtree et al., 2009; Bilbert et al., 2011). Devido a essa suscetibilidade ao estresse oxidativo, a Na^+, K^+ -ATPase é considerada um sensor *redox* celular (Yakushev et al., 2012).

Portanto, investigou-se o efeito da administração ICV de AO sobre o conteúdo de grupos sulfidrilas em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos. Observou-se uma diminuição desse conteúdo em córtex cerebral, estriado e cerebelo,

mas não houve alteração desse parâmetro em hipocampo. Os resultados do presente estudo são corroborados por Schuck et al. (2009), que demonstraram *in vitro* que o AO, em concentrações de 1 e 3 mM, induziu dano oxidativo proteico, evidenciado pelo aumento no conteúdo de grupos carbonila e diminuição de grupos sulfidril, bem como diminuição nas defesas antioxidantes em estruturas cerebrais de ratos jovens. De forma similar, Derks et al. (2014) observaram danos oxidativos a proteínas e diminuição de defesas antioxidantes em eritrócitos de pacientes acometidos pela MCADD. Assim, a oxidação de grupos sulfidril de resíduos de cisteína no sítio catalítico da Na^+, K^+ -ATPase poderia colaborar para a inibição dessa atividade enzimática em córtex cerebral de ratos que receberam administração de AO. Nesse cenário, de Assis et al. (2003) observaram que a inibição *in vitro* da Na^+, K^+ -ATPase ocasionada pelo AO foi prevenida pelos antioxidantes glutathiona reduzida, protetor de grupos sulfidril (Meister e Anderson, 1983) e trolox (α -tocoferol hidrossolúvel), agente sequestrador de radicais peroxila (ROO^\cdot) (Burton et al., 1990).

Além disso, considerando-se que a Na^+, K^+ -ATPase é uma enzima integral de membrana celular e que alterações na constituição ou na fluidez da membrana podem alterar a atividade de tal enzima (Tsakiris et al., 2000; Kamboj et al., 2009), o presente estudo também investigou o efeito da administração ICV de AO sobre os níveis de TBA-RS, um marcador clássico de peroxidação lipídica, em estruturas cerebrais de ratos. Observou-se um aumento significativo dos níveis deste marcador em todas as estruturas cerebrais avaliadas dos animais do grupo AO, quando comparados ao grupo controle.

A peroxidação lipídica é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares e de organelas durante sua renovação, além de ser importante na síntese de prostaglandinas e leucotrienos. No entanto, quando este processo é exacerbado, seja por um aumento na geração de ERO ou por insuficiência das defesas antioxidantes, podem ocorrer alterações na permeabilidade e fluidez das membranas, causando perda da seletividade, alterações na troca iônica, liberação do conteúdo das organelas e formação de aldeídos citotóxicos (Ferreira e Matsubara, 1997). Nesse contexto, Viani et al. (1991) demonstraram que a peroxidação lipídica induz alterações na composição dos lipídeos de membrana e, conseqüentemente, na fluidez de membrana, levando à inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Portanto, torna-se plausível sugerir que alterações da fluidez de membrana devidas à peroxidação lipídica desencadeada pelas altas concentrações de AO poderiam ser

responsáveis pela inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase observada em córtex cerebral e hipocampo de animais submetidos à administração ICV desse ácido graxo. Entretanto, não se pode descartar outros mecanismos que levariam a alterações da atividade enzimática em questão, tais como fosforilação por PKA e PKC, modificações pós-traducionais sabidamente responsáveis por regular a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Beguin et al., 1994).

O desenvolvimento e a função cerebral são extremamente dependentes da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, enzima responsável pela geração do potencial de membrana através do transporte ativo de Na^+ e K^+ no SNC (Erecinska e Silver, 1994). Esta enzima se encontra em alta concentração nas membranas celulares cerebrais, consumindo cerca de metade do ATP gerado neste tecido (Jorgensen et al., 2003). Também participa da regulação do volume celular, diferenciação celular e manutenção do potencial de membrana. As consequências da inibição da Na^+, K^+ -ATPase pode estar correlacionadas a mecanismos neurotóxicos e morte neuronal (Sweadner, 1979; Lees, 1993).

Nesse cenário, foi demonstrado que administrações de ouabaína, um inibidor específico da Na^+, K^+ -ATPase, induziu necrose neuronal (Lees et al., 1990). Estudos realizados em modelos animais murinos demonstraram que uma inibição da Na^+, K^+ -ATPase pela administração ICV de ouabaína ocasiona alterações comportamentais, tais como aumento na atividade locomotora e comportamento agressivo, servindo como modelo animal de mania (Lopes-Borges et al., 2015). Em linha com estes achados, estudos clínicos demonstraram uma diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase em cérebro e células de sangue periférico de pacientes com transtorno de humor bipolar, sugerindo um papel para essa enzima na fisiopatologia da doença (Looney e El-Mallakh, 1997; Kirshenbaum et al., 2011; Banerjee et al., 2012). Outros estudos evidenciaram uma relação entre inibição da enzima e déficit cognitivo encontrado em doenças neurodegenerativas (Kong et al., 2005; Bagh et al., 2008; Jovicic et al., 2008). Desta forma, pode-se sugerir que alterações na atividade da Na^+, K^+ -ATPase colaborariam para as alterações comportamentais e o déficit cognitivo observado em pacientes com MCADD.

Uma importante consequência de alterações na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase é a perda do controle do volume celular e, conseqüentemente, edema. Quando há um prejuízo no funcionamento dessa enzima, ocorre um aumento na concentração intracelular de Na^+ , aumentando a osmolaridade nos espaços

intercelulares, o que atrai a água passivamente devido ao gradiente osmótico, colaborando para a formação do edema cerebral (Papadopoulos et al., 1999). De fato, edema cerebral é um dos principais achados neurológicos observados em pacientes acometidos pela MCADD (Roe e Ding, 2001). Nesse sentido, foi demonstrado que a inibição *in vitro* da Na^+, K^+ -ATPase ocasionada pelo AO em astrócitos inibiu o controle do volume celular. No presente estudo, embora tenha sido observada uma inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, não foi observada nenhuma alteração no conteúdo de água cerebral nos animais que receberam AO, o que poderia caracterizar edema. Contudo, não se pode descartar a formação de edema cerebral, visto que 1 hora após a administração pode não ter sido tempo suficiente para que ocorresse o acúmulo intracelular de água.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração ICV de AO inibiu a Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral e hipocampo de ratos, possivelmente devido a modificações oxidativas de grupos sulfidrilas no sítio catalítico da enzima e a alteração de fluidez de membrana por oxidação de lipídeos. Caso tais resultados possam ser extrapolados para a condição humana, tais os achados possam auxiliar na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos do dano cerebral característico dos pacientes afetados pela MCADD, servindo como base para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e melhora da qualidade de vida desses pacientes.

REFERÊNCIAS

Bagh MB, Maiti AK, Jana S, Banerjee K, Roy A, Chakrabarti S. Quinone and oxyradical scavenging properties of N-acetylcysteine prevent dopamine mediated inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase and mitochondrial electron transport chain activity in rat brain: implications in the neuroprotective therapy of Parkinson's disease. *Free Radical Research*. 2008;6:574-81.

Banerjee U, Dasgupta A, Rout JK, Singh OP. Effects of lithium therapy on Na⁺-K⁺-ATPase activity and lipid peroxidation in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;37:56–61.

Bastin J. Regulation of mitochondrial fatty acid β -oxidation in human: What can we learn from inborn fatty acid β -oxidation deficiencies? *Biochimie*. 2014; 113-120.

Beguin P, Beggah AT, Chibalin AV, Burgener-kairuz P, Jaisser F, Mathews PM, Rossier BC, Cotecchia S, Geering K. Phosphorylation of the Na⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit by protein kinase A and C in vitro and in intact cells. Identification of a novel motif for PKC mediated phosphorylation. *J Biol Chem*. 1994;269:24437-45.

Bennett MJ, Rinaldo P, Strauss AW. Inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2000;37:1–44.

Bibert S, Liu CC, Figtree GA, Garcia A, Hamilton EJ, Marassi FM, Sweadner KJ, Cornelius F, Geering K, Rasmussen HH. FXYD proteins reverse inhibition of the Na-K pump mediated by glutathionylation of its β 1 subunit. *J Biol Chem*. 2011;286: 18562–72.

Bottger P, Tracz Z, Heuck A, Nissen P, Romero-Ramos M, Lykke-Hartmann K. Distribution of Na, K-ATPase alpha 3 isoform, a sodium-potassium P-type pump associated with rapid-onset of dystonia parkinsonism (RDP) in the adult mouse brain. *J Comp Neurol*. 2011;519:376-404.

Burton GW, Wronska U, Stone L, Foster DO, Ingold KU. Biokinetics of dietary RRR- α -tocopherol in the male guinea-pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. *Lipids*. 1990;25:199-210.

Carageorgiou H, Sideris AC, Messari I, Liakou CI, Tsakiris S. The effects of rivastigmine plus selegiline on brain acetylcholinesterase, (Na, K)-, Mg-ATPase activities, antioxidant status, and learning performance of aged rats. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008;4:687–99.

Chakraborty H, Sen P, Sur A, Chatterjee U, Chakrabarty S. Age-related oxidative inactivation of Na⁺,K⁺-ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Exp Gerontol*. 2003;38:705-10.

Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem*. 1986;157:375–80.

Costa CG, Guérard WS, Struys EA, Holwerda U, TEN Brink HJ, Tavares DE Almeida I, Duran M, Jakobs C. Quantitative analysis of urinary acylglycines for the diagnosis of beta-oxidation defects using GC-NCI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000; 21:1215-122.

Crambert G, Li CM, Swee LK, Geering K. FXD7, mapping of functional sites involved in endoplasmic reticulum export, association with and regulation of (Na⁺, K⁺)-ATPase. *J Biol Chem*. 2004;279:30888-95.

Das AM, Drache S, Janzen N, Franke A. Macro-AST: misleading finding in an adolescent with MCAD-deficiency. *BMC Gastroenterology*. 2012; (12):119-121.

de Assis DR, Ribeiro CAJ, Rosa RB, Schuck, PF, Dalcin KB, Vargas CR, Wannmacher CMD, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Briones P, Wajner M. Evidence that antioxidants prevent the inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity induced by octanoic acid in rat cerebral cortex in vitro. *Neurochem Res*. 2003;28:1255– 63.

de Assis DR, Maria RC, Ferreira GC, Schuck PF, Latini A, Dutra-filho CS, Wannmacher CM, Wyse AT, Wajner M. Na⁺, K⁺ -ATPase activity is markedly reduced by cis-4-decenoic acid in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. *Experimental Neurology*. 2006;197:143-9.

Dencher NA, Frenzel M, Reifschneider NH, Sugawa M, Krause F. Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1100:291-8.

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: clinical presentation and outcome. *J Pediatr*. 2006;148:665-770.

Derks TG, van Dijk TH, Grefhorst A, Rake JP, Smit GP, Kuipers F, Reijngoud DJ. Inhibition of mitochondrial fatty acid oxidation in vivo only slightly suppresses gluconeogenesis but enhances clearance of glucose in mice. *Hepatology*. 2008; 47 (3):1032-42.

Durmaz R, Ertlav K, Akyuz F, Kanbak G, Bildirici K, Tel E. Lazaroid U- 74389G attenuates edema in rat brain subjected to post-ischemic reperfusion injury. *J Neurol Sci*. 2003;215:87-93.

Dutra JC, Wajner M, Wannmacher CM, Wannmacher LC, Pires RF, Rosa-junior A. Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. *Braz J Med Biol Res*. 1991;24:595-605.

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

Erecinska M, Silver IA. Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol*. 1994;7:21-9.

Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol*. 2002;67:259-279.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 1997; 43(1):61-8.

Figtree GA, Liu CC, Bibert S, Hamilton EJ, Garcia A, White CN, Chia KK, Cornelius F, Geering K, Rasmussen HH. Reversible oxidative modification: a key mechanism of Na-K pump regulation. *Circ Res*. 2009;105:185–193.

Gramer G, Haege G, Fang-Hoffmann J, Hoffmann GF, Bartram CR, Hinderhofer K, Lindner M. Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Evaluation of Genotype-Phenotype Correlation in Patients Detected by Newborn Screening. 2015; 23: 101-112.

Grisar T. Glial and neuronal Na⁺,K⁺-pump in epilepsy. *Ann Neurol*. 1984;16:128-34.

Grosse SD, Khoury MJ, Greene CL, Crider KS, Pollitt RJ. The epidemiology of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: An update. *Genet Med*. 2006;8:205- 212.

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

Heubi J, Martin J, Ichubert WK. Reye's syndrome: current concepts. *Hepatology*. 1987; 155-164. Hoffmann GF, Kries R, Klose. "Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany," *European Journal of Pediatrics*. 2004; 16 :76-80.

Horisberger JD, Kharoubi-Hess S, Guennoun S, Michielin O. The fourth transmembrane segment of the (Na⁺,K⁺)-ATPase α -subunit - A systematic mutagenesis study. *J Biol Chem*. 2004;279:29542-50.

Horowitz B, Eakle KA, Scheiner-Bobis G, Randolph GR, Chen CY, Hitzeman RA, Farley RA. Synthesis and assembly of functional mammalian Na, K-ATPase in yeast. *J Biol Chem*. 1990;265:4189-92.

Hotchkiss RS, Karl IK. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348:138–150.

Jeremias IC, Scaini G, Constantino L, Ferreira AK, Scherer EBS, Kolling J, Dornelles AS, Wyse ATS, Bogó MR, Streck EL, Dal-Pizzol F. The decrease on Na⁺,K⁺-ATPase activity in the cortex, but not in hippocampus, is reverted by antioxidants in an animal model of sepsis. *Mol Neurobiol.* 2012;46:467-74.

Jones DH, Matus AI. Isolation of plasma synaptic membrane from brain by combination flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta.* 1974;356:276–87.

Jorgensen PL. Mechanism of the Na⁺, K⁺ pump, protein structure and conformations of the pure (Na⁺- K⁺)-ATPase. *Biochem Biophys Acta.* 1982;694:27-68.

Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJD. Structure and mechanism of Na⁺,K⁺-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:817-49.

Jorgensen PL, Pedersen PA. Structure-function relationships of Na⁺ , K⁺ , ATP, or Mg²⁺ binding and energy transduction in Na,K-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1505:57-74.

Jovicic ME. Aging, aluminium and basal forebrain lesions modify substrate kinetics of erythrocyte membrane Na⁺,K⁺-ATPase in the rat. *J Alzheimers Dis.* 2008;1:85-93.

Kamboj SS, Chopra K, Sandhir R. Hyperglycemia-induced alterations in synaptosomal membrane fluidity and activity of membrane bound enzymes: beneficial effect of N-acetylcysteine supplementation. *Neurosciense.* 2009;162:349–58.

Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:511-35.

Kim CS, O'tuama LA, Mann JD, Roe CR. Effect of increasing carbon chain length on organic acid transport by the choroid plexus: a potential factor in Reye's syndrome. *Brain Res.* 1983;259:340-3.

Kirshenbaum GS, Clapcote SJ, Duffy S, Burgess CR, Petersen J, Jarowek KJ. Mania-like behavior induced by genetic dysfunction of the neuron-specific Na⁺, K⁺-ATPase α 3 sodium pump. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;181:44–9.

Kolvraa S, Gregersen N, Christensen E, Hobolth N. In vitro fibroblast studies in a patient with C6-C10-dicarboxylic aciduria: evidence for a defect in general acyl-CoA dehydrogenase. *Clin Chim Acta*. 1982;126:53-67.

Kompare M, Rizzo WB. Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Semin Pediatr Neurol*. 2008;15:149-149.

Kong LN. Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer disease. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005;6:666-72.

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

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; 9:9-7.

Lees GJ. Contributory mechanism in the causation of neurodegenerative disorders. *Neurosci*. 1993;54:287-322.

Lees GJ, Lehmann A, Sandberg M, Hamberger A. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 1990;120:159-162.

Leydiker JA, Neidich FL, Barr MR, Puckett ML, Lobo RM, Abdenur JE. Maternal medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency identified by newborn screening. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2011; 92-95.

Looney SW, El-Mallakh RS. Meta-analysis of erythrocyte Na, K-ATPase activity in bipolar illness. *Depress Anxiety*. 1997;5:53–65.

Lopes-Borges J, Valvassori SS, Varela RB, Tonin PT, Vieira JS, Gonçalves CL, Streck EL, Quevedo J. Histone deacetylase inhibitors reverse manic-like behaviors and protect the rat brain from energetic metabolic alterations induced by ouabain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015;128:89-95.

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):5-9.

Maegawa GH, Poplawski NK, Andresen BS, Olpin SE, NIE G, Clarke JT, Teshima I. Interstitial deletion of 1p22.2p31.1 and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in a patient with global developmental delay. *American Journal of Medical Genetics.* 2008; 146:1581-1586.

Martin DW. Structure-Function. Relationships in the Na⁺, K⁺ -Pump. *Semin Nephrol.* 2005;198:282-91.

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

Mayell SJL, Edwards FE, Reynolds AB. Chakrapani. Late presentation of mediumchain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2007; 30:104

Mc Grail KM, Phillips JM, Sweadner KJ. Immunofluorescent localization of three Na, K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na, K-ATPase. *J Neurosci.* 1991;11:381-391.

Meister A, Anderson ME, Glutathione. *Ann Rev Biochem.* 1983;52:711-60.

Moreira JCF, Wannmacher CMD, Costa SM, Wajner M. Effect of proline administration on rat behavior in aversive and nonaversive tasks. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989;32:885-90.

Nag S, Manias JL, Stewart DJ. Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema. *Acta Neuropathologica*. 2009;118:197–217.

Oerton J, Khalid JM, Besley, Dalton G, Downing M, Green A, Dezateux C. Newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in England: prevalence, predictive value and test validity based on 1.5 million screened babies. *Journal of Medical Screening*. 2001; 18(4): 173–181.

Olson JE, Holtzman D, Sankar R, Lawson C, Rosenberg R. Octanoic acid inhibits astrocyte volume control: implications for cerebral edema in Reye's syndrome. *J Neurochem*. 1989;52:1197-202.

Onkenhout W, Venizelos V, Van der Poel PF, Van den Heuvel MP, Poorthuis BJ. Identification and quantification of intermediates of unsaturated fatty acid metabolism in plasma of patients with fatty acid oxidation disorders. *Clin Chem*. 1995;41:1467-74.

Papadopoulos MC, Lamb FJ, Moss RF, Davies DC, Tighe D, Bennett ED. Fecal peritonitis causes edema and neuronal injury in pig cerebral cortex. *Clinical Science*. 1999;96:461-6.

Rapport RL, Harris AB, Friel PN, Ojemann GA. Human epileptic brain Na, K ATPase activity and phenytoin concentrations. *Arch Neurol*. 1975;32:549-54.

Rauchova H, Drahota Z, Koudelova J. The role of membrane fluidity changes and thiobarbituric acid-reactive substances production in the inhibition of cerebral cortex Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Physiol Res*. 1999;48:73-8.

Reis de Assis D, Maria RC, Rosa RB, Schuck PF, Ribeiro CA, Ferreira GC, Dutra-filho CS, Wyse ATS, Wannmacher CMD, Perry MLS, Wajner M. Inhibition of energy metabolism in cerebral cortex of young rats by the medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency. *Brain Research*. 2004;1030:141-151.

Renkawek K, Renier WO, de Pont JJ, Voegels OJ, Gabreels FJ. Neonatal status convulsivus, spongiform encephalopathy and low activity of Na⁺,K⁺-ATPase activity in the brain. *Epilepsy*. 1992;33:58-64.

Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ. Fatty acid oxidation disorders. *Annu Ver Physiol*. 2002;64:477–502.

Roe CR, Ding J. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: Scriver C, Beaudet AL, Sly W, et al., editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill. 2001;1909-1963.

Ruitenbeek W, Poels PJ, Turnbull DM, Garavaglia B, Chalmers RA, Taylor RW, Gabreels FJ. Rhabdomyolysis and acute encephalopathy in late onset medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. 1995; 209-214.

Sanui H, Rubin H. The role of magnesium in cell proliferation and transformation. In: Boynton AL, McKeehanWL, Whitfield JP (eds) *Ions, cell proliferation and cancer*. Academic Pr, New York. 1982;517– 537.

Saudubray JM, Martin D, de Lonlay P, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, Jouvét P, Boutron M, Slama A, Vianey-Saban C, 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.

Schuck PF, De Assis DR, Viegas CM, Pereira TC, Machado JL, Furlanetto CB, Bogo MR, Streck EL, Ferreira GC. Ethylmalonic acid modulates Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase activity and mRNA levels in rat cerebral cortex. *Synapse*. 2013;67:111-7.

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. *Neurochemistry International*. 2009b;54:519–25.

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;41:1261-1272.

Schuck PF, Ferreira GC, Tonin AM, Viegas CM, Busanello EN, 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 Res.* 2009a;1296:117-26.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* 8^a ed. New York: McGraw-Hill. 2001;3-45.

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

Suhail M. Na, K –ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions. *J Clin Med Res.* 2010;2:1-17.

Sturm D, Herebian M, Mueller MD, Laryea, and . piekerkoetter, "Functional effects of different medium-chain acyl-CoA dehydrogenase genotypes and identification of asymptomatic variants," *PLoS ONE.* 2012.

Tsakiris S, Angelogianni P, Schulpis K, Behrakis P. Protective effect of LCysteine and Gluthatione on Rat Brain Na⁺, K⁺-ATPase Inhibition Induced by Free Radicals. *Z Naturforsch.* 2000;55:271-7.

Tsakiris S, Delicostantinos G. Influence of phosphatidylserine on (Na⁺ 1 K⁺)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes. *Biochem J.* 1984;220:301–7.

Vianey-Liaud C, Divry P, Gregersen N, Mathieu M. The inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *J Inherited Metab Dis.* 1987;10:159-98.

Viani P, Cervato G, Fiorilli A, Cestaro B. Age-related differences in synaptosomal peroxidative damage and membrane properties. *J Neurochem.* 1991;56:253–8.

Wang XQ, Xiao AY, Sheline C, Hyrc K, Yang A, Goldberg MP, Choi DW, Yu SP. Apoptotic insults impair Na⁺, K⁺-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. *J Cell Sci.* 2003;116:2099-110.

Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med.* 1999;340:207–214.

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. 2007; 37-42.

Wiles JR, Leslie N, Knilans TK, Akinbi H. Prolonged QTc interval in association with medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Pediatrics.* 2014; 133 (6): 1781-6.

Wyse ATS, Bolognesi G, Brusque AM. Na⁺, K⁺ - ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subject to chemically induced phenylketonuria. *Med Sci Res.* 1995;23:261- 2.

Wyse ATS, Noriler ME, Borges LF, Floriano PJ, Silva CG, Wajner M, Wannmacher CMD. Alanine prevents the decrease of Na⁺, K⁺-ATPase activity in experimental phenylketonuria. *Metab Brain Dis.* 1999;14:95-101.

Wyse ATS, Streck EL, Worm P, Wajner M, Ritter F, Netto CA. Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res.* 2000;25:969-973.

Yakushev S, Band M, Tissot van Patot MC, Gassmann M, Avivi A, Bogdanova A. Cross talk between S-nitrosylation and S-glutathionylation in control of the Na,K-ATPase regulation in hypoxic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;303:1332-43.

Yu SP. Na⁺,K⁺-ATPase: the new face of an older player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:1601-1609.

Yufu K, Itoh T, Edamatsu R, Mori A, Hirakawa M. Effect of hyperbaric oxygenation on the Na⁺,K⁺-ATPase and membrane fluidity of cerebrocortical membranes after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurochem Res.* 1993;16:1033–1039.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



Resolução



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 Lummertz Magenis, Clarissa Martinelli Comin, Diogo Dominguini, 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 Lummertz Magenis, Clarissa Martinelli Comin, Diogo Dominguini, 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*