



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS,  
ELETRENCEFALOGRAFICAS E DA OXIDAÇÃO PROTÉICA  
INDUZIDAS PELA INJEÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO EM RATOS**

---

**Flávia Karine Rigo**

**CMBT  
SANTA MARIA – RS - BRASIL  
2005**

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS,  
ELETRENCEFALOGRAFICAS E DA OXIDAÇÃO PROTÉICA  
INDUZIDAS PELA INJEÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO EM RATOS**

---

por

**Flávia Karine Rigo**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Bioquímica  
Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de

**MESTRE em Bioquímica Toxicológica.**

**CMBT  
SANTA MARIA – RS – BRASIL  
2005**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Curso de Mestrado em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS,  
ELETRENCEFALOGRAFICAS E DA OXIDAÇÃO  
PROTÉICA INDUZIDAS PELA INJEÇÃO DE ÁCIDO  
PROPIÔNICO EM RATOS**

elaborada por  
**Flávia Karine Rigo**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Carlos Fernando de Mello  
(Orientador)**

---

**Dominguita L. Graça**

---

**Eliane Zanchet**

**Santa Maria, 05 de agosto de 2005**

*“o mistério da vida me causa a mais forte emoção.*

*É o sentimento que suscita a beleza e a verdade; cria a arte e a ciência .*

*Quem não conhece essa sensação, ou não pode mais experimentar espanto ou surpresa já é*

*um morto-vivo e seus olhos lhe cegaram”.*

*Albert Einstein*

Meus queridos pais, Eugênio e Helena: a vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. A vocês que revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação para que eu prosseguisse sem medo. A vocês, que me incentivaram, quando tudo parecia impossível e inatingível. Com muito amor, dedico, esta vitória a vocês!

## AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer coisa, agradeço a Deus que se fez presente em todos os momentos firmes e trêmulos, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir. A Vós, que me deste a vida e a vocação e que me permitiu chegar até aqui, o meu eterno agradecimento.

A toda minha família, meu porto seguro, especialmente minha mãe Helena, meu pai Eugenio, meu irmão Fernando, a Mari, a Gabi ...que sempre me incentivaram a crescer e proporcionaram a realização dessa conquista. Obrigada pelo apoio, pelas palavras de incentivo, pela nossa amizade e união. Amo muito vocês e agradeço a Deus por me presentear com pessoas maravilhosas como vocês.

A uma pessoa muito especial, Roberto Fuhr que mesmo distante, sempre esteve presente... pela paciência, pelo amor e apoio ao longo deste anos, contribuindo para esta conquista ... minha gratidão.

Agradeço ao meu orientador, professor Carlos, pela amizade, dedicação e acima de tudo pela confiança e oportunidade de crescimento.

A professora Maribel pelas dicas, amizade, incentivo...

À minha querida "irmãzinha", Liana Pasquetti, agradeço por tudo, pela amizade sincera, companheirismo, incentivo, disponibilidade... Por todos esses anos maravilhosos de convivência, e, além disso, por contribuir e participar desse sonho que é nosso. Te adoro muito, tenho certeza de que sem você teria sido muito mais difícil...Obrigada.

Aos meus queridos companheiros, Cris e Rafael, agradeço pela dedicação ao nosso trabalho, pelos feriados e finais de semana trabalhando, pela amizade e enfim por agüentarem as minhas “crises”....Valeu.

A minha querida amiga Daiane, pela amizade, apoio nas horas difíceis, pela forcinha no português, pela convivência maravilhosa, durante a realização desse sonho, você também faz parte dele, te adoro muito.

Ao Rick, meu “chefinho”, agradeço pela confiança, por me aceitar como amiga e colega. Pelo companheirismo, estudo, viagens pra UFRGS, festinhas e muito mais ...Valeu.

A duas pessoas muito especiais, que adorei ter conhecido. Agradeço a Elisa Beti Stefanon e Patrícia Marisco, que deram o “empurrãozinho” inicial para iniciar a minha vida na pesquisa...Muito Obrigada.

Ao meu eterno mestre Tabajara Gaúcho da Costa, pelo exemplo, estímulo e pela amizade, por ser essa pessoa generosa, sempre pronta a ajudar... minha gratidão.

Ao Nando e a Mi, pelo apoio e ajuda para que tudo isso fosse concretizado, pelo incentivo nos momentos de fraqueza, agradeço de coração pela amizade e carinho.

Ao seu Paulino... uma pessoa indispensável para a realização desse trabalho, tanto na parte elétrica, como também no apoio, positivismo e incentivo para prosseguir tentando...quando tudo parecia impossível. A minha gratidão.

Ao seu Florindo... pela sua dedicação, pelos vários problemas solucionados, amizade, alegria...Obrigada.

A todos os professores da bioquímica que sempre me acolheram com muito carinho, pelo apoio e pelo conhecimento que me proporcionaram.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de crescimento, aprendizagem e progresso.

A Ju, Ale, Keli, Valéria por compartilharem comigo momentos bons e ruins, pela amizade sincera, pelas conversas infundáveis. A Ana e o Mauro pelo apoio e ajuda no que fosse preciso... carbonil... scan...pingo..., a Aninha, a Vivi, a Marinei pela força, carinho e amizade. Ana Paula, a Gerusa, o Gustavo, a Gabi, a Pati, a Nádia, o João, a Natália, o Aledson... "gente boa"... pelo positivismo, pela parceria perfeita...festinhas..."papos fora de hora"... cafezinho no 20...pelas dicas, pela forcinha no computador. Enfim agradeço a todos os colegas de laboratório que de alguma maneira me ajudaram, pelo apoio e pelos momentos descontraídos, por me acolherem maravilhosamente bem, por fazerem parte da minha vida.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xviii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1-Erros inatos do metabolismo.....	2
1.1.1-Acidemias Orgânicas.....	2
1.1.2 - Metabolismo do propionato .....	3
1.1.3 -Acidemia propiônica.....	5
1.2 - Excitotoxicidade induzida por prejuízo energético.....	8
1.3 - Espécies reativas.....	12
1.3.1 - Defesas antioxidantes.....	15
1.3.2 - Suscetibilidade cerebral ao estresse oxidativo.....	16
1.3.3 - Oxidação protéica.....	18
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 – Objetivo geral.....	21
2.2 – Objetivos específicos.....	21
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 - Reagentes .....	23
3.2 - Equipamentos.....	23
3.3 - Animais.....	24
3.4 - Procedimentos cirúrgicos.....	24
3.4.1 - Implantação da cânula de injeção.....	24
3.4.2 - Implantação dos eletrodos para eletrencefalografia.....	25
3.5 - Estudo eletrencefalográfico.....	26
3.6 - Parâmetros comportamentais.....	26

3.7 - Avaliação bioquímica.....	27
3.7.1 - Determinação dos grupos carbonil das proteínas.....	27
3.7.2 - Determinação de proteína.....	28
3.8 - Análise estatística.....	28
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
4.1 – Avaliação comportamental .....	30
4.1.1 - Efeito da injeção de ácido propiônico e do pré-tratamento com MK-801 sobre o comportamento dos ratos na tarefa do campo aberto.....	30
4.1.2 - Efeito do ácido propiônico sobre o número de episódios convulsivos.....	31
4.1.3 - Efeito do ácido propiônico sobre o tempo dos episódios convulsivos.....	32
4.1.4 - Efeito do ácido propiônico sobre a carbonilação protéica.....	33
4.1.5 - Efeito do MK-801 sobre o número de episódios convulsivos induzidos por ácido propiônico .....	34
4.1.6 - Efeito do MK-801 sobre o tempo dos episódios convulsivos induzidos por ácido propiônico.....	35
4.1.7 - Efeito do MK-801 sobre a carbonilação protéica induzida por ácido propiônico.....	36
4.2 – Registros eletrencefalográficos.....	37
4.2.1 - Registro eletrencefalográfico basal observado minutos antes da administração de ácido propiônico no estriado.....	37
4.2.2 - Registro eletrencefalográfico observado 5 a 7 minutos após a injeção de salina.....	38
4.2.3 - Registro após 5 a 7 minutos após a injeção de ácido propiônico .....	39
4.2.4 - Registro após 8 a 10 minutos após a injeção de ácido propiônico.....	40
4.2.5 - Registro de 12 a 15 minutos após a injeção de ácido propiônico.....	41
4.2.6 - Registro eletrencefalográfico basal observado minutos antes da administração de MK-801 no estriado.....	42

4.2.7 - Registro imediatamente após a injeção de MK-801.....	43
4.2.8 - Registro 13 a 15 minutos após a injeção de MK-801.....	44
4.2.9 - Registro da administração de MK-801 e PA (I).....	45
4.2.10 - Registro da administração de MK-801 e PA (II).....	46
4.2.11- Registro da administração de MK-801 e PA (III).....	47
4.3 - Avaliação dos parâmetros comportamentais.....	48
4.3.1 - Efeito da administração intraestriatal de ácido propiônico e do pré-tratamento com Mk-801 sobre os episódios convulsivos.....	48
4.4 – Avaliação das alterações bioquímicas.....	48
4.4.1 - Efeito da administração intraestriatal de ácido propiônico e do pré-tratamento com Mk-801 sobre a carbonilação protéica.....	48
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>

$\mu\text{l}$  – Microlitro

$\mu\text{mol}$  – Micromol

$^1\text{O}_2$  – Oxigênio singlete

3-NPA – ácido 3-nitropropiónico

ATP - Adenosina trifosfato

$\text{Ca}^{++}$  - Cálcio

$\text{CO}_2$  – Dióxido de Carbono

$\text{Cu}^{+2}$  – Cobre

$\text{Cu}^{+2}/\text{Zn}^{+2}\text{SOD}$  – Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNPH – Dinitrofenilhidrazina

EEG – Eletrencefalograma

EIM – Erro inato do metabolismo

ER – Espécie reativa

g – grama

GPx – Glutaciona peroxidase

GSH – Glutaciona reduzida

$\text{H}_2\text{O}$  – Água

$\text{H}_2\text{O}_2$  – Peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico

$\text{HO}_2^\bullet$  - Hidroxiperoxil

HOCL – Ácido hipocloroso

i.p. – intraperitoneal

Kg – Quilograma

mg – miligrama

$\text{Mg}^{+2}$  – Magnésio

MK-801 – Dizocilpina

ML – Mililitro

mM - Milimolar

MMA – Ácido metilmalônico

MA – Ácido malônico

MnSOD – Superóxido dismutase dependente de manganês

Na<sup>+</sup> - Sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

nm – Nanômetro

NMDA – N-metil-D-aspartato

NO<sup>•</sup> - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

O<sub>2</sub> – Oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - Radical superóxido

O<sub>3</sub> – Ozônio

OH<sup>-</sup> - Radical hidroxila

ONOO<sup>-</sup> - Peroxinitrito

ONOOH – Peroxinitrito na sua forma protonada

PA - Ácido propiônico

RO<sup>•</sup> - Radical alcóxil

RO<sub>2</sub><sup>•</sup> - Radical peróxil

SDH – Succinato desidrogenase

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

Tbars – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

v/g – volume por grama

Zn – Zinco

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1:</b> Metabolismo do propionil-CoA: metabólitos, enzimas e cofatores.....	4
<b>FIGURA 2:</b> Inibição metabólica do metilcitrato.....	7
<b>FIGURA 3:</b> Glutamato e neurotoxicidade.....	9
<b>FIGURA 4:</b> Célula em condições normais.....	10
<b>FIGURA 5:</b> Alterações prováveis induzidas por inibidores metabólicos.....	11
<b>FIGURA 6:</b> Metabolismo oxidativo e neurotransmissão.....	16
<b>FIGURA 7:</b> Cérebro e estresse oxidativo.....	17
<b>FIGURA 8:</b> Efeito do ácido propiônico sobre o número de episódios convulsivos.....	30
<b>FIGURA 9:</b> Efeito do ácido propiônico sobre o tempo dos episódios convulsivos.....	31
<b>FIGURA 10:</b> Efeito do ácido propiônico sobre a carbonilação protéica.....	32
<b>FIGURA 11:</b> Efeito do MK-801 sobre o número de episódios convulsivos induzidos por ácido propiônico .....	33
<b>FIGURA 12:</b> Efeito do MK-801 sobre o tempo dos episódios convulsivos induzidos por ácido propiônico .....	34
<b>FIGURA 13:</b> Efeito do MK-801 sobre a carbonilação protéica induzida por ácido propiônico .....	35
<b>FIGURA 14:</b> Registro eletrencefalográfico basal observado minutos antes da administração de ácido propiônico.....	36
<b>FIGURA 15:</b> Registro eletrencefalográfico observado 5 a 7 minutos após a injeção de salina.....	37
<b>FIGURA 16:</b> Registro após 5 a 7 minutos após a injeção de ácido propiônico.....	38
<b>FIGURA 17:</b> Registro após 8 a 10 minutos após a injeção de ácido propiônico.....	39
<b>FIGURA 18:</b> Registro de 12 a 15 minutos após a injeção de ácido propiônico.....	40
<b>FIGURA 19:</b> Registro eletrencefalográfico basal observado minutos antes da administração de MK-801 no estriado.....	41

<b>FIGURA 20:</b> Registro imediatamente após a injeção de MK-801 no estriado.....	42
<b>FIGURA 21:</b> Registro 13 a 15 minutos após a injeção de MK-801.....	43
<b>FIGURA 22:</b> Registro da administração de MK-801 e PA (I).....	44
<b>FIGURA 23:</b> Registro da administração de MK-801 e PA (II).....	45
<b>FIGURA 24:</b> Registro da administração de MK-801 e PA (III).....	46

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1:</b> Principais alvos dos radicais livres e suas conseqüências biológicas.....	14
<b>TABELA 2:</b> Efeito da administração intraestriatal de PA (6 µmol), NaCl (9 µmol), ou MK-801 (3nmol) + PA (6 µmol) sobre o comportamento dos ratos na tarefa do campo aberto.....	30



**Título:** Avaliação das alterações comportamentais, eletrencefalográficas e da oxidação protéica induzidas pela injeção intraestriatal de ácido propiônico em ratos.

**Aluno:** Flávia Karine Rigo

**Orientador:** Carlos Fernando de Mello

## RESUMO

O ácido propiônico é encontrado em altas quantidades nos tecidos de pacientes com acidemia propiônica, uma doença genética do metabolismo de aminoácidos e lipídeos, causada por deficiência grave na atividade da enzima propionil-CoA carboxilase. Os níveis de ácido propiônico no sangue e fluido cérebro espinhal geralmente alcançam níveis entre 2,5-5,0 mM durante crises, e pode chegar a níveis maiores em células neuronais. Entre os sintomas neurológicos apresentados pelos pacientes o retardo mental e psicomotor, as convulsões locais e generalizadas, a atrofia cerebral e anormalidades do EEG são os mais freqüentes. Depois da implantação da cânula os ratos receberam injeções intraestriatais de PA (0,6; 2 and 6  $\mu\text{mol}$ ), Mk-801(3 nmol)+PA (6  $\mu\text{mol}$ ) ou NaCl (9  $\mu\text{mol}$ ). O presente trabalho avaliou o efeito da administração intraestriatal de ácido propiônico, no comportamento dos ratos na tarefa de "open field" e em registros eletrencefalográficos. O PA causou convulsões e aumentou a carbonilação protéica. A administração de MK-801 atenuou convulsões e a carbonilação protéica induzidas por ácido propiônico. Esses resultados sugerem o envolvimento dos receptores NMDA e do estresse oxidativo nas alterações comportamentais induzidas por ácido propiônico.

**Title: Propionic acid induces electrographic convulsions and protein oxidation in rats.**

**Student:** Flávia Karine Rigo

**Adviser:** Carlos Fernando de Mello

### **ABSTRACT**

Propionic acid (PA) is found in high amounts in tissues of patients with propionic acidemia, an inherited disorder of amino acid and lipid metabolism caused by severe deficiency of propionil-CoA-carboxylase activity. PA levels in blood and cerebral spinal fluid (CSF) usually reach 2,5- 5,0 mM during crises and can be much higher in the neuronal cells. Among the neurologic symptoms often presented, psychomotor delay/mental retardation, focal and generalized convulsions, cerebral atrophy and abnormalities are the most frequent. After cannula placing, rats received unilateral intrastriatal injections de PA (0,6; 2 and 6  $\mu$ mol), MK-801 (3 nmol)+PA (6  $\mu$ mol) or NaCl (9 $\mu$ mol). The effect of the intrastriatal administration of propionic acid on the behavior of rats in an open field and on EEG recording was assessed. PA caused convulsions and increased PA-induced protein carbonylation. MK-801 administration prevented PA-induced convulsions and protein carbonilation. These results suggest the involvement of NMDA receptors and oxidative stress in the PA-induced behavioral alterations.

## 1.1 - Erros inatos do metabolismo

Archibald Garrod em 1908 empregou o termo erro inato do metabolismo para se referir a situações clínicas que ele acreditou serem conseqüentes a defeitos em vias metabólicas. Erros inatos do metabolismo são distúrbios hereditários transmitidos, em sua maioria, de maneira autossômica recessiva. Os EIM são alterações genéticas que se manifestam pela síntese de uma proteína anômala, geralmente uma enzima, podendo expressar-se na troca de uma seqüência primária (alteração estrutural) com modificações das suas propriedades cinéticas, diminuindo a sua estabilidade biológica e facilitando a sua degradação “*in vivo*”. Individualmente são doenças raras, mas em seu conjunto atingem pelo menos um para cada mil nascimentos (Fenton et al, 2001).

A origem de um EIM, algumas vezes ocorre devido à falta de atividade de determinada enzima ou co-fator, isto faz com que certas reações químicas não se processem com a velocidade e eficiência necessárias, ocorrendo um “bloqueio” de determinada via metabólica. O resultado desse bloqueio pode levar ao acúmulo de substâncias essenciais, ocasionando muitas vezes distúrbios no desenvolvimento mental e/ou físico do indivíduo (Del Rio, 1962).

### 1.1.1 - Acidemias orgânicas

As acidemias ou acidurias orgânicas fazem parte de um grupo de EIM caracterizadas, bioquimicamente, pelo acúmulo de um ou mais ácidos orgânicos (Chalmers & Lawson, 1982) nos tecidos de pacientes afetados, causadas por deficiência grave ou ausência na atividade de enzimas específicas do catabolismo de aminoácidos, carboidratos ou lipídeos (Chalmers et al, 1980).

As principais manifestações clínicas das acidemias orgânicas envolvem o sistema nervoso central incluindo regressão neurológica, coma, ataxia, convulsões, hipotonia, hipertonia, irritabilidade, tremores, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (Klose et al, 2002), e ainda manifestações em outros sistemas tais como vômito, hepatopatias, miopatias, cardiomiopatias e infecções recorrentes.

A identificação dos padrões anormais dos ácidos orgânicos depende da identificação de vários ácidos orgânicos específicos na urina, muitas vezes, é necessária a análise de amostras coletadas em períodos distintos e especialmente durante crises de descompensação metabólica. Além disso, testes de sobrecarga com substratos proximais ao bloqueio metabólico também podem ser necessários.

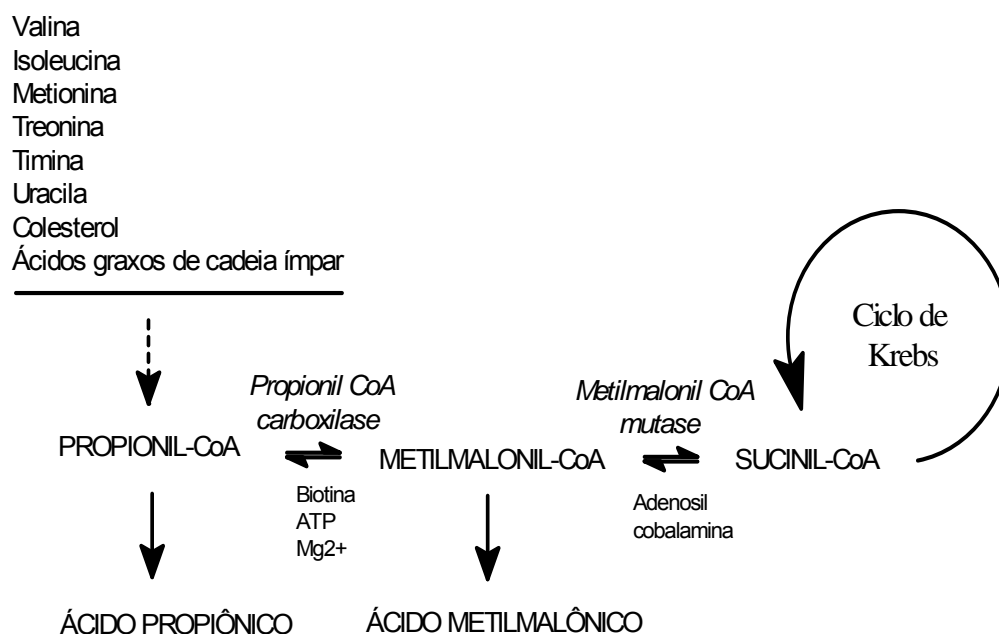
EIM, incluindo acidemias orgânicas, representam importante problema de saúde e seu diagnóstico, freqüentemente, se constitui em um desafio para o clínico. A demora no diagnóstico para os casos mais graves pode ser fatal, sendo que uma parcela considerável dos pacientes afetados morre sem diagnóstico ou com diagnóstico de septicemia ou parada cardiorespiratória (Wajner et al, 2001).

#### 1.1.2 - Metabolismo do propionato

Em mamíferos não ruminantes, a maior parte do propionil-CoA é proveniente do metabolismo lipídico e protéico. O catabolismo de alguns aminoácidos como isoleucina, metionina e treonina levam à formação de propionil-CoA, assim como a valina e seu metabólito, o ( $^{13}\text{C}$ ) isobutirato, também participam da formação de propionato. Thompson et al (1990), afirmaram que aproximadamente 50% do propionil-CoA formado em pacientes com acidemias propiônica e metilmalônica é uma consequência do metabolismo de aminoácidos.

Estudos sugerem também o envolvimento de bactérias intestinais na formação de propionil-CoA, e essa contribuição parece ser um fator importante no acúmulo de ácido propiônico em pacientes portadores de alterações na rota de degradação do propionato, já que contribui com cerca de 20% dessa formação (Thompson et al, 1990). Outras fontes geradoras de propionil-CoA são as rotas de degradação de bases nitrogenadas como timina e uracil, bem como, a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos de cadeia ímpar, que leva à formação de 1 mol de propionil-CoA por mol de ácido graxo oxidado (Fenton & Rosemberg, 1995). Além disso, a degradação da cadeia lateral de colesterol também leva a essa síntese, porém esta parece ser a via de menor importância significativa. (Danielsson, 1963).

O propionil-CoA é convertido a succinil-CoA através de três reações enzimáticas consecutivas (figura 1). A primeira é responsável pela carboxilação de propionil-CoA até a formação de D-metilmalonil-CoA, catalisada pela enzima propionil-CoA carboxilase (EC 6.4.1.3.), que utiliza bicarbonato e ATP e tem como cofatores biotina e magnésio. O D-metilmalonil-CoA é racemizado, pela enzima metilmalonil-CoA racemase (EC 5.4.99.2), já que a forma isomérica D não serve como substrato para a reação seguinte. A partir daí, esse composto servirá de substrato para a enzima metilmalonil-CoA mutase (EC 5.4.99.2.) catalisar a isomerização do L-metilmalonil CoA a succinil CoA, onde o grupo carboxila ScoA é transferido através de uma isomerização intramolecular de C-2 para C-3. O succinil-CoA poderá então, ser oxidado no ciclo do ácido cítrico (Fenton & Ronsenberg, 1995).



**Figura 1-** Metabolismo do propionil CoA: metabólitos, enzimas e cofatores. O passo que envolve a conversão de D-metilmalonil-CoA em L-metilmalonil-CoA, catalisado pela enzima metilmalonil-CoA racemase foi suprimido, da mesma forma que o bicarbonato utilizado pela propionil-CoA carboxilase, por motivos de clareza ( modificado de Fenton & Rosemberg, 1995).

### 1.1.3 - Acidemia propiônica

Acidemia propiônica, uma das mais freqüentes acidemias orgânicas, é um erro inato do metabolismo autossômico recessivo caracterizado por acúmulo de ácido propiônico no sangue e na urina de pacientes (concentração sérica de 5,4 mM, 100 vezes superior aos valores encontrados em crianças normais) (Fenton & Rosemberg, 2001) e de outros metabólitos secundários como, metilcitrato, 2-butanona,  $\beta$ -OH-propionato, propionilglicina e ácido tíglico. Muitos estudos sugerem, ainda, uma anormalidade no metabolismo dos aminoácidos metionina, treonina e de aminoácidos de cadeia ramificada, os quais podem levar ao aumento nas concentrações plasmáticas de valina, isoleucina e leucina. (Fenton & Rosemberg, 1995).

Essa doença, cuja incidência é estimada em 1:40.000 nascimentos (Duran et al, 1994), é caracterizada por deficiência na atividade da enzima propionil-CoA carboxilase (EC 6.4.1.3.), responsável por converter propionil-CoA em metilmalonil-CoA.(Figura 1). Pacientes que apresentam deficiência na atividade de propionil-CoA carboxilase (EC 6.4.1.3.), acumulam propionil-CoA que será, por tiólise espontânea convertido a ácido propiônico (figura 1) ou se condensará com oxalacetato para formar metilcitrato (um dos principais metabólitos encontrados nesses pacientes) (Ando et al, 1972), uma condensação análoga àquela do acetil-CoA e oxalacetato para formar citrato. É possível que o acúmulo de propionil-CoA por longo tempo de exposição altere a especificidade do substrato da enzima citrato sintase, para propionil-CoA (Ando et al, 1972).

Os sintomas desse EIM variam em gravidade de acordo com a idade em que se instalam. Quando a instalação desses sintomas ocorre nos primeiros dias de vida (até 21 dias) o paciente geralmente vai a óbito e apresenta maior morbidade (Ogier et al, 1990). Os pacientes que sobrevivem (cerca de 15% em dois anos) apresentam alterações comportamentais, neuropsiquiátricas, retardo mental e psicomotor e convulsões (Hoffmann et al., 1993; Brismar & Ozand, 1994).

Estudos demonstram, que a sintomatologia e alterações bioquímicas dessa doença são caracterizadas por desidratação, vômitos, perda de peso, hipotonia muscular, apatia, acidose metabólica grave, hiperamonemia, hipoglicemia,

hiperglicemia, entre outros sintomas (Lenhert et al, 1994, Fenton & Rosemberg, 1995). Além disso, encontramos alterações morfológicas no SNC, sugerindo uma diminuição da mielinização. (Brismar & Ozand, 1994).

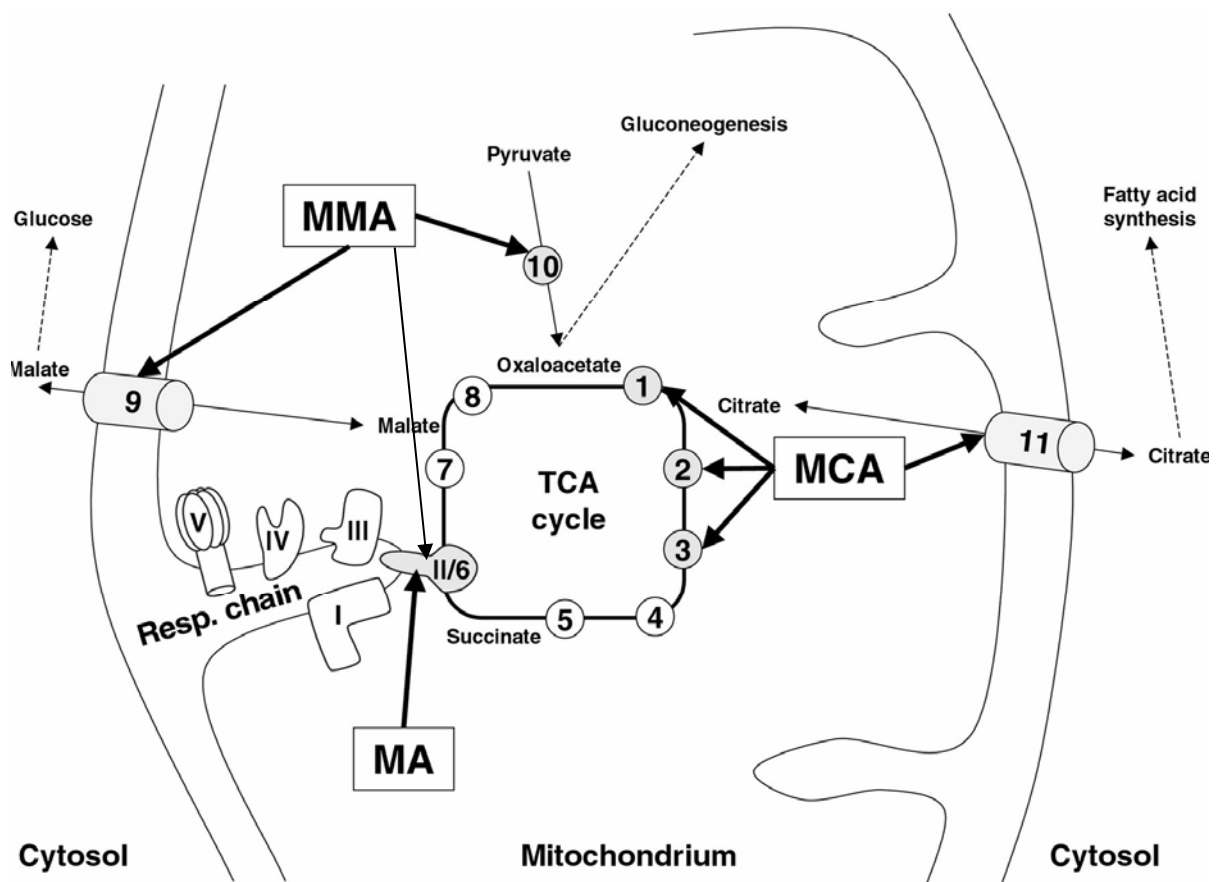
A patofisiologia da disfunção neurológica nessa doença, não está totalmente esclarecida. Entretanto, nos últimos anos a contribuição da disfunção mitocondrial, excitotoxicidade e estresse oxidativo estão sendo evidenciados, como os prováveis mecanismos envolvidos na lesão cerebral em um número de acidemias orgânicas (Wajner e Coelho, 1997, Kölker et al, 1999; Fontella et al, 2000; 2001; Brusque et al, 2001; 2002; Bridi et al, 2003; Fighera et al, 2003; Malfatti et al, 2003; Royes et al, 2003; Frizzo et al, 2004).

Pesquisas com modelos animais têm proporcionado um melhor entendimento dos prováveis mecanismos pelos quais o ácido propiônico exerce seus efeitos neurotóxicos. Há relatos na literatura de que esse ácido reduz a atividade  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em membranas plasmáticas de córtex cerebral em ratos tratados cronicamente (Wyse et al, 1998). Inibe o consumo de  $\text{O}_2$  em mitocôndrias hepáticas de ratos quando  $\alpha$ -cetoglutarato, piruvato ou succinato foram usados como substrato (Stumpf et al, 1980) e diminui o conteúdo de ATP em mitocôndrias hepáticas de ratos, quando o glutamato ou o succinato serviram como substrato (Cathelineau et al, 1979). Hayasaka et al, em 1982 observaram que pacientes com acidemia propiônica e ou metilmalônica, em acidose, apresentavam uma redução de até 70% da atividade da citocromo oxidase, sem, contudo, descobrirem a causa direta desse achado.

Estudos demonstraram também, o envolvimento do metilcitrato nos mecanismos de neurotoxicidade da acidemia propiônica já que ele é responsável por bloquear algumas enzimas do ciclo do ácido cítrico tais como: aconitase (Ledley et al, 1988), citrato sintase (Fenton et al., 2001) e isocitrato desidrogenase (Mahoney et al, 1975), induzindo um fluxo reduzido através do ciclo de Krebs e conseqüente diminuição na utilização de acetil CoA pelos tecidos (figura 2). Todas essas observações encontradas na literatura nos sugerem um prejuízo no metabolismo energético de pacientes com acidemia propiônica.

Podemos ressaltar ainda, o envolvimento desse ácido no estresse oxidativo, visto que ele estimula a peroxidação lipídica, reduz o potencial oxidante tecidual em

homogeneizados de córtex cerebral em ratos de 21 dias (Fontella et al, 2000). Além disso, diminui significativamente, o conteúdo total de gangliosídeos, em ratos injetados com ácido propiônico intracerebelar (Trindade et al, 2002) e reduz a quantidade de tocoferol em células vermelhas do sangue (Moyano et al, 1997). Da mesma forma, ocorre o estímulo na produção de superóxido na presença de ativadores do influxo de  $\text{Ca}^{2-}$  em neutrófilos humanos (Nakao et al. 1998).



**Figura 2:** Inibição do complexo II mitocondrial e do ciclo do ácido cítrico pelo malonato, metilmalonato e metilcitrato. Uma hipótese da neuropatogenese da acidemia metilmalônica e propiônica. Metilcitrato inibe enzimas do ciclo de Krebs: citrato sintase (1), aconitase (2) e isocitrato desidrogenase (3) induzindo um fluxo reduzido através do ciclo de Krebs. O metilcitrato inibe o transporte de citrato mitocondrial (11), afetando a síntese de ácidos graxos no citosol. Metilmalonato inibe a enzima SDH e afeta a formação de oxalacetato por inibição da piruvato carboxilase (10) ocasionando um fluxo reduzido pelo CK e cetonemia, bem como, leva a inibição da lançadeira de malato transmitocôndrial (9), facilitando o desenvolvimento de hipoglicemia (adaptado de Okun, et al, 2002).



Esses dados sugerem que a formação de espécies reativas exerce um papel importante na neurotoxicidade induzida por ácido propiônico, e por outros agentes neurotóxicos, como o MMA. Contudo, apesar das evidências de que há aumento das ER, ainda são necessários estudos complementares para definir o papel dessas, na neurotoxicidade induzida por ácido propiônico.

## **1.2 - Excitotoxicidade induzida por prejuízo energético**

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC (figura 3) e está envolvido em diversas funções cerebrais como cognição, aprendizado e memória e na formação de redes neurais durante o desenvolvimento (Collingridge & Lester, 1989; Osawa et al,1998). Sua síntese depende da ação de precursores como: oxaloacetato ou 2-oxaglutarato (produzidos pela oxidação da glicose no ciclo de Krebs), glutamina pela ação de uma glutaminase presente nos terminais pré-sinápticos, outros aminoácidos através de processos de transaminação e a partir da ornitina e prolina, consideradas vias menos importantes (Fonnun et al, 1994).

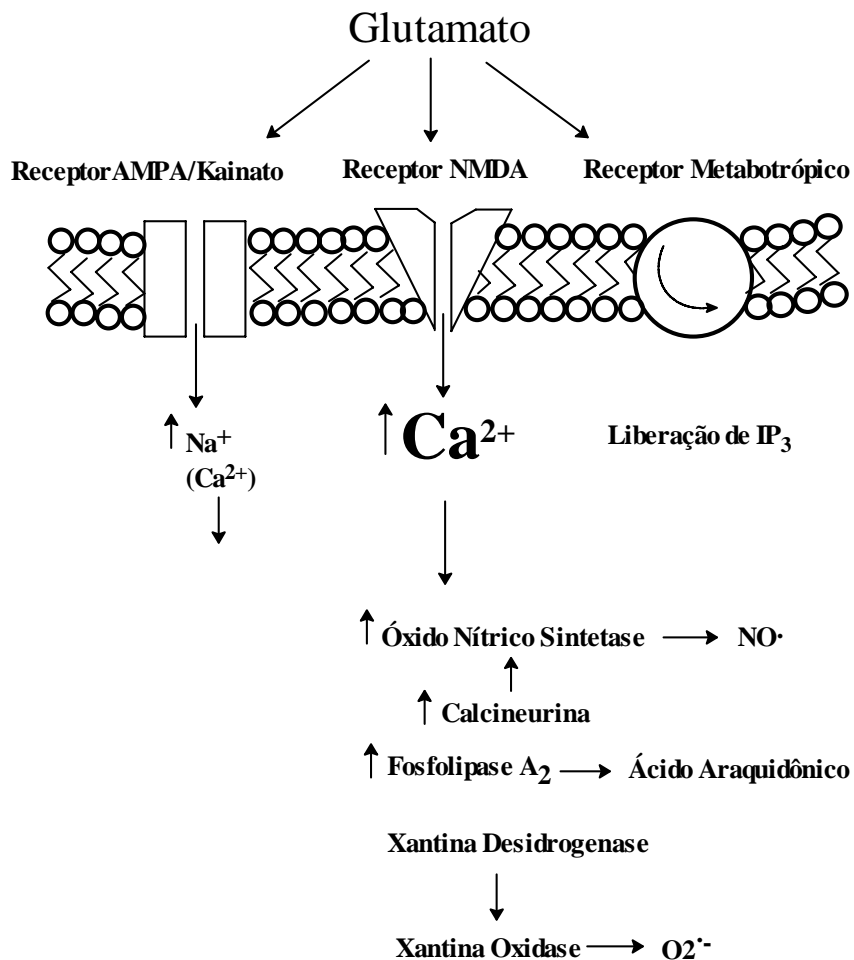
Em células normais, os níveis de ATP disponíveis são suficientes para manter os gradientes iônicos e a polarização da membrana plasmática (figura 4).

Olney e colaboradores, em 1978 observaram que altas doses de glutamato e seus agonistas provocam dano, e até mesmo, morte celular, introduzindo o termo excitotoxicidade para a morte celular provocada pela estimulação excessiva de receptores glutamatérgicos.

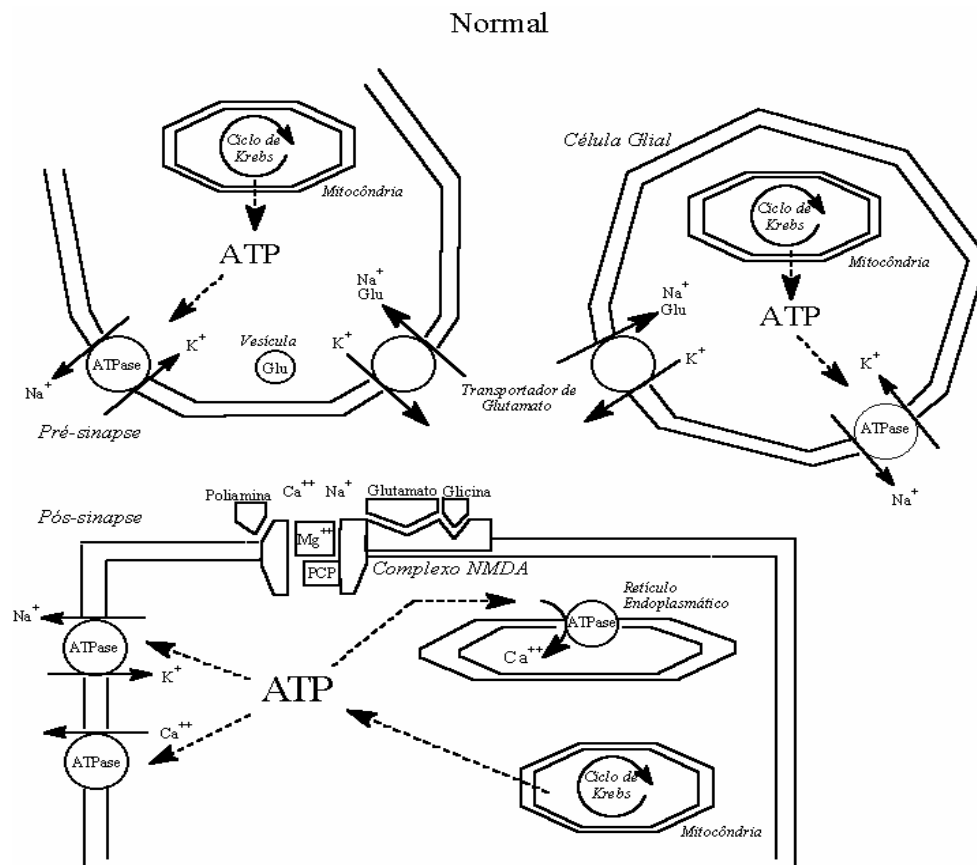
Vários inibidores metabólicos são capazes de induzir lesão celular através de mecanismos que envolvem o glutamato, particularmente o receptor subtipo NMDA, entre eles podemos destacar a rotenona, cianeto, malonato e MMA (Greene et al, 1993; Dutra et al, 1993; Mello et al,1996; Fleck, et al, 2004).

A depleção de ATP, também tem sido associada à excitotoxicidade (Greene et al., 1993; Wüllner et al., 1994; Greene & Greenamyre, 1995; Hassel & Sonnewald,1995; Zeevalk et al., 1995) e ao dano celular oxidativo pela formação de espécies reativas, e parece estar intimamente relacionada à patogênese de diferentes doenças neurodegenerativas (Coyle & Putterfarcken, 1993; Jenner, 1994), incluindo esclerose

lateral amiotrófica (Rothstein et al., 1993), mal de Parkinson (Jenner, 1994;), doença de Alzheimer (Jenner, 1994; Harris et al., 1995) e coréia de Huntington (Jenner, 1994; Ludolph et al., 1992).



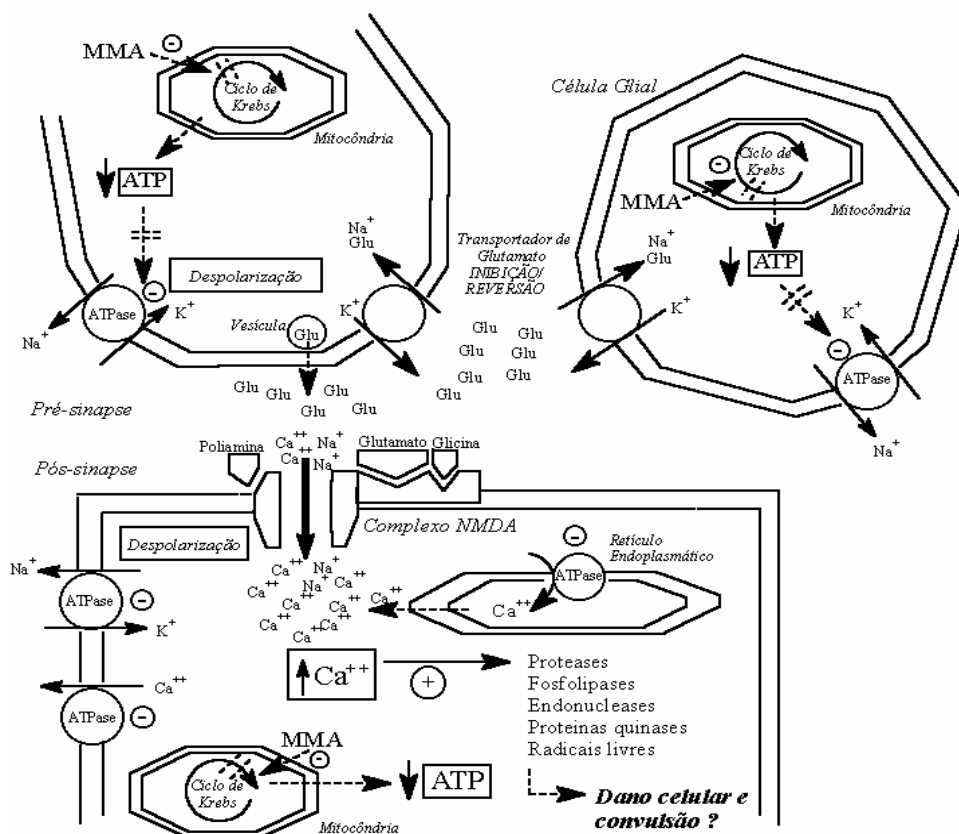
**Figura 3:** O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, e está ativado em ambos receptores ionotrópicos e metabotrópicos. O receptor NMDA possui uma grande permeabilidade para cálcio, sódio e potássio. O influxo de cálcio através desse receptor está associado a ativação de um grande número de proteínas e segundos mensageiros desencadeando uma cascata de eventos que levarão à formação excessiva de espécies ativas de oxigênio e morte celular.



**Figura 4:** Célula em condições normais. O ATP disponível celular é suficiente para manter funcionando as ATPases que mantêm os gradientes iônicos e a polarização da membrana. O gradiente de Na<sup>+</sup> estabelecido pela Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase possibilita o funcionamento do transportador de glutamato neuronal e glial, deixando as concentrações extracelulares desse aminoácido mais baixas. O complexo NMDA está com o canal bloqueado pela presença de Mg<sup>+</sup>, mantido de maneira voltagem-dependente.

Nos casos em que há um decréscimo de ATP (figura 5), decorrente de uma inibição enzimática, como por exemplo, a inibição da SDH, enzima chave do ciclo de Krebs, parece causar despolarização neuronal parcial por falência de várias ATPases que mantêm o gradiente de íons através das membranas celulares, principalmente a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (Nathanson et al, 1995).

## Falência Energética (presença de MMA)



**Figura 5:** Alterações provavelmente induzidas pela presença de inibidores da SDH (MMA). A inibição da SDH neuronal e glial causa depleção de ATP. A depleção de ATP leva à falência das ATPases, causando despolarização neuronal e alterações nos gradientes iônicos. A despolarização provoca a liberação de glutamato armazenado dentro de vesículas sinápticas, e o desaparecimento do gradiente iônico leva à inibição e reversão dos transportadores responsáveis pela recaptação do glutamato em nível neuronal e glial, que resulta no aumento da concentração de glutamato no compartimento extracelular, que se liga ao receptor NMDA. A falência energética atinge também a pós-sínapse causando despolarização e saída do  $\text{Mg}^{2+}$  que impedia o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  através do canal NMDA, além da inibição da  $\text{Ca}^+$ -ATPase do retículo endoplasmático, levando a um aumento na concentração intracelular desse cátion divalente. O aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ativa proteases, endonucleases, proteínas quinase e a formação das espécies ativas de oxigênio, provavelmente envolvidos na propagação do foco de despolarização, na gênese da convulsão, e talvez em dano celular.

A despolarização dos terminais sinápticos glutamatérgicos (Figura 5) provoca a liberação do glutamato armazenado em vesículas sinápticas, processo dependente da concentração de cálcio citosólico (Nichols & Atweell 1990). Além disso, o

desaparecimento do gradiente iônico induz a inibição e reversão dos transportadores, responsáveis pela recaptação de glutamato a nível neuronal e glial (Madl & Burgesser, 1993), o que acarreta um aumento nos níveis de glutamato na fenda sináptica e ativação excessiva dos receptores glutamatérgicos, podendo levar à injúria ou morte neuronal. (Olney et al., 1970).

Já está bem estabelecido que os transportadores do glutamato localizados em células gliais são, de fato, os responsáveis pela manutenção dos baixos níveis extracelulares de glutamato, garantindo desta maneira, a homeostase celular (Tanaka, 2000) em pessoas normais.

A falência energética atinge também a pós-sinapse, causando despolarização e saída de um  $Mg^{+2}$ , responsável por bloquear o canal do receptor glutamatérgico subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) de maneira voltagem dependente, possibilitando a entrada de íons, particularmente  $Na^+$  e  $Ca^{++}$  para o meio intracelular (MacDonald & Schepp, 1993) (figura 5).

O aumento no  $Ca^{++}$  intracelular leva à ativação de enzimas dependentes destes íons, envolvidas no fenômeno de neurotoxicidade, como a calpaína (Brorson al, 1995), proteína quinase C (Rothman, 1992), calcineurina (Armstrong, 1989), fosfolipase C (Umeruma et al, 1992) e a óxido nítrico sintase, envolvida na formação de espécies reativas, provavelmente envolvidos na propagação do foco de despolarização, na gênese da convulsão e talvez em dano celular.

### 1.3 - Espécies Reativas

Um radical livre é um átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron não-pareado ocupando uma órbita externa e são capazes de existir sob forma independente (Southorn & Powis, 1998; Halliwell & Guttridge, 1999). Existem, entretanto, compostos igualmente reativos quanto os radicais livres que não possuem elétron não-pareado na última camada e, portanto não podem ser classificados como radicais livres (Drogë, 2002). Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN).

As espécies reativas geralmente têm uma curta duração de vida e sua recombinação química é quase imediata. Estudos mostram que elas têm uma forte tendência para estabilizar sua órbita externa, captam um elétron de outro átomo ou molécula que se torna uma molécula radicalar (Rice-Evans & Burdon, 1993).

Espécies reativas derivadas do oxigênio têm sido consideradas as de maior interesse biológico, na medida que são gerados constantemente *in vivo* nas mitocôndrias e que a sua produção excessiva pode causar danos celulares irreversíveis (Bergendi et al, 1999) em lipídeos, proteína e DNA (Tabela 1)

As ERs são formadas principalmente durante a respiração celular por um vazamento (transferências elétricas monovalentes) de elétrons na cadeia de transporte de elétrons sob condições fisiológicas ou patológicas (Punchard & Kelly, 1996; Wajner et al, 2004). Elas são produzidas em todas as células vivas como bioprodutos do metabolismo normal e mecanismos endógenos existem para reduzir sua formação ou aumentar sua inativação (Halliwell, 1994).

Há evidências de que a auto-oxidação reduzida dos componentes da cadeia respiratória com o oxigênio causa a produção de radical livre superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o qual é convertido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima superóxido dismutase (SOD).  $H_2O_2$  na presença de íons metálicos de transição como ferro, cobre ou manganês, gera radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), a espécie ativa mais prejudicial (Chance et al, 1979). Observamos também a formação de espécies radicalares, tais como: radical peroxil ( $RO_2^{\bullet}$ ), radical alcóxil ( $RO^{\bullet}$ ), hidroxiperoxil ( $HO_2^{\bullet}$ ), e espécies não radicalares como: ozônio ( $O_3$ ), oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), ácido hipocloroso (HOCL) (Berlett & Stadtman, 1997). O superóxido também pode ser liberado sob ativação de macrófagos residentes do SNC (Colton et al, 1996) ou pela reação de compostos auto-oxidáveis como as catecolaminas. O  $O_2^{\bullet-}$  não age diretamente sobre proteínas ou DNA, ele ataca o sítio ativo de algumas enzimas que possuem grupos ferro-enxofre, podendo deslocar o ferro da ferritina (Liochev, 1996).

Outras espécies reativas podem ser formadas tanto no citosol como na mitocôndria, são conhecidas por espécies ativas de nitrogênio e os mais representativos são o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). O óxido nítrico é produzido pela arginina por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), presente no

citosol e na mitocôndria (Riobo et al, 2002).  $\text{NO}^\bullet$  é essencial para vasorregulação, agregação plaquetária e neurotransmissão, mas em excesso inibe a citocromo-c oxidase levando a consequente formação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Forfia et al, 1999). O  $\text{ONOO}^-$ , entretanto é formado a partir de uma reação controlada entre  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Radi et al, 1994) e ele pode difundir-se para o meio intra ou extracelular e então promover a oxidação de lipídeos, proteína e DNA (Beckman & Koppenol, 1996). Além disso, o  $\text{ONOO}^-$  pode causar inibição da cadeia respiratória levando a morte neuronal e produzir íons nitrônio, que são capazes de nitrificar resíduos de tirosina e de gerar através da decomposição de sua forma protonada ( $\text{ONOOH}$ ) (Beckman & Koppenol, 1996).

**Tabela 1:** Principais alvos de ataques dos radicais livres e suas conseqüências biológicas

Ataques dos radicais livres e seus principais alvos		
Alvos	Danos	Conseqüência Biológica
<b>Proteínas</b>	Fragmentação e quebra	Modifica o transporte de íons
	Modificação de grupos tiol	Aumenta o $\text{Ca}^{2+}$ intracelular
	Nitrosilação de grupos fenólicos	
<b>Lipídeos</b>	Redução de lipídeos poliinsaturados	Diminui a fluidez da membrana
	Formação de metabólitos reativos	Altera a permeabilidade da membrana Altera a atividade das proteínas de membrana, enzimas, receptores e transportadores
<b>DNA/RNA</b>	Fragmentação	Ativação de PARS (Poli ADP ribose sintetase)
	Cisão	Erros transducionais
	Danos na base	Inibe a síntese protéica

(Adaptado de Dawson & Dawson, 1996)

Entretanto, a toxicidade exercida pelas espécies reativas não está somente relacionada a danos biológicos ao organismo, mas também podem exercer uma atividade benéfica, como na eliminação de bactérias fagocitadas através dos neutrófilos (Packer et al, 1996).

Algumas estruturas cerebrais são mais suscetíveis aos efeitos deletérios das espécies reativas e de inibidores metabólicos entre elas podemos destacar o estriado que é uma estrutura particularmente rica em receptores glutamatérgicos (Behrens et al, 1995).

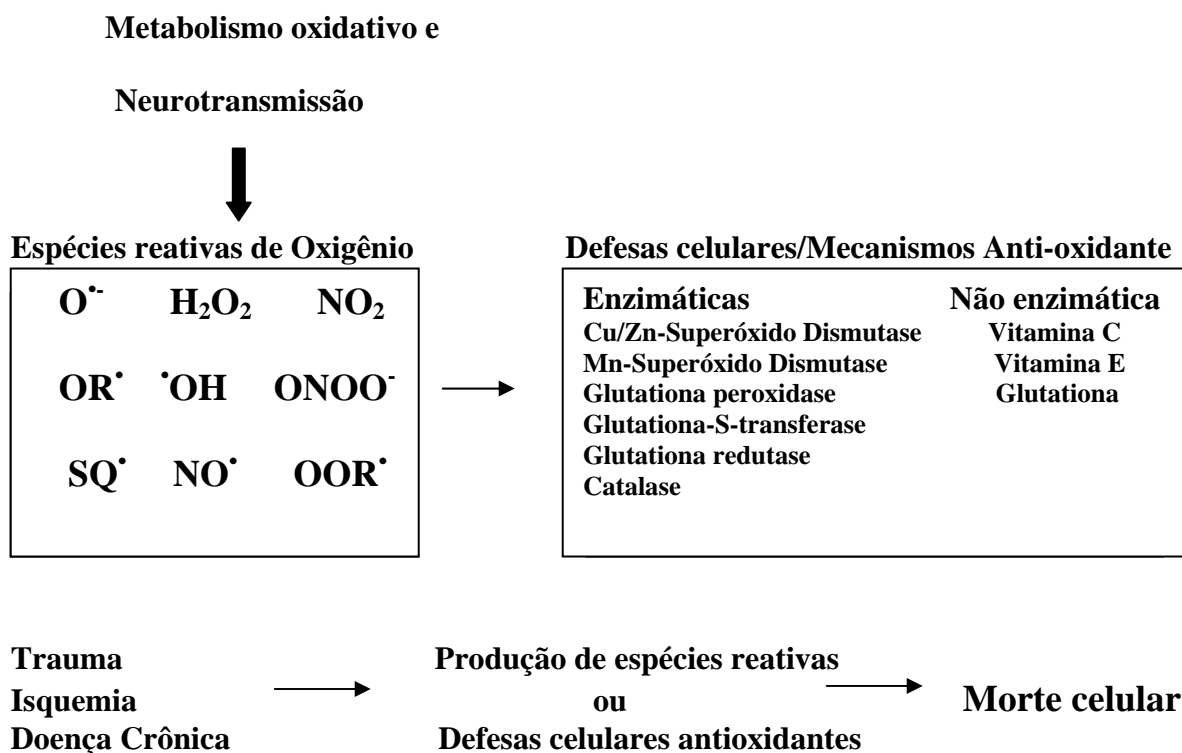
### 1.3.1 - Defesas antioxidantes

Antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas, que reduzem a formação de espécies reativas ou reagem com elas, inativando-as. A célula pode proteger contra ataques oxidativos através de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

O desbalanço entre a produção intracelular de ERs e o mecanismo de defesa antioxidante (Perry et al, 2002) pode ter conseqüências patológicas, prejuízo na função celular, apoptose e necrose (Bergendi et al, 1999), caracterizando o chamado estresse oxidativo. Portanto, quando a produção de ER é muito alta, a resposta antioxidativa pode ser insuficiente para manter a homeostase celular. (figura 6)

De fato, há estudos que indicam uma diminuição nas defesas antioxidantes no sangue de pacientes epiléticos comparados ao controle, sugerindo o envolvimento das espécies reativas na epilepsia (Ogunmekan et al, 1979; Dutra et al, 1993; Sudha et al, 2001; Marisco et al, 2003; Patel, 2004). Esta hipótese é confirmada por vários trabalhos que demonstram que as convulsões podem ser prevenidas ou atenuadas pelo tratamento com antioxidantes (; Willmore et al, 1981; Kabuto et al, 1998; Fighera et al, 1999; 2003).





**Figura 6:** As espécies reativas de oxigênio são geradas constantemente no neurônio durante o metabolismo e a atividade neuronal. O excesso de espécies reativas, ocorre perante um desbalanço entre sua produção e a atividade antioxidante celular. Se a formação de espécies reativas exceder a capacidade de defesa intracelular, pode ocorrer lesão celular (adaptado de Dawson, 1996).

### 1.3.2 - Suscetibilidade cerebral ao estresse oxidativo

Todos os tecidos dos organismos aeróbicos podem sofrer dano oxidativo. Entretanto, o tecido cerebral é mais suscetível ao efeito deletério das ERs (figura 7). Uma das razões é o baixo nível de enzimas antioxidantes nesse tecido (Brannan et al, 1981) e a sua localização em células gliais, o que faz com que os neurônios fiquem menos protegidos contra os oxidantes presentes no cérebro.

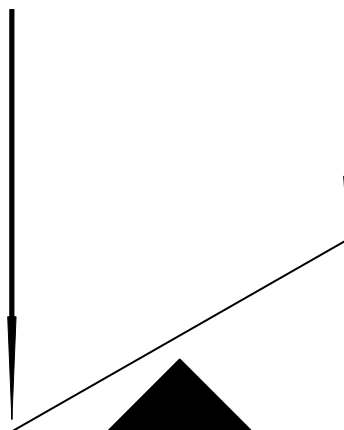
Além disso, o alto consumo de  $O_2$  pelo cérebro (utiliza 20% do consumo basal de oxigênio), pode levar ao aumento na produção de  $O_2^{\bullet -}$  (Halliwell & Gutteridge, 1999).

## Capacidade Antioxidante

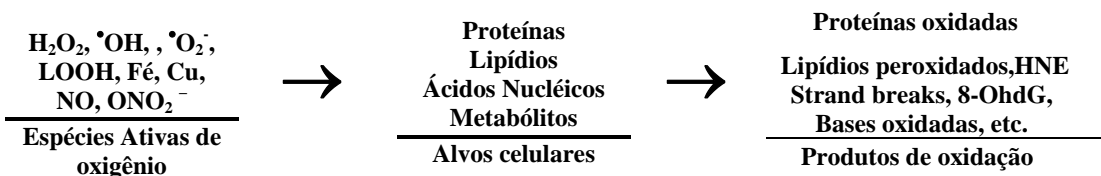
### Fatores que predisõem

#### ao Dano Oxidativo

- Alto consumo de oxigênio e glicose causando a produção de EAO.
- Presença de ácidos graxos peroxidáveis.
- Áreas enriquecidas em ferro e ascorbato.



- Catalase.
- SOD, GSH Px
- GSH, ascorbato
- $\alpha$ -tocoferol



**Figura 7:** Ilustração dos danos oxidativos que afetam o cérebro. As EAO são produzidas e interagem com os alvos celulares gerando produtos de oxidação. (adaptado de Floyd & Hensley, 2002).

Estudos demonstram que o alto fluxo de  $Ca^{2+}$  através das membranas neuronais, proveniente da ativação do receptor subtipo NMDA ativa a NOS neuronal, o que resulta em uma maior produção de  $NO^*$  e de outras ERs (Castilho et al, 1996). O alto conteúdo de Ferro e ascorbato em regiões específicas do cérebro (*substância nigra, caudato, putamen, globus pallidus*) e altas concentrações de lipídeos poliinsaturados, também contribuem para a suscetibilidade seletiva, facilitando a peroxidação lipídica, que altera a permeabilidade da membrana celular. Finalmente, as altas concentrações de neurotransmissores como a dopamina, seu precursor levodopa e noradrenalina, as quais são moléculas autoxidáveis, reagem com o oxigênio e formam radical superóxido (Xia et al, 2001).

Existem muitos métodos de estudo das espécies reativas, no entanto, todos eles possuem algum grau de limitação devido à alta reatividade das ERs ou devido à migração destes radicais para pontos distantes. As espécies reativas podem ser estudadas por métodos físico-químicos (ressonância magnética) *in vitro*, quimioluminescência *in vivo* e *in vitro*, carbonilação protéica *ex vivo*, ou ainda por trapping, tanto em estudos *in vivo* como *ex vivo* por ressonância magnética (Punchard & Kelly, 1996).

### 1.3.3 - Oxidação protéica

As enzimas e proteínas estruturais podem ser atacadas por ERs geradas. Como uma consequência, a modificação oxidativa, pode ocorrer em uma variedade de processos fisiológicos ou patológicos. Embora a distinção seja algumas vezes arbitrária essas modificações podem ser primárias ou secundárias. Modificações que ocorrem primariamente podem ser oxidações catalisadas por um metal, mediadas por radiação e oxidação por ozônio ou óxidos de nitrogênio. Oxidações secundárias ocorrem quando proteínas são modificadas por moléculas geradas pela oxidação de outras moléculas (Shacter, E. et al, 1994).

As ER podem atacar os resíduos de aminoácidos (especialmente prolina, arginina, lisina e treonina) para produzir grupos carbonil. A análise bioquímica mais usada para determinação da oxidação protéica, é baseado na reação desses grupos com 2, 4-dinitrofenilhidrazina (Praticò & Delanty, 2000) para formar 2, 4-dinitrofenilhidrazona, o qual pode, então ser detectado e quantificado espectrofotometricamente ou imunoquimicamente.

A modificação oxidativa das proteínas por espécies reativas implica na etiologia ou progressão de várias doenças (Levine, 2002). A oxidação de proteínas, um dos marcadores do estresse oxidativo do cérebro, está aumentada na neurodegeneração relacionada com a idade, ou em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, doença de Huntington, mal de Parkinson e demência frontotemporal (Butterfield & Kanski, 2001).

Devido a vários estudos demonstrarem uma inibição metabólica e um aumento nas espécies reativas induzidos por ácido propiônico e na tentativa de auxiliar na descoberta do mecanismo pelo qual esse ácido orgânico exerce seus efeitos neurotóxicos, os objetivos desse trabalho foram os citados a seguir.

## 2.1 - Objetivo geral

Verificar as alterações comportamentais, eletrencefalográficas e a carbonilação protéica, induzidas pela injeção intraestriatal do ácido propiônico, em ratos jovens.

## 2.2 - Objetivos específicos

- Verificar se a injeção intraestriatal de ácido propiônico será capaz de induzir convulsões em ratos adultos.
- Verificar se a injeção intraestriatal de ácido propiônico induz carbonilação protéica no estriado de ratos, 15 minutos após sua administração.
- Verificar se a administração intraestriatal de MK-801, um antagonista do receptor NMDA, será capaz de reverter possíveis convulsões induzidas por ácido propiônico.
- Verificar se a administração de MK-801, um antagonista do receptor NMDA, será capaz de reverter possíveis aumentos na carbonilação protéica induzidas por ácido propiônico.
- Verificar se a injeção intraestriatal de ácido propiônico altera o registro eletrencefalográfico (EEG) do estriado e córtex de ratos.

### 3.1 – Reagentes

- Ácido clorídrico - Vetec
- Ácido fosfórico - Vetec
- Albumina sérica bovina – Sigma (St. Louis, MO)
- Cloranfenicol – Schering – Plough
- Cloreto de sódio (NaCl) – Ecibra
- Coomassie brilliant blue – Sigma (St. Louis, MO)
- Dinitrofenilhidrazina (DNPH) – Merck
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) – Sigma (St. Louis, MO)
- Etanol – Vetec
- Fosfato de potássio monobásico – Synth
- Fosfato de sódio monobásico – Synth
- Heptano – Belga
- Hidrato de Cloral - Sigma (St. Louis, MO)
- Hidróxido de sódio (NaOH) – Merck
- Metilmalonato (MMA) – Sigma (St. Louis, MO)
- MK-801- Merck
- Propilenoglicol - Sigma (St. Louis, MO)
- Propionato – Merck
- Sulfato de Magnésio - Sigma (St. Louis, MO)
- Tiopental sódico – Abbott
- Trizma® Base - Sigma (St. Louis, MO)

**OBS:** Todas as soluções foram preparadas com o uso de água ultrapura tipo I.

### 3.2 – Equipamentos

- Agitador de tubos – marca Phoenix AP56
- Agulha – marca PrecisionGlide
- Balança analítica – marca Gibertini
- Balança semianalítica – marca Acculab V400

- Campo aberto
- Centrífuga BE 5100 – marca Bio Eng
- Contador de produção
- Cronômetros – marca Casio
- Espectrofotômetro – marca Hitachi U-2001
- Estereotáxico – marca Medicor Hungria
- Fita indicadora de pH – marca Merck
- Freezer a – 20°C – marca Cônsul
- Geladeira a - 4°C – marca Cônsul
- Guilhotina
- Material cirúrgico (tesoura, bisturi, espátula, pinças)
- Medidor de pH digital – marca Quimis
- Pipetas automáticas – marca Labsystems de volume variável
- Purificador de água – marca EASYpure RF – Compact ultrapure water system
- Seringa de 10 µL – marca Hamilton

### **3.3- Animais**

Foram utilizados 70 ratos Wistar, machos, com aproximadamente 3 meses de idade, pesando 270 – 300 g fornecidos pelo Biotério Central da UFSM, mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro entre 7 e 19h), em temperatura de 24 ± 2°C, com alimento e água *ad libitum*.

### **3.4 – Procedimentos cirúrgicos**

#### **3.4.1- Implantação da cânula de injeção**

Os ratos eram anestesiados com uma solução composta de hidrato de cloral (4,25 g), sulfato de magnésio (2,16 g), propilenoglicol (42,8 mL), álcool (11,5 mL) pentobarbital (0,96g) e água destilada (100 mL q.s.p.). O anestésico, assim preparado,

era administrado intraperitonealmente no volume de 4 mL/kg e logo após uma cânula era inserida unilateralmente no estriado, nas coordenadas relativas ao bregma (AP 0 mm, ML 3.2 mm, V 3.0 mm da dura) utilizando um aparelho estereotáxico. Antes da anestesia os animais foram injetados com cloranfenicol ( $200 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , i.p.). No quarto dia após a implantação da cânula, eram realizados os tratamentos seguindo dois modelos experimentais. No primeiro, foi feita uma curva dose-efeito de ácido propiônico (PA) nas doses de 0,6; 2 e 6  $\mu\text{mol}$ , obtidas a partir de testes piloto. No modelo seguinte foi administrado MK-801 na dose de 3 nmol, 30 minutos antes da administração de ácido propiônico (6  $\mu\text{mol}$ ). O pH da solução de ácido propiônico era corrigido com NaOH para 7,4 e as injeções eram feitas com a duração de aproximadamente 2 minutos. Imediatamente após a injeção de PA (2  $\mu\text{l}$ ), PA (1,5  $\mu\text{l}$ ) + Mk-801(0,5 $\mu\text{l}$ ) ou NaCl (2  $\mu\text{l}$  ou 0,5 $\mu\text{l}$ ), eram analisados os parâmetros comportamentais.

#### 3.4.2 – Implantação dos eletrodos para Eletroencefalografia

Os animais eram anestesiados com uma solução composta de: hidrato de cloral (4,25 g), sulfato de magnésio (2,16 g), propilenoglicol (42,8 mL) álcool (11,5 mL) pentobarbital (0,96g) e água destilada (100 mL q.s.p.). O anestésico, assim preparado, era administrado intraperitonealmente no volume de 4 mL/kg. Os animais anestesiados eram submetidos à tricotomia do escalpo e fixado por meio de barras intra-auriculares e dos dentes incisivos superiores a um aparelho estereotáxico. Após a incisão da pele na região dorsal do crânio e a remoção do perióstio, era efetuada a trepanação da calota óssea, por meio de uma broca dentária, para introdução dos eletrodos de registro.

O eletrodo de profundidade era bipolar, e constituído de dois filamentos de níquel-cromo de 0,125 mm de diâmetro e revestidos por verniz em toda extensão, exceto nas extremidades. O ponto para implantação do eletrodo era determinado e marcado sobre a tábua óssea seguindo as instruções do Atlas estereotáxico de Paxinos & Watson, (1992). Esse eletrodo foi implantado na região do estriado nas coordenadas relativas ao bregma (AP 0 mm, ML 3.2 mm, V 3.0 mm da dura).



Além disso, três pequenos parafusos de aço inoxidável eram implantados no crânio. Dois deles, simetricamente dispostos em relação à sutura média, na região occipital, para o registro eletrencefalográfico cortical e um ao nível do seio frontal, que serviria como eletrodo indiferente.

Tanto o eletrodo de profundidade, como os de superfície foram conectados a um microconector de 4 saídas, o qual era fixado ao crânio por meio de cimento acrílico. Este cimento depois de endurecido, realizava a fixação do microconector à cabeça do animal, bem como isolava eletricamente o sistema.

### **3.5 – Estudo Eletrencefalográfico**

Decorrida uma semana após o procedimento cirúrgico, foram feitos os registros eletrencefalográficos. Para a avaliação da atividade eletrencefalográfica os animais eram levados à sala de registro, onde eram colocados em uma caixa de acrílico transparente de 50x25x25 cm, que permitia a observação das manifestações comportamentais dos animais. A gaiola de acrílico por sua vez, era mantida dentro de um sistema totalmente aterrado (gaiola de Faraday).

O microconector do animal era então conectado a um plug ligado, por meio de um cabo flexível e blindado, a um “swivel” (dispositivo rotatório) permitindo ao animal livre movimentação dentro da caixa de acrílico. A partir do “swivel” os cabos eram ligados ao terminal de um eletrencefalógrafo da marca Berger, modelo TP 119.

### **3.6 – Parâmetros comportamentais**

Os parâmetros comportamentais dos animais foram avaliados por meio de observação direta dos mesmos, em um aparelho de campo aberto, uma arena circular de metal com 97 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura, cujo assoalho era dividido em 11 áreas. Cada animal foi colocado, individualmente no centro da arena de campo aberto e observados por um período de 15 minutos. O campo aberto foi limpo com uma solução de água-álcool a 30%.

Os parâmetros comportamentais analisados foram: Número de cruzamentos, resposta de levantar, movimentos mastigatórios “chewing”, latência, número e tempo das convulsões, “wet dog shake” e bocejo. Cada resposta de levantar correspondeu à postura do animal permanecer apoiado somente nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão da arena e tendo a cabeça dirigida para cima tocando, ou não, com as patas anteriores, as paredes do campo aberto. O parâmetro comportamental “convulsão” foi considerado como a latência, o número e o período de tempo, em segundos, durante o qual o animal apresentava movimentos clônicos com as patas dianteiras e ou traseiras acompanhada de assimetria corporal. O registro das durações e frequência dos parâmetros foi feito por intermédio de cronômetros digitais e contadores de produção, em três intervalos de 5 minutos.

### **3.7 – Avaliação bioquímica**

Após a observação comportamental os ratos foram decapitados e para a amostra foi retirado, com auxílio de um tubo de punção, o estriado direito (hemisfério injetado), em torno da lesão provocada pela inserção da cânula e o estriado esquerdo também foi retirado (hemisfério controle).

#### **3.7.1- Determinação dos grupos carbonil das proteínas.**

O tecido estriatal foi homogeneizado em 10% (g/v) de tampão Tris-HCl 10mM (pH = 4) , contendo 10% de SDS utilizando um homogeneizador e seu conteúdo de carbonil protéico foi determinado pelo método descrito por Yan et al.(1995). Após, o homogeneizado foi diluído visando uma concentração final de 750-800 µg/mL de proteína em cada amostra, e alíquotas de 1 mL do homogeneizado foram misturadas com 0,2 mL de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) 10 mL em HCl 2M ou 0,2 mL de HCl 2M. Após a incubação em temperatura ambiente por 1 hora em ambiente escuro, foi adicionado 0,5 mL de tampão de desnaturação (tampão fosfato de sódio 150mM, pH 6,8; contendo 3% de SDS), 2,0 mL de heptano e 2,0 mL de etanol foram adicionados seqüencialmente, e misturados por agitação durante 40s e centrifugados por 15

minutos. A seguir a proteína isolada da interface foi lavada 2 vezes com 1 mL de acetato de etila/etanol 1:1 (v/v), colocada na estufa por 1 minuto a 35°C e suspensa em 1mL de tampão de desnaturação. Cada amostra contendo DNPH foi lida em 370 nm no espectrofotômetro Hitachi U-2001 contra a correspondente amostra contendo HCl (branco), e a absorbância resultante foi para calcular o conteúdo de grupos carbonil das proteínas usando um coeficiente molar de extinção de 22.000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Yan et al, 1995).

### 3.7.2- Determinação de proteína

A concentração de proteína do homogeneizado dos tecidos foi determinada pelo método de Bradford (1977), na qual se utiliza albumina bovina com padrão.

## 3.8- Análise estatística

Os dados bioquímicos e comportamentais foram analisados por ANOVA de uma ,duas ou três vias, dependendo do desenho experimental. Após a ANOVA, foi feita a análise “post hoc” apropriada para verificar a diferença entre os grupos experimentais. Os valores de F são representados no texto somente quando o  $p < 0,05$ .

## 4.1 – Avaliação comportamental

4.1.1- Efeito da injeção de ácido propiônico e do pré-tratamento com MK-801 sobre o comportamento dos ratos na tarefa do campo aberto.

A análise estatística (ANOVA de uma via) revelou que a administração intraestriatal de ácido propiônico na dose de 6  $\mu\text{mol}/ 2 \mu\text{l}$  não alterou a atividade locomotora e exploratória dos animais, observadas pelo número de cruzamentos e resposta de levantar. Entretanto, aumentou o tempo dos movimentos mastigatórios (chewing), um típico parâmetro comportamental pré-convulsivo:  $[F(1,25)= 5,59; p < 0,05]$ .

Além disso, o tratamento com MK-801 (3nmol/0,5  $\mu\text{l}$ ) 30 minutos antes da injeção de PA (6 $\mu\text{mol}/ 1,5 \mu\text{l}$ ), foi capaz de aumentar a latência das primeiras convulsões, ou seja o MK-801 retardou o início dos episódios convulsivos:  $[F(1,25)= 707,71; p < 0,05]$ .

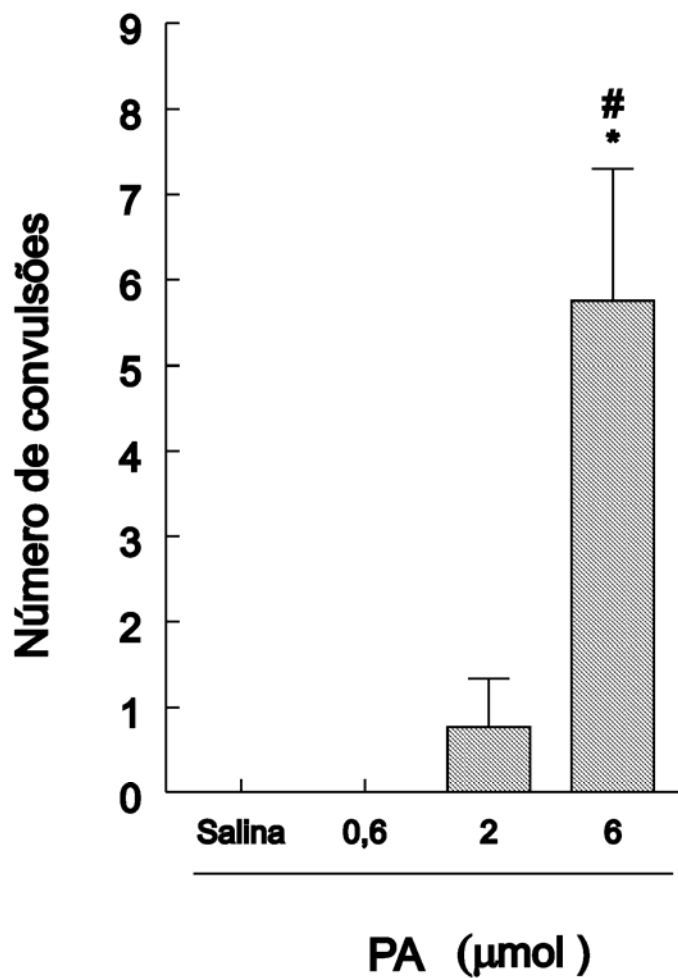
**Tabela 2:** Efeito da administração intraestriatal de PA (6  $\mu\text{mol}$ ), NaCl (9  $\mu\text{mol}$ ) ou MK-801 (3nmol) + PA (6  $\mu\text{mol}$ ) sobre o comportamento dos ratos na tarefa do campo aberto.

Substância	Levantar	Cruzamento	Chewing	Dog Shake	Bocejo	Latência das Convulsões (s)
SAL	15,71 $\pm$ 1,98	42,71 $\pm$ 5,98	0	12,42 $\pm$ 3,52	0,71 $\pm$ 0,42	900 $\pm$ 0,0
PA	22,12 $\pm$ 3,30	40,62 $\pm$ 8,79	33,0 $\pm$ 13,12 *	19,5 $\pm$ 3,4	0,5 $\pm$ 0,26	251,5 $\pm$ 27,03*
MK-801	19,85 $\pm$ 4,60	40,71 $\pm$ 4,34	9,42 $\pm$ 6,23	22,14 $\pm$ 4,77	1,57 $\pm$ 0,86	900 $\pm$ 0,0
MK-801+ PA	23,0 $\pm$ 3,94	49,57 $\pm$ 10,28	23,14 $\pm$ 12,33	31,57 $\pm$ 12,20	0,71 $\pm$ 0,56	707,7 $\pm$ 78,5* #

Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão médio, n= 7-8 por grupo. \* indica  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina e # indica  $p < 0,05$  comparado ao grupo PA.

## 4.1.2 - Efeito do ácido propiônico sobre o número de episódios convulsivos

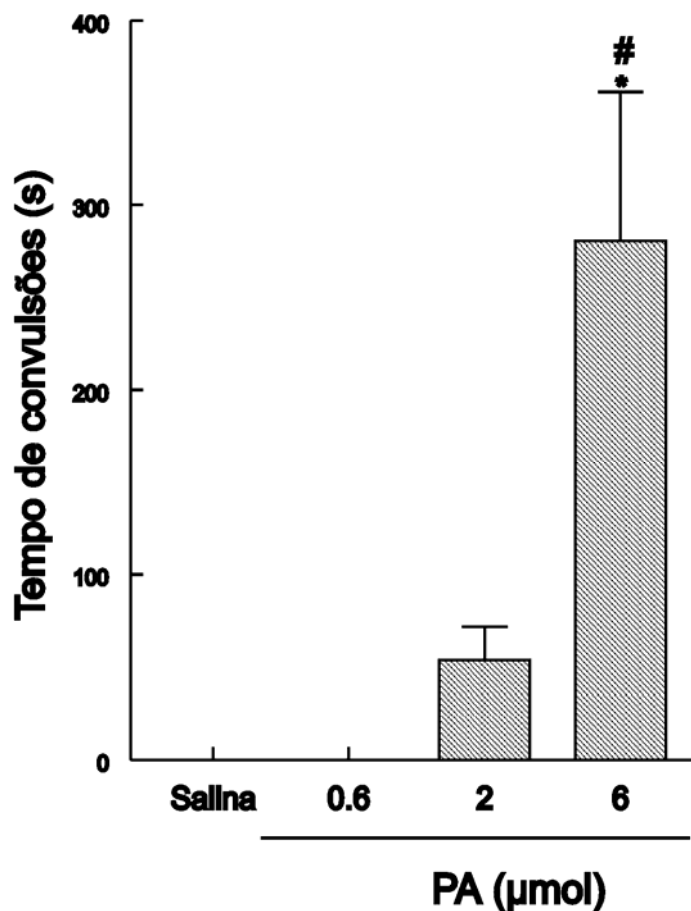
A análise estatística (ANOVA de uma via) revelou que o ácido propiônico na dose de 6  $\mu\text{mol}$  aumentou o número de episódios convulsivos:  $[F(3,36)=8,99;p < 0,05]$ .



**Figura 8:** Efeito da administração intraestriatal de ácido propiônico (0,6; 2; 6  $\mu\text{mol}$ ) sobre o número de episódios convulsivos. Dados apresentados são média + EP para  $n = 9-12$  por grupo. Os resultados da ANOVA de uma via são expressos no texto, \* indica  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina e # indica  $p < 0,05$  comparado as doses de 0,6; 2  $\mu\text{mol}$ .

#### 4.1.3 - Efeito do ácido propiônico sobre o tempo dos episódios convulsivos

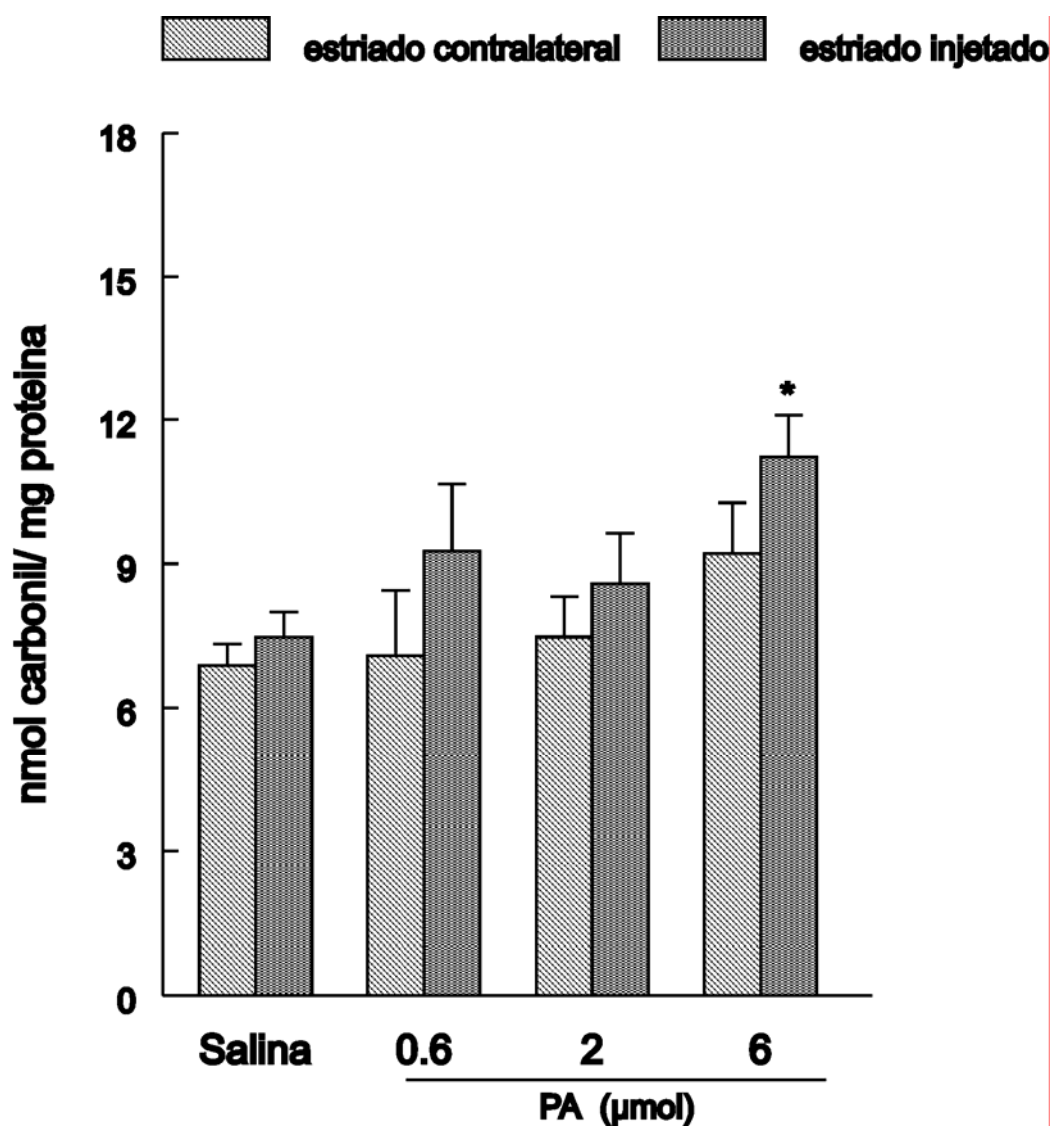
A análise estatística (ANOVA de uma via) revelou que o ácido propiônico na dose de 6  $\mu\text{mol}$  aumentou o tempo dos episódios convulsivos:  $[F(3,36)=8,40;p<0,05]$ .



**Figura 9:** Efeito da administração intraperitoneal de ácido propiônico (0,6; 2; 6  $\mu\text{mol}$ ) sobre o tempo dos episódios convulsivos. Dados apresentados são média + EP para  $n=9-12$  por grupo. Os resultados da ANOVA de uma via são expressos no texto, \* indica  $p<0,05$  comparado ao grupo salina e # indica  $p<0,05$  comparado as doses de 0,6; 2  $\mu\text{mol}$ .

## 4.1.4 - Efeito do ácido propiônico sobre a carbonilação protéica

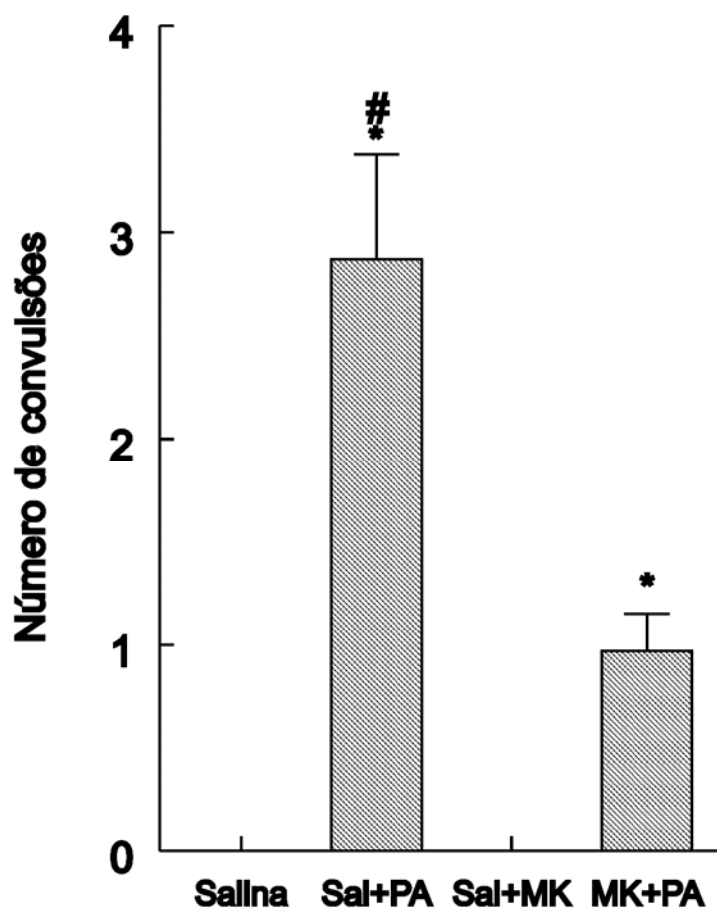
A análise estatística (ANOVA de duas vias) demonstrou que o ácido propiônico na dose de 6  $\mu\text{mol}$  também aumentou a carbonilação de proteínas:  $[F(3,36)=2,33;p<0,05]$ .



**Figura 10:** Efeito da administração intraestriatal de ácido propiônico (0,6; 2; 6  $\mu\text{mol}$ ) sobre a carbonilação de proteínas. Dados apresentados são média +EP para  $n=9-12$  por grupo. Os resultados da ANOVA de duas vias são expressos no texto, \* indica  $p<0,05$  comparado ao grupo salina e # indica  $p<0,05$  comparado as doses de 0,6; 2  $\mu\text{mol}$ .

#### 4.1.5 - Efeito do MK-801 sobre o número de episódios convulsivos induzidos por ácido propiônico

A análise estatística (ANOVA de duas vias), revelou que o tratamento com MK-801 foi capaz de atenuar o número das convulsões induzidas por PA [F(1,25)=12,93;p<0,05].

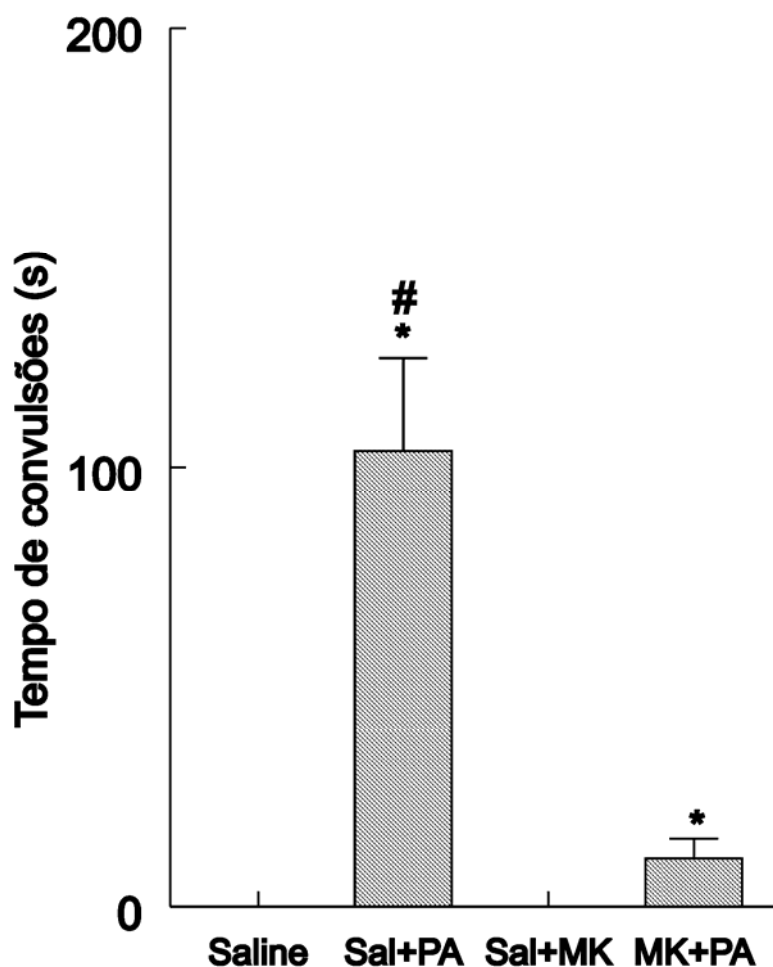


**Figura 11:** Efeito da administração intrestriatal de MK-801(3nmol) sobre o número dos episódios convulsivos induzidos por PA (6  $\mu$ mol). Dados apresentados são média + EP para n= 7-8 por grupo. Os resultados da ANOVA de uma via são expressos no texto, \* indica p<0,05, quando comparado ao grupo salina e # indica p<0,05, comparado ao grupo MK+ PA.



#### 4.1.6 - Efeito do MK-801 sobre o tempo dos episódios convulsivos induzidos por ácido propiônico

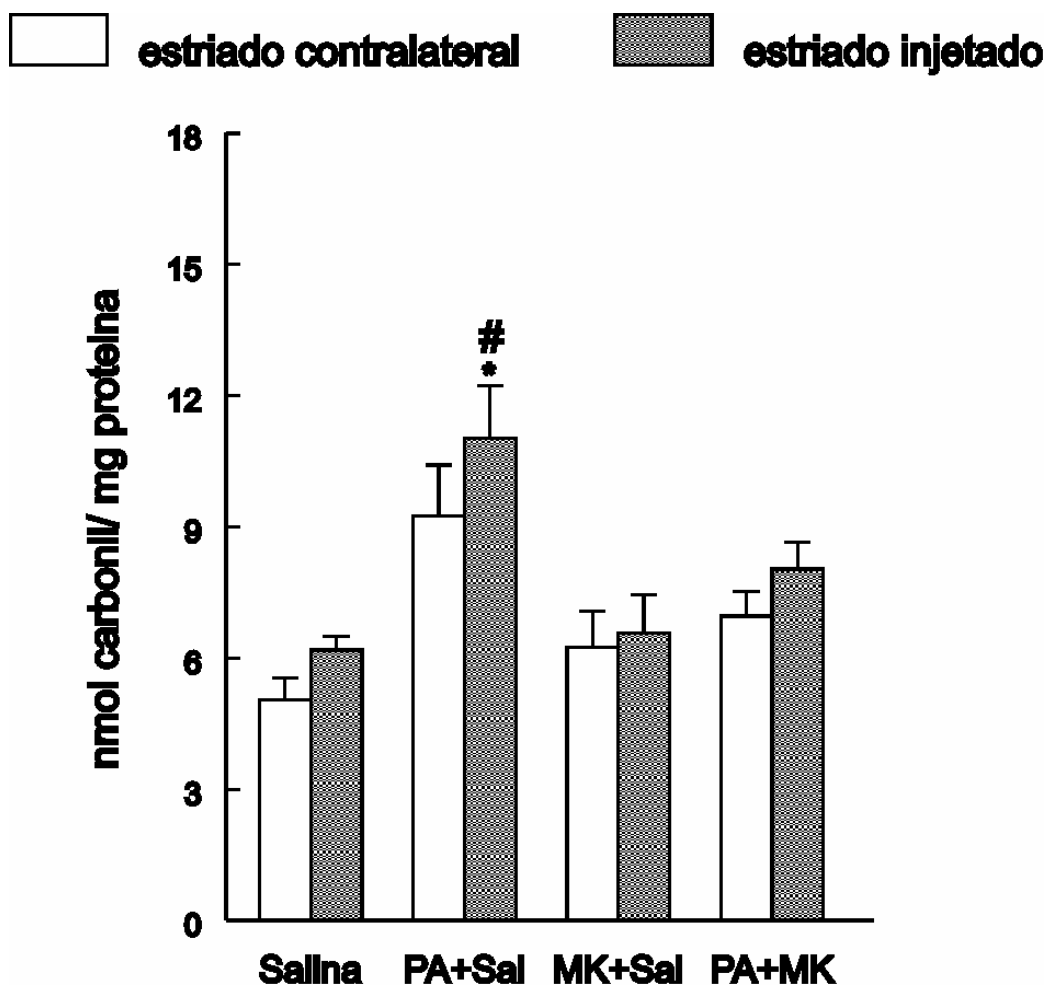
A análise estatística (ANOVA de duas vias), revelou que o tratamento com MK-801 foi capaz de diminuir o tempo das convulsões induzidas por ácido propiônico [ $F(1,25)=15,26;p<0,05$ ].



**Figura 12:** Efeito da administração intraperitoneal de MK-801(3nmol) sobre o tempo dos episódios convulsivos induzidos por PA (6  $\mu$ mol). Dados apresentados são média + EP para n= 7-8 por grupo. Os resultados da ANOVA de duas vias são expressos no texto, \* indica  $p<0,05$ , quando comparado ao grupo salina e # indica  $p<0,05$  comparado ao grupo MK+ PA.

## 4.1.7 - Efeito do MK-801 sobre a carbonilação protéica induzida por ácido propiônico

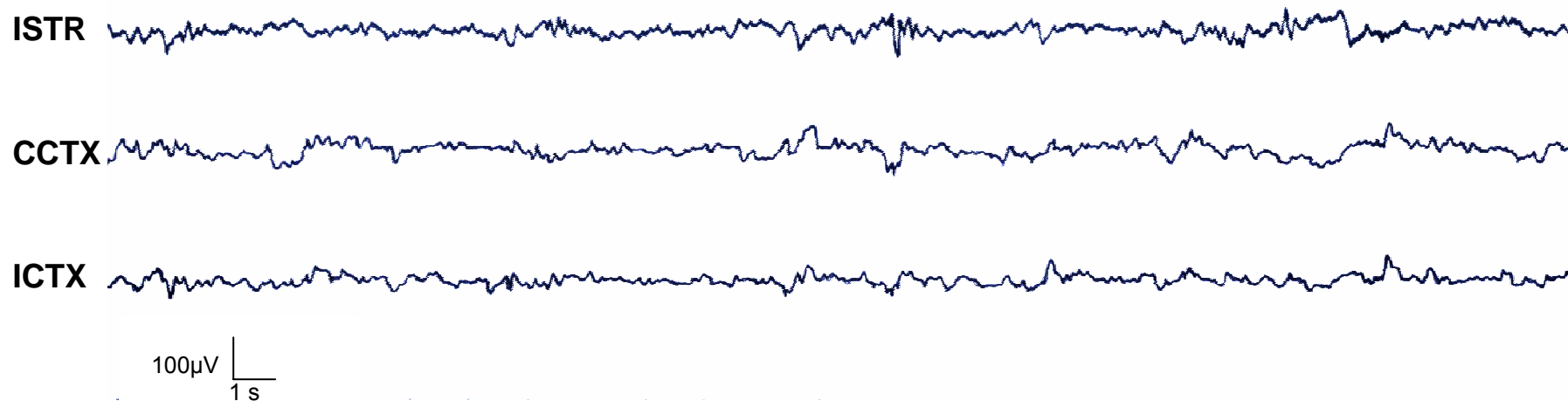
A análise estatística (ANOVA de três vias), revelou que o tratamento com MK-801 foi capaz de prevenir o aumento da carbonilação protéica induzido por PA: [F(1,25)=4,40;p<0,05].



**Figura 13:** Efeito da administração intraestriatal de MK-801(3nmol) sobre o aumento da carbonilação protéica induzido por PA (6  $\mu$ mol). Dados apresentados são média + EP para n= 9-12 por grupo. Os resultados da ANOVA de uma via são expressos no texto, \* indica p<0,05, comparado ao grupo salina e # indica p<0,05 comparado ao grupo MK+ PA.

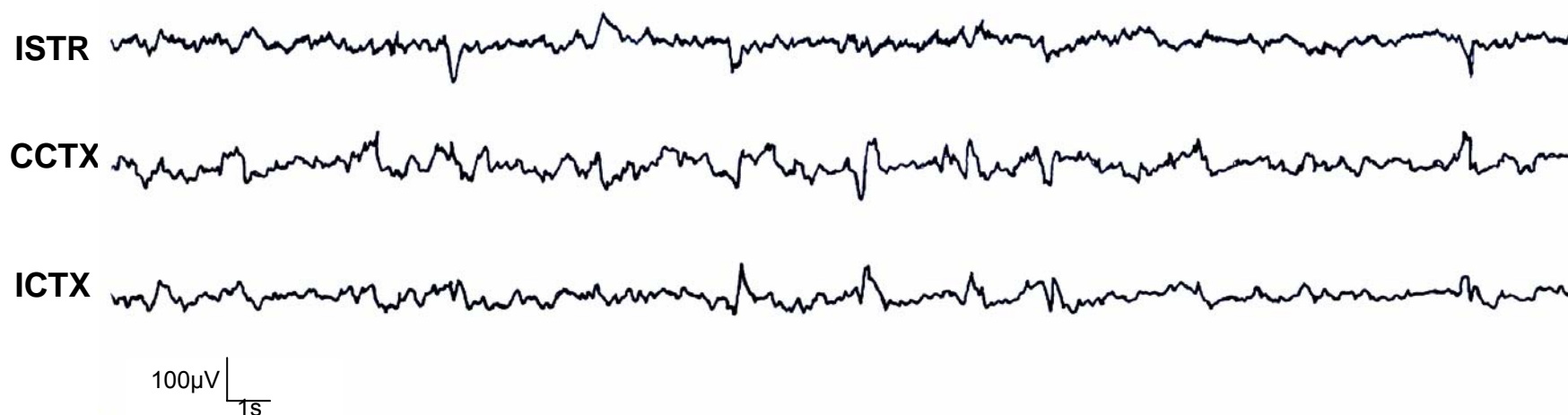
## 4.2 Registros eletroencefalográficos

4.2.1 - Registro eletroencefalográfico basal observado minutos antes da administração de ácido propiônico no estriado.



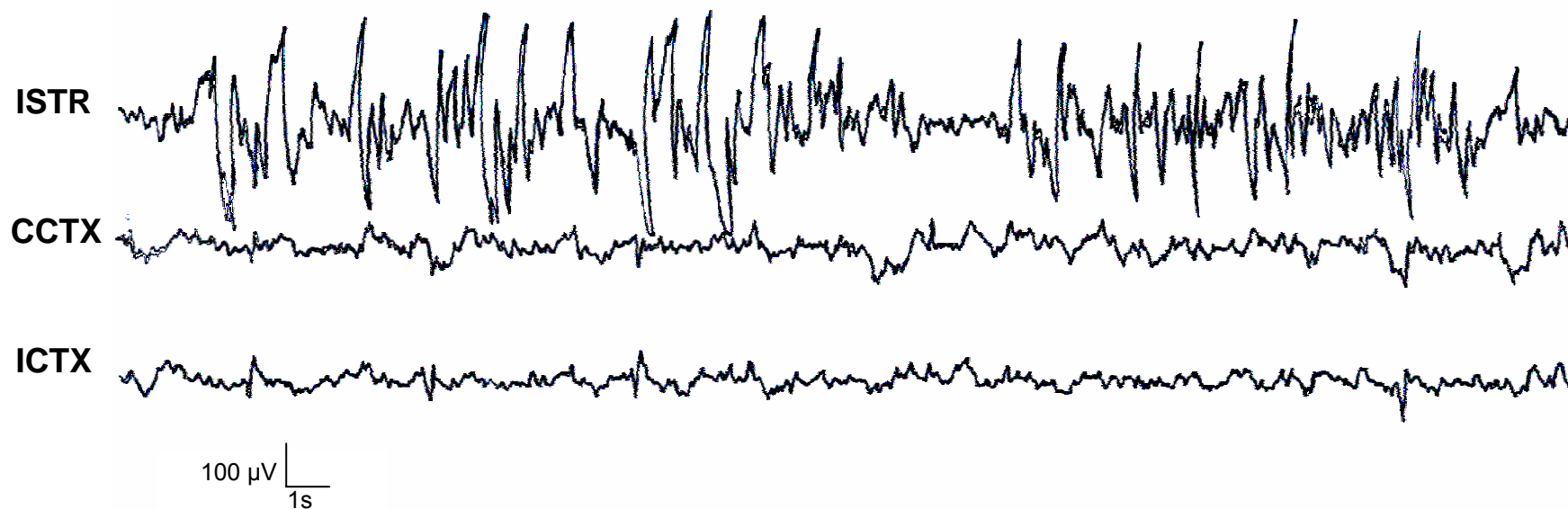
**Figura 14:** Registro eletroencefalográfico basal observado minutos antes da administração de PA no estriado. ISTR (estriado ipsilateral), ICTX (córtex ipsilateral), CCTX (córtex contralateral).

## 4.2.2 - Registro eletrencefalográfico observado 5 a 7 minutos após a injeção de salina.



**Figura 15:** Registro eletrencefalográfico observado 5 a 7 minutos após a injeção de NaCl (9 µmol/ 0,5 µl). ISTR (estriado ipsilateral), ICTX (córtex ipsilateral), CCTX (córtex contralateral).

## 4.2.3 - Registro após 5 a 7 minutos após a injeção de ácido propiônico



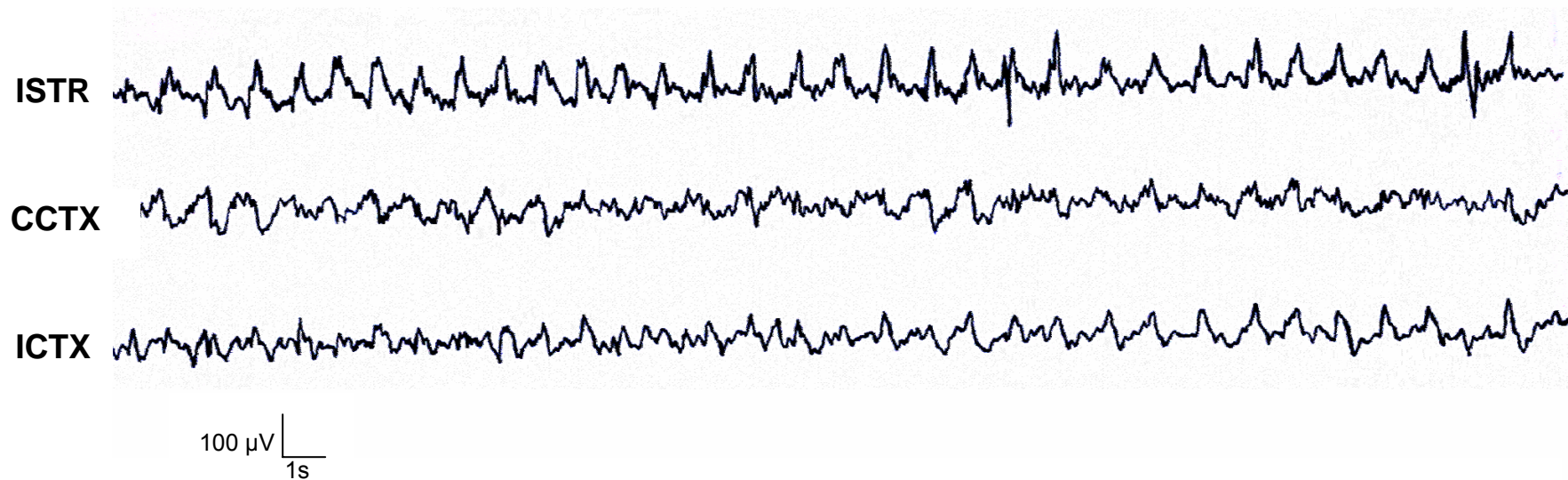
**Figura 16:** Registro eletroencefalográfico de convulsão observada 5 a 7 minutos após a injeção de ácido propiônico (6  $\mu\text{mol}$ / 1,5  $\mu\text{l}$ ). ISTR (estriado ipsilateral), ICTX (córtex ipsilateral), CCTX (córtex contralateral).

## 4.2.4 - Registro após 8 a 10 minutos após a injeção de ácido propiônico



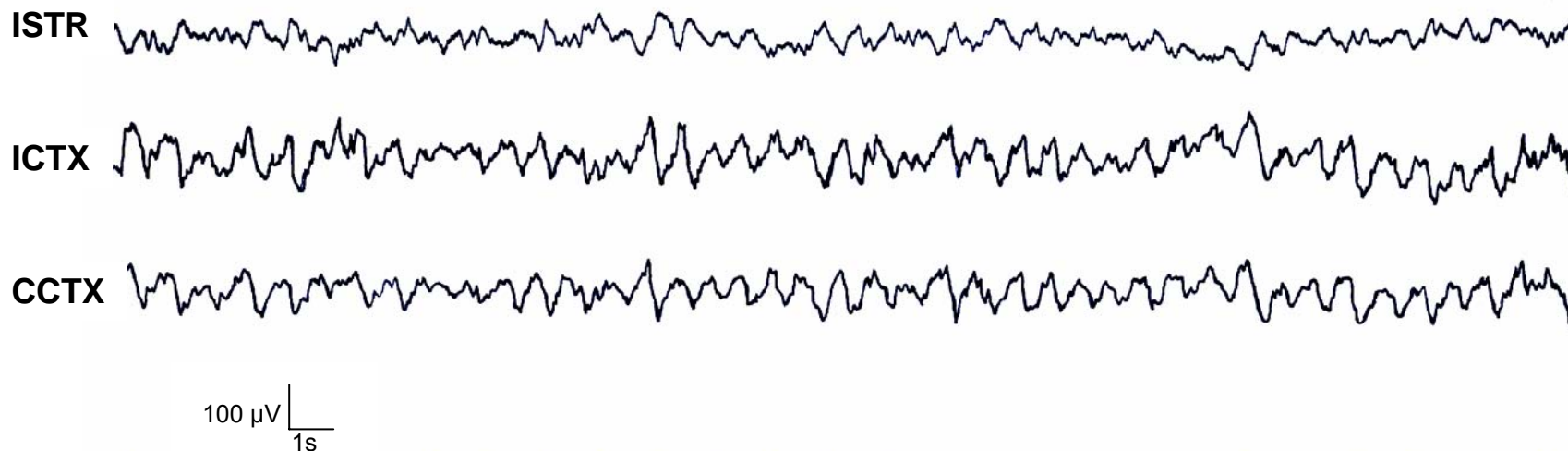
**Figura 17:** Registro eletrencefalográfico de convulsão observado 8 a 10 minutos após a administração de ácido propiônico (6 μmol/ 1,5 μl). ISTR (estriado ipsilateral), ICTX (córtex ipsilateral), CCTX (córtex contralateral).

## 4.2.5 - Registro de 12 a 15 minutos após a injeção de ácido propiônico



**Figura 18:** Registro eletrencefalográfico de convulsão observado 12 a 15 minutos após a administração intraestriatal de ácido propiônico (6  $\mu\text{mol}$ / 1,5  $\mu\text{l}$ ). ISTR (estriado ipsilateral), ICTX (córtex ipsilateral), CCTX (córtex contralateral).

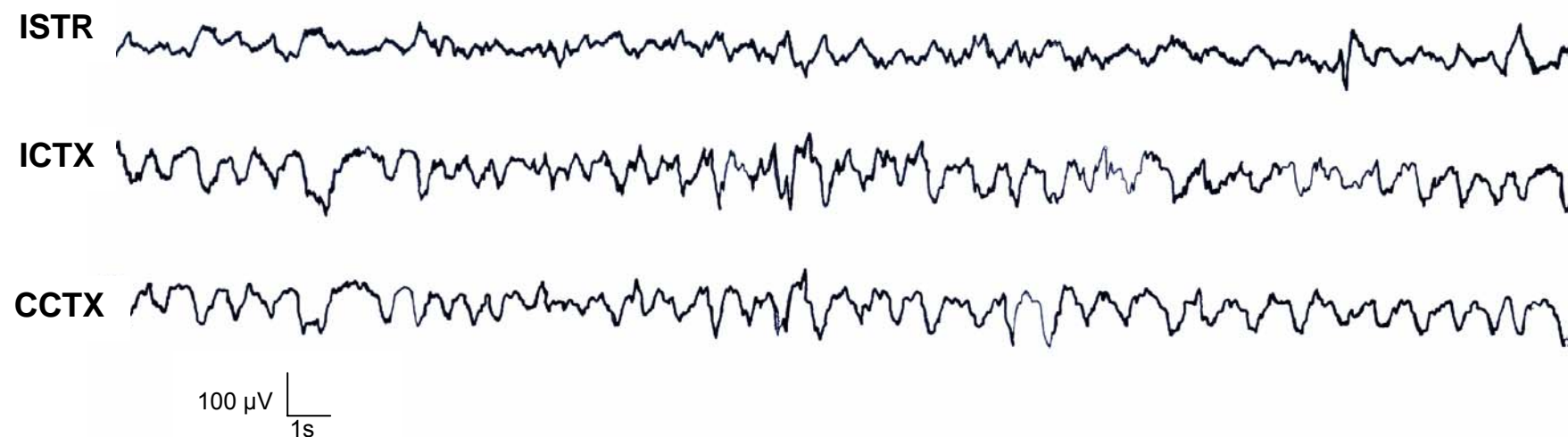
#### 4.2.6 - Registro eletrencefalográfico basal observado minutos antes da administração de MK-801 no estriado.



**Figura 19:** Registro eletrencefalográfico basal observado minutos antes da administração de MK-801 no estriado. ISTR (estriado ipsilateral), ICTX (córtex ipsilateral), CCTX (córtex contralateral).

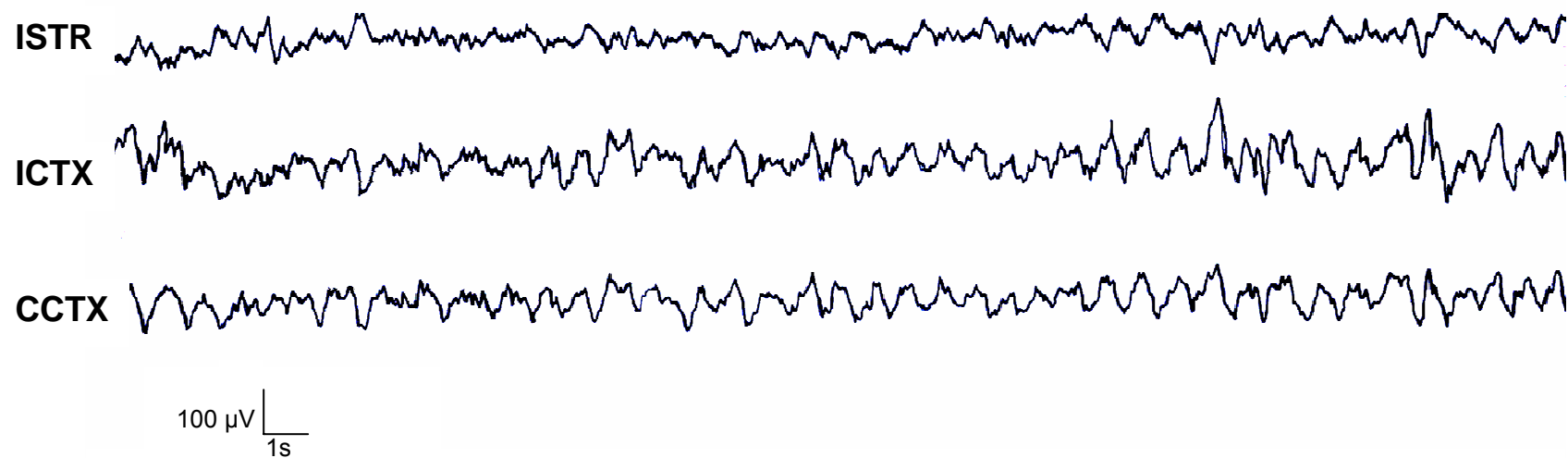


## 4.2.7 - Registro imediatamente após a injeção de MK-801



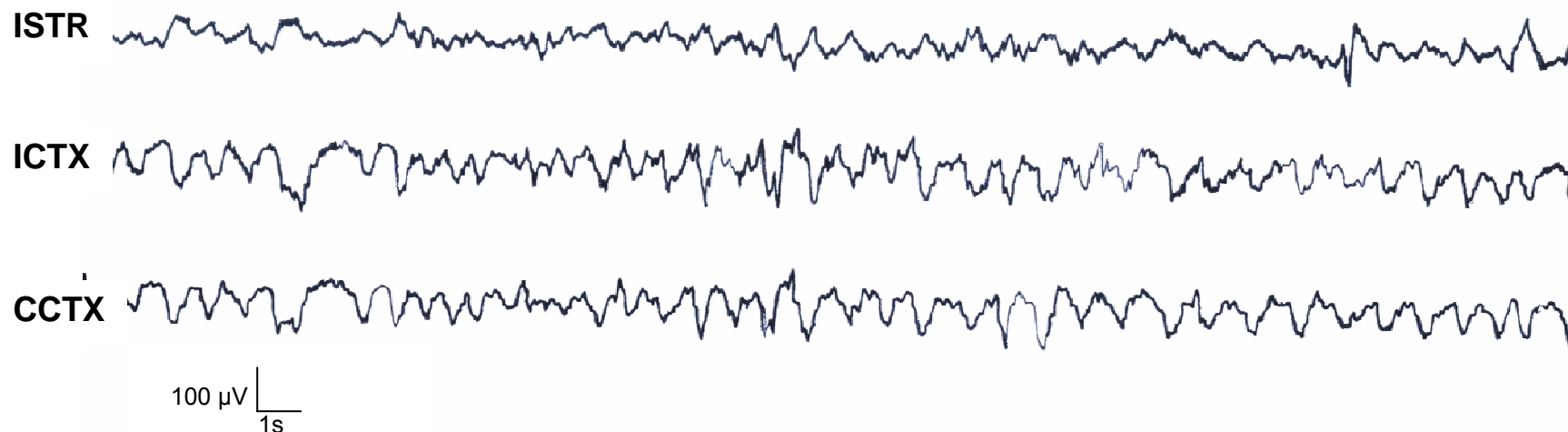
**Figura 20:** Registro eletrencefalográfico observado imediatamente após a injeção 3 nmol/ 0,5 μl de MK-801 no estriado. ISTR (estriado ipsilateral), ICTX (córtex ipsilateral), CCTX (córtex contralateral).

## 4.2.8 - Registro 13 a 15 minutos após a injeção de MK-801



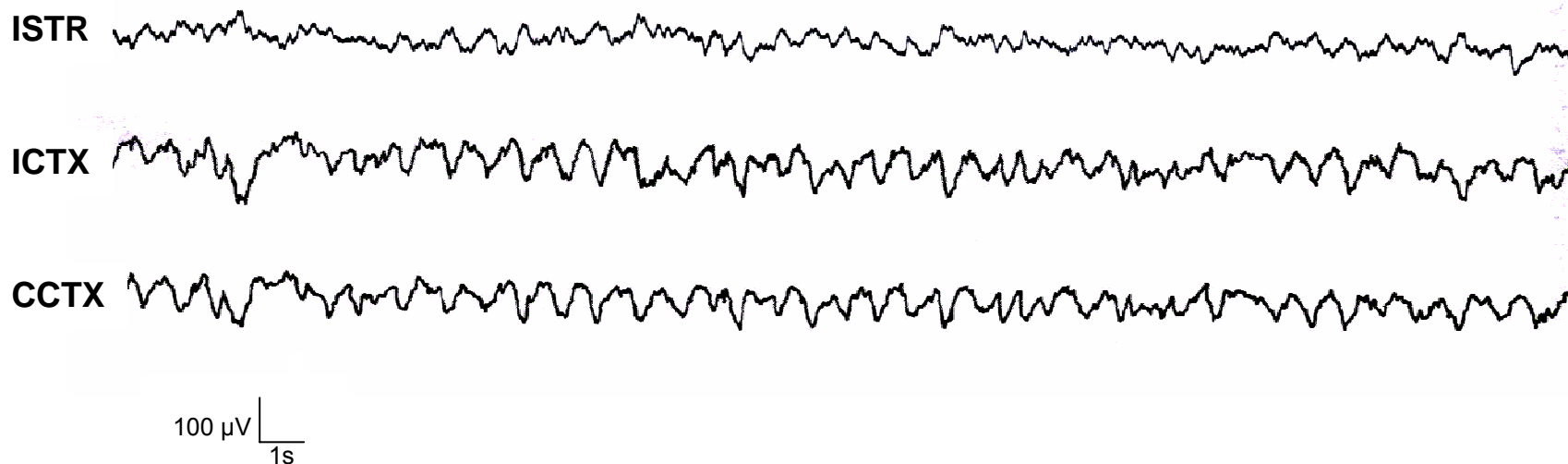
**Figura 21:** Registro eletrencefalográfico observado 13 a 15 minutos após a injeção 3 nmol de MK-801 no estriado. ISTR (estriado ipsilateral), ICTX (córtex ipsilateral), CCTX (córtex contralateral).

## 4.2.9 - Registro da administração de MK-801 e PA (I)



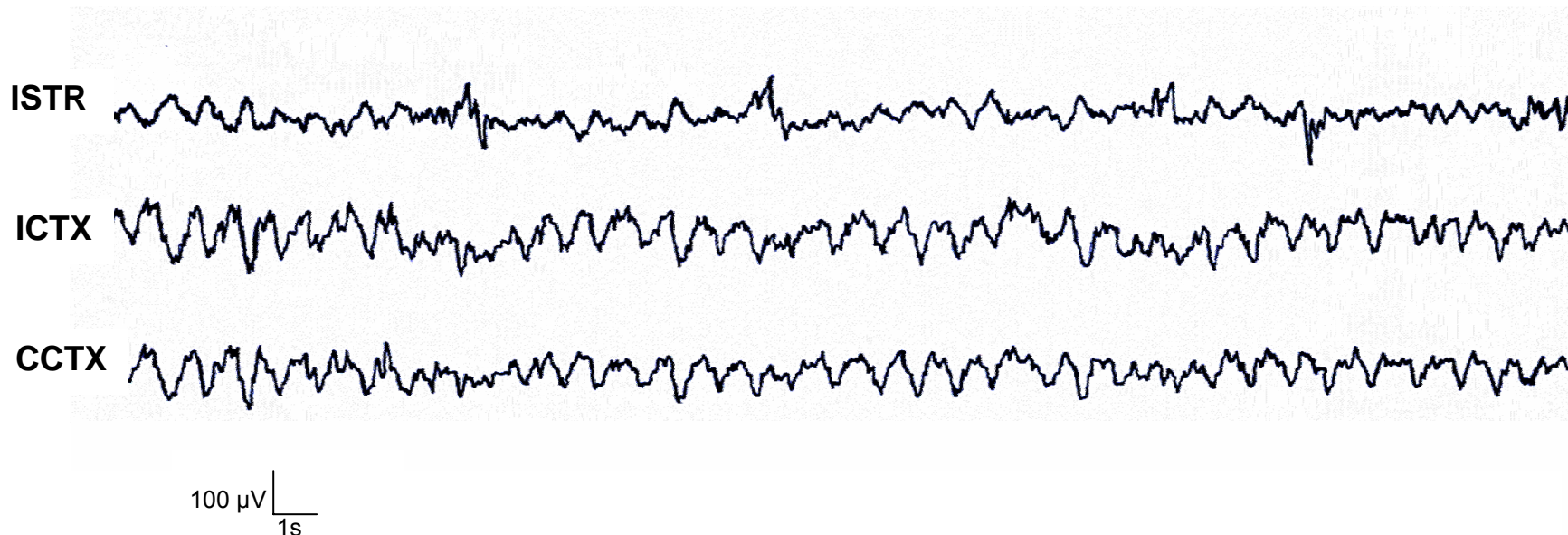
**Figura 22:** Registro eletrencefalográfico observado 5 a 7 minutos após a administração intraestriatal de ácido propiônico (6  $\mu\text{mol}$ / 1,5  $\mu\text{l}$ ), equivalente a 35 – 37 minutos após a injeção de MK-801(3nmol/ 0,5  $\mu\text{l}$ ). ISTR (estriado ipsilateral), ICTX (córtex ipsilateral), CCTX (córtex contralateral).

## 4.2.10 - Registro da administração de MK-801 e PA (II)



**Figura 23:** Registro eletrencefalográfico observado 8 a 10 minutos após a administração intraestriatal de ácido propiônico (6  $\mu\text{mol}$ / 1,5  $\mu\text{l}$ ), equivalente a 38 – 40 minutos após a injeção de MK-801(3nmol/ 0,5  $\mu\text{l}$ ). ISTR (estriado ipsilateral), ICTX (córtex ipsilateral), CCTX (córtex contralateral).

## 4.2.11 - Registro da administração de MK-801 e PA (III)



**Figura 24:** Registro eletrencefalográfico observado 13 a 15 minutos após a administração intraestriatal de ácido propiônico (6  $\mu\text{mol}$ / 1,5  $\mu\text{l}$ ), equivalente a 43 – 45 minutos após a injeção de MK-801 (3nmol/ 0,5  $\mu\text{l}$ ). ISTR (estriado ipsilateral), ICTX (córtex ipsilateral), CCTX (córtex contralateral).

### 4.3 – Avaliação dos parâmetros comportamentais

#### 4.3.1 – Efeito da administração intraestriatal de ácido propiônico e do pré-tratamento com Mk-801 sobre os episódios convulsivos

A injeção intraestriatal de ácido propiônico 6  $\mu\text{mol}$  causou o aparecimento de convulsões clônicas, medido a partir do número [ $F(3,36)=8,99;p<0,05$ ] e da duração [ $F(3,36)=8,40;p<0,05$ ] desses episódios convulsivos e confirmados por registros eletroencefalográficos (Figuras 8 e 9). O monitoramento do eletroencefalograma (EEG) no estriado e córtices cerebrais revelaram que em poucos minutos após a injeção de ácido propiônico (6  $\mu\text{mol}$ ), houve o aparecimento de um foco de despolarização no estriado injetado (figuras 16, 17 e 18), o qual se propagou para o córtex ipsilateral e, com menor intensidade para o córtex contralateral.

O tratamento com 3 nmol de MK-801, um antagonista do receptor glutamatérgico subtipo NMDA, trinta minutos antes da administração de PA (6  $\mu\text{mol}$ ), foi capaz de diminuir o número [ $F(1,25)=12,93;p<0,05$ ] e a duração [ $F(1,25)=15,26;p<0,05$ ] das convulsões induzidas por esse ácido (figuras 11 e 12). Os registros eletroencefalográficos confirmaram esses achados (figuras 22, 23 e 24).

### 4.4 – Avaliação das alterações bioquímicas

#### 4.4.1 - Efeito da administração intraestriatal de ácido propiônico e do pré-tratamento com Mk-801 sobre a carbonilação protéica total

A medida de carbonilação protéica realizada 15 minutos após a administração de ácido propiônico (6  $\mu\text{mol}$ ) revelou um aumento na oxidação protéica total: [ $F(1,25)=13,33; p<0,05$ ]. No entanto o tratamento com MK-801(3nmol), trinta minutos antes da injeção de PA foi capaz de prevenir esse aumento [ $F(1,25)=3,85; p<0,05$ ] (Figuras 10 e 13).

O presente estudo mostrou que o ácido propiônico induziu convulsões clônicas, observadas comportamentalmente e confirmadas por métodos eletrencefalográficos. Isto está de acordo com as alterações neurológicas e comportamentais encontradas em crianças com deficiência na atividade da enzima propionil-CoA carboxilase, onde as convulsões são sinais marcantes (Fenton & Rosemberg, 1995). Além disso, podemos ressaltar, que o ácido propiônico aumentou a carbonilação protéica corroborando com estudos prévios que sugerem o envolvimento das espécies reativas na neurotoxicidade induzida por esse ácido orgânico (Moyano et al., 1997; Fontella et al, 2000; Trindade et al, 2002). O MK-801, um antagonista de receptores glutamatérgicos foi capaz de atenuar as convulsões induzidas por ácido propiônico e o aumento da carbonilação protéica total.

Recentemente tem sido propostos que mecanismos excitotóxicos poderiam estar envolvidos nas alterações comportamentais e neuroquímicas observadas em crianças com EIM, caracterizadas por deteriorização neurológica seguida de crises metabólicas agudas associadas com hiperglicemia, hipoglicemia e/ ou acidose metabólica (Ludolph et al, 1992).

A redução nos níveis de ATP decorrente administração de inibidores metabólicos, como o MMA e MA (inibidores da enzima SDH) leva ao acúmulo de glutamato, principal aminoácido excitatório, no compartimento extracelular e isto se deve à inibição e reversão dos transportadores, dependentes de cálcio, responsáveis pela recaptação desse aminoácido nos neurônios (Madl & Burgesser, 1993) e astrócitos (Gemba et al, 1994).

Os níveis de glutamato estão relacionados a várias doenças neurológicas, incluindo epilepsia, isquemia cerebral, doença de Huntington e mal de Parkinson. A excitotoxicidade do glutamato mediada pelo receptor NMDA é considerada como o mais importante mecanismo que leva ao dano nessas patologias. Além disso, a indução de estresse oxidativo pelo glutamato parece ser o mecanismo citotóxico primário em alguns tipos de células neuronais (Han et al, 1997).

Alguns estudos revelam que o ácido propiônico é capaz de inibir indiretamente, três enzimas chaves do ciclo do ácido cítrico, através do metilcitrato, principal metabólito encontrado em pacientes com acidemia propiônica (Mahoney et al, 1975;

Ledley et al, 1988; Fenton et al, 2001). Além disso, tem sido sugerido que o MMA, bem como o ácido propiônico inibem  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Wajner et al, 1992; Malfatti et al, 2003), enzima responsável por manter o gradiente iônico e a polarização da membrana. Essa inibição, provavelmente resultante de um prejuízo energético celular, pode levar à despolarização neuronal parcial, promovendo a retirada de íons  $\text{Mg}^{++}$ , que bloqueiam o canal do receptor glutamatérgico subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) mantidos de maneira voltagem dependente. A ativação desse receptor possibilita a passagem de íons, particularmente  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$  para o meio intracelular (McDonald & Schoepp, 1993). Esse aumento na concentração de  $\text{Ca}^{++}$  é capaz de provocar uma cascata de processos patobioquímicos que podem levar à degeneração neuronal, pois são ativadas enzimas proteolíticas dependentes desse íon, envolvidas no fenômeno de neurotoxicidade, entre elas a enzima óxido nítrico sintase, que poderá reagir com superóxido para formar peroxinitrito e promover a produção de radicais hidroxil (Beckman et al, 1996), fazendo com que os efeitos deletérios das ER se tornem evidentes.

A produção excessiva de proteínas modificadas oxidativamente observada nesse estudo, foi atenuada pela administração de MK-801, um bloqueador não-competitivo do receptor NMDA. Podemos sugerir a partir desse achado, que a produção de ER pode ser devido à ativação do receptor glutamatérgico subtipo NMDA, provavelmente, devido à atividade deficiente da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e conseqüente déficit energético induzidos por ácido propiônico.

Entretanto, é importante salientar que a produção de ER, induzida pela administração intraestriatal de ácido propiônico, pode ser uma conseqüência do comportamento convulsivo, visto que podemos observar também, a partir dos nossos achados, que o MK-801 foi capaz de atenuar as convulsões induzidas por esse agente convulsivante. Esse resultado também nos leva a sugerir o envolvimento de receptores glutamatérgicos subtipo NMDA nos efeitos comportamentais e eletrencefalográficos induzidos por este ácido orgânico, resultados similares aos encontrados pelo nosso grupo, onde as convulsões induzidas por MMA também foram prevenidas pela administração de MK-801 por via intraestriatal (Mello, et al. 1996).



Em suma, o presente estudo sugere que provavelmente as ER estejam envolvidas na geração ou na manutenção dos episódios convulsivos e da mesma forma, podemos ressaltar evidências farmacológicas para a participação do glutamato nos déficits neurológicos encontrados em pacientes com acidemia propiônica, já que o MK-801, um antagonista do receptor glutamatérgico subtipo NMDA foi capaz de atenuar tanto as convulsões quanto o aumento da carbonilação protéica induzidas por esse ácido.

De acordo com os resultados obtidos nas avaliações realizadas, pode-se concluir que:

1. A injeção intraestriatal de ácido propiônico na dose de 6  $\mu\text{mol}$  induz comportamento convulsivo.
2. A injeção intraestriatal de ácido propiônico na dose de 6  $\mu\text{mol}$  aumenta a carbonilação protéica total, 15 minutos após a sua administração.
3. O tratamento com MK-801 atenuou o número e a duração das convulsões, bem como, retardou o aparecimento dos episódios convulsivos induzidos por ácido propiônico.
4. O tratamento com MK-801 atenuou o aumento na carbonilação protéica induzido por ácido propiônico.
5. A administração intraestriatal de ácido propiônico na dose de 6  $\mu\text{mol}$  altera os registros eletrencefalográficos do estriado e córtex ipsilateral (injetado).

- ARMSTRONG, G.L. Calcium channel regulation by calcineurin, a  $\text{Ca}^{+2}$  activated phosphate in mammalian brain. **Trends in Neurosciences: 12**, 117-122, 1989.
- ANDO, T.; KARSTEN, R.; WRIGHT, J.M.; et al. Isolation and identification of methylcitrate, a major metabolic product of propionate in patients with propionic acidemia. **The Journal of Biological Chemistry: 247**, 2200-2204, 1972.
- BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. **American Journal Physiology: 271**, 1424-1437, 1996.
- BEHRENS, M.I.; CHOI, D.W.; CANZIONERO, L.M.T.; et al. 3-Nitropropionic acid induces apoptosis in cultured striatal and cortical neurons. **Neuroreport: 6**, 545-548, 1995.
- BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; et al. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences: 65**, 1865-1874, 1999.
- BERLETT, B.S. & STADTMAN, E.R.; Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **Journal Biological Chemistry: 272**, 30313-6, 1997.
- BRANNAN, T.S.; MAKER, H.S.; RALES, I.P. Regional distribution of CAT in the adult rat brain. **Journal of Neurochemistry: 36**, 307-309, 1981.
- BRIDI, R.; ASALDI, J.; SGARBI, M.B.; et al. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. **International Journal of Developmental Neuroscience: 21**, 327-332, 2003.
- BRISMAR, J. & OZAND, P.T. CT and MR of the brain in the diagnosis of organic acidemias. Experiences from 107 patients. **Brain Development: 16**, 104-24, 1994.

- BRORSON, J.R.; MARCUCCILLI, C.J.; MILLER, R.J. Delayed antagonism of calpain reduces excitotoxicity in cultured neurons. **Stroke: 26**, 1259-1267, 1995.
- BRUSQUE, A.M.; BORBA, R.R.; SCHUCK, P.F.; et al; Inhibiton of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. **Neurochemistry International: 40**, 593-601, 2002.
- BRUSQUE, A.M.; ROTTA, L.N; TAVARES, R.G.; et al. Effects of methylmalonic and propionic acids on glutamate uptake by synaptosomes and synaptic vesicles and on glutamate release by synaptosomes from cerebral cortex of rats. **Brain Research: 920**, 194-201, 2001.
- BUTTERFIELD, D.A. & KANSKI, J. brain protein oxidation in age-related. **Mechanisms of Ageing and Development: 122**, 945-962, 2001.
- CASTILHO, R.F.; WOWALTOWSKI, A. Y.; VERCESI, A. E. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca<sup>2</sup> plus pro-oxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. Y. **Bionerg Biomemb.: 28**, 523-529, 1996.
- CATHELINEAU, L.; PETIT, F.P.; COUDE, F.X.; et al; Effect of propionate and pyruvate on citrulline synthesis and ATP content in rat liver mitochondria. **Biochemical Biophysical Research Communication: 90**, 327-332, 1979.
- CHALMERS, R.A.; LAWSON, A.W. ; WATTS, R.W.; et al. Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. **Journal of Inherited Metabolic Disease: 3**, 27-43, 1980.
- CHALMERS, R.A.; LAWSON, A.W. Organic acids in Man. **Analytical Chemistry and Diagnosis of the Organic Acidurias**, London: Chapman and Hall, 1982.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIES, A.; Hidroxiperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Research: 59**, 527-605, 1979.

COLLINGRIDGE, G.L.; LESTER, R.A.J. Excitatory amino acids receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacological Review: 40**, 143-210, 1989.

COLTON, C.; WILT, S.; GILBERT, D.; et al; Species differences in the generation of reactive oxygen species by microglia. **Molecular and Chemical Neurophatology: 28**, 15-20, 1996.

COYLE, J.T. & PUTTERFACKEN, P. Oxidative stress glutamate and neurodegenerative disorders. **Science: 264**, 489-495, 1993.

DANIELSSON, H. Present status of research on catabolism and excretion of cholesterol. **Advances in lipid Research: 1**, 335, 1963.

DAWSON, V.L. & DAWSON, T.M. Free radicals and neuronal cell death. **Cell Death and Differentiation: 3**, 71-78, 1996.

DEL RIO, R.M.Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias. **London, Chapman e Hall**, 221-229, 1962.

DROGË, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Review: 82**, 47-95, 2002.

DURAN, M.; DORLAND, L.; BREE, P. K.; et al. Selective screening for aminoacids disorders. **European Journal of Pediatric: 153**, 33-537, 1994.

DUTRA, J.C.; DUTRA-FILHO, C.S.; CARDOSO, S.E., et al., Inhibition Succinate dehydrogenase and Betahydroxybutyrate dehydrogenase activitis by

metilmalonate in brain and liver of developing rats. **Journal of Inherited Metabolic Disease: 16**,147-153, 1993.

FENTON, W.A.; GRAVEL,R.A.; ROSEMBLATT, D.S. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In. C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease: 8º ed., New York: McGraw-Hill, 2165-2193, 2001.**

FENTON, W.A.; ROSEMBERG, L.E. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. **The Metabolic Bases of Inherited Disease: 7ºed., New York, 1423-1449, 1995.**

FIGHERA, M.R.; BONINI, J.S.; DE OLIVEIRA,T.G.; et al. GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal administration of methylmalonic acid. **International Journal Biochemistry & Cell Biology: 35**, 465-463, 2003.

FIGHERA, M.R.; QUEIROZ, C.M.; STRACKE, M.P.; et al. Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions, **Neuroreport: 10**, 2039-2043, 1999.

FLECK, J.; RIBEIRO, M.C.P.; SCHNEIDER, M.C., et al. Intrastriatal malonate administration induces convulsive behavior in rats. **Journal of Inherited Metabolic Disease: 27**, 211-219, 2004.

FONNUN, F. Glutamate: a neurotransmissor in mammalian brain. **Journal of Neurochemistry: 42**, 1-11, 1984.

FONTELA, F.U.; PULROLNIK, V.; GASSEN, E., et al. Propionic acid L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. **Neurochemistry: 11**, 541-544, 2000.

FONTELLA, F.U.; GASSEN, E.; PUBROLNIK, V.; et al. Stimulation of lipid peroxidation *in vitro* in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. **Metabolic Brain Disease: 17**, 47-57, 2001.

FORFIA, P.R.; HINTZE, T.H.; WOLIN, M.S.; et al. Role of nitric oxide in the control of mitochondrial function. **Advances in Experimental Medicine and Biology: 471**, 381-388, 1999.

FRIZZO, M. E.; SCHWARZBOLD, C. ; PORCIUNCELA, LO ; et al. 3- hydroxyglutaric enhances glutamate uptake into astrocytes from cerebral cortex of young rats. **Neurochemistry International: 44**, 345-353, 2004.

GREENE, J.B. & GREENAMYRE, J.T. Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. **Journal of Neurochemistry: 64**, 430-436, 1995.

GREENE, J.G., PORTER, L., ELLER, R.V., et al. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an excitotoxic lesion in rat striatum. **Journal of Neurochemistry: 61**, 1151-1154, 1993.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Antioxidant defences. In: Halliwell B., Gutteridge J.M.C., eds. **Free Radicals in Biology and Medicine: Oxford University Press**, 105-245, 1999.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews: 52**, 253-280, 1994.

HARRIS, M.E.; CARNEY, J.M.; COLE, P.S. et al. Amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease. **Neuroreport: 6**, 1875-1879, 1995.

- HASSEL, B. & SONNEWALD, U. Selective inhibition of the tricarboxylic acid cycle of GABAergic neurons with 3-nitropropionic acid *in vivo*. **Journal of Neurochemistry**: **65**, 1184-1191, 1995.
- HAYASAKA, K.; METAKI, K.; SATOH, T.; et al; Comparison of cytosolic and mitochondrial enzyme alterations in the livers of propionic or methylmalonic acidemia: a reduction of cytochrome oxidase activity. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**: **137**, 329-334, 1982.
- HOFFMANN, G.F.; MEIR-AUGENTEIN, W.; STOCKER, S.; et al. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluids. **Journal of Inherited Metabolic Disease**: **16**, 648-666, 1993.
- JENNER, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. **Lancet**: **344**, 796-798, 1994.
- KABUTO, H.; YOKOI, I.; OGAWA, N. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by suppressing peroxidation. **Epilepsia**: **39**, 237-243, 1998.
- KLOSE, D.A.; KÖLKER, S.; HEINRICH, B., et al. Incidence and short-term outcome of children with symptomatic presentation of organic acid and fatty acid oxidation disorders in Germany. **Pediatrics**: **110**, 1204-1211, 2002.
- KÖLKER, S.; AHELEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J. et al. 3-Hydroglutaric and glutaric acids are neurotoxic through NMDA receptors in vitro. **Journal of Inherited Metabolic Disease**: **22**, 259-262, 1999.
- LEDLEY, F.D.; LUMETTA, M.R.; ZOGHBI, H.Y.; et al. Mapping of human methylmalonil-CoA mutase (MUT) locus on chromosome 6. **American Journal of Human Genetics**: **42**, 839-846, 1988.



- LENHERT, W.; SPERL, W.; SUORMALA, T.; et al; Propionic academia: clinical, biochemical and therapeutic aspects. **European Journal Pediatric: 153**, 68-80, 1994.
- LEVINE, R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. **Free Radical Biology & Medicine: 32**, 790-796, 2002.
- LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N. et al Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology:186**, 464-478,1989.
- LIOCHEV, S.L. The role of iron-sulfur clusters in vivo hydroxyl radical production. **Free Radical Research: 25**, 369-384, 1996.
- LUDOLPH, A.C.; HE, F.; SPENCER, P.S. et al. 3-nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. **Canadian Journal of Neurological Sciences: 15**, 492-498, 1992.
- MADL, J.E.; BURGESSER, K. Adenosine triphosphate depletion reverses sodium dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. **Journal of Neurochemistry: 13**, 4429-4444, 1993.
- MAHONEY, M.J; HART, A.C.; STLHEN, V.D. Methylmalonicacidemia: Biochemical heterogeneity in defects 5'-deoxyadenosylcobalamin synthesis. **Proceedings in National Sciences: 72**, 2799-2803, 1975.
- MALFATTI, C.R.M.; ROYES, L.F.F.; FRANCESCATO, L.; et al. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the rate striatum and cerebral cortex. **Epilepsia: 44**, 761-767, 2003.

- MARISCO, P.C.; RIBEIRO, M.C.P.; BONINI, J.S.; et al; Amonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. **Experimental Neurology: 182**, 455-460, 2003.
- MCDONALD, J.W. & SCHEEPP, D.D. Aminooxyacetic acid produces excitotoxic brain injury in neonatal rats. **Brain Research: 624**, 239-244, 1993.
- MELLO,C.F.; BEGNINI, J.; JIMENEZ-BERNAL, R.E.; et al; Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. **Brain Research: 171**, 120-125, 1996.
- MOYANO, D.; VILASECA, M.A.; PINEDA,M. Tocopherol in inborn errors of intermediary metabolism. **Clinica Chemica Acta: 263**, 147-155, 1997.
- NAKAO, S.; MORIYA, Y.; FURUYAMA, S.; et al. Propionic acid stimulates superoxide generation in human neutrophils celular. **Biological International: 22**, 331-337, 1998.
- NATHANSON, J.A.; SCAVONE, C.; SCALON, C., et al. The celular sodium pump as a site of acion for carbon monoxide and glutamate: A mechanism for long-term modulation of cellular activity. **Neuron: 14**, 781-794, 1995.
- NICHOLLS, D.G. & Atwell, D. The release and uptake of excitatory amino acids. **Trends Neuroscience: 21**, 53-58, 1990.
- OGIER DE BAULNY, H. & SAUDUBRAY, J.M. Branched-chain organic acidurias. **Seminars in Neonatology: 7**, 65-74, 2002.
- OGIER, H.; CHARPENTIER, C.; SAUDUBRAY, J.H.; et al. Organic acidemias, In: Fernandes, J.; Saudubray, J.M.; Tada, K. Eds. **Inborn Metabolic Disease: Berlim, Springer-Verlag**, 271-299, 1990.

- OGUNMEKAN, A.O. Vitamin E deficiency and seizures in animals and man. **The Canadian Journal of Neurological Sciences: 6**, 43-45; 1979.
- OKUN, J.C.; HOESTER, F.; FARKAS, L.M.; et al; Neurodegeneration in metilmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. **Journal of Biological Chemistry: 277**, 14674-14680, 2002.
- OLNEY, J.W. & HO, O.L. brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. **Nature: 227**, 609-611, 1970.
- OLNEY, J.W. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: **McGeer, E.C.; Olney, J.W.; McGeer, P.L. eds. Kainic acids as a tool in neurobiology**. New York: Raven Press, 95-1212, 1978.
- OSAWA, S.; KAMIJA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology.**, 54, 584-618, 1998.
- PACKER, L.; MIDORI, H.; TOSHIKASU, Y. Free radicals in brain physiology and disorders. **Academic Press: New York**, 1996.
- PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: Cause and consequence of epileptic seizures. **Free Radicals Biology & Medicine: 37**, 1951-1962; 2004.
- PERRY, G.; NUMONURA, A.; HIRAI, K.; et al. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? **Free Radical Biology and Medicine: 33**, 1475-1479, 2002.

- PRATICÒ, D. & DELANTY, N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. **American Journal of Medicine: 109**, 577-585, 2000.
- PUNCHARD, N.A. & KELLY, F.Y. **Free Radicals: a practical approach: Oxford University Press Inc., New York**, 1996.
- RADI, R.; RODRIGUES, M.; CASTRO, L.; et al. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. **Archives of Biochemistry and Biophysics: 308**, 89-95, 1994.
- RICE-EVANS, C.; BURDON, R.; Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipids Research: 32**, 71-110, 1993.
- RIOBO, N.A.; MELANI, M.; SANJUAN, N.; et al; The modulation of mitochondrial nitric oxide syntase activity in rat brain development. **The Journal of Biological Chemistry: 277**, 42447-42455, 2002.
- ROTHMAN, S.M. Excitotoxins: possible mechanism of action. **Annals of the New York Academy of Sciences: 648**, 132-139, 1992.
- ROTHSTEIN, J.D.; JIN, L.; DYKES-HOBERG, M. et al. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA: 90**, 6591-6595, 1993.
- ROYES, L.F.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; et al; Creatine protects against the convulsive behavior and lactato production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience: 118**, 1079-1090, 2003.

- SHACTER, E.; WILLIAMS, J.A.; LIM, M. et al. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification. Examination for western blot immunoassay. **Free Radical Biology & Medicine: 17**, 429-437, 1994.
- SOUTHORN, P.A. AND POWIS, G.; Free radicals in medicine. Nature and biologic reactions. **Mayo Clennic Proceeding: 63**, 381-389, 1998.
- STUMPF, D.A.; MC AFEE, J.; PARKS, J.K.; et al; Propionate inhibition of succinate CoA ligase (GDP) and the citric acid cycle in mitochondria. **Pediatric Research: 14**, 1127-1131, 1980.
- SUDHA, K.; RAO, A.V.; RAO, A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. **Clinica Chimica Acta: 303**, 19-24, 2004.
- TANAKA, K. Functions of glutamate transporters in the brain. **Neuroscience Research: 37**, 15-19, 2000.
- THOMPSON, G.N.; WALTER, J.H.; BRESSON, J-L; et al. Sources of propionate in inborn errors of propionate metabolism. **Metabolism**, 39, 1133, 1990.
- TRINDADE, V.M.; BRUSQUE, A.M.; RAASCH, J.R.; et al; Ganglioside alterations in the central nervous system of rats chronically injected with methylmalonic and propionic acids. **Metabolic Brain Disease: 17**, 93-102, 2002.
- UMERUMA, A.; MABE, H.; NAGAI, H. The phospholipase C inhibitor ameliorates post ischemic neuronal damage in rats. **Stroke: 23**, 1163-1166, 1992.
- WAJNER, K.D.; WANMACHER, C.M.D, et. al. Effects of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. **Journal of Inherited Metabolic Disease: 15**, 92-96, 1992.

- WAJNER, M. & COELHO, J.C. Neurological dysfunction in methylmalonic aciduria is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate of brain energy production. **Journal of Inherited Metabolic Disease: 20**, 761-768, 1997.
- WAJNER, M.; LATINI, A.; WYSE, A.T.S.; et al. The role of oxidative damage in the neurophatology of organic acidurias insights from animal studies. **Journal of Inherited Metabolic Disease: 27**, 427-448, 2004.
- WAJNER, M.; VARGAS, C.R.; BURIN, M.; ET AL. Investigação de erros inatos do metabolismo. **Revista HPCA: 3**, 343-360, 2001.
- WILLMORE, L.J.; RUBIN, J.J. Antioxidant pretreatment and iron-induced epileptiform discharges in the rat: EEG and histopathologic studies. **Neurology: 31**, 63-69; 1981.
- WÜLLNER, U., YOUNG, A.B., PENNEY, J.B. et al. 3-nitropropionic acid toxicity in the striatum. **Journal of Neurochemistry: 63**, 1772-1781, 1994.
- WYSE, A.T.; BRUSQUE, A.K.; SILVA, C.G.; et al. Inhibition of Na<sup>+</sup>, k<sup>+</sup>-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. **Neuroreport: 9**, 1719-1721, 1998.
- XIA, X.G.; SCHMIDT, N.; TEISMANN, P. et al. Dopamine mediates striatal malonate toxicity via dopamine transporter-dependent generation of reactive oxygen species and D2 but D1 receptor activation. **Journal of Neurochemistry: 79**, 63-70, 2001.
- YAN, L.J.; TRABER, M.G.; PACKER, L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. **Analytical Biochemistry: 228**, 349-351, 1995.

ZEEVALK, G.D.; DERR YELLIN, E.; NIKLAS, W.J. et al. NMDA receptor involvement in toxicity to dopamine neurons *in vitro* caused by the succinate dehydrogenase inhibitor 3-nitropropionic acid. **Journal of Neurochemistry**: **64**, 455-458, 1995.