

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós - Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE LEUCINA A RATAS WISTAR
DURANTE A GRAVIDEZ E A LACTAÇÃO SOBRE PARÂMETROS DE
ESTRESSE OXIDATIVO E DA REDE DE FOSFORILTRANSFERÊNCIA EM
CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO DA PROLE**

Itiane Diehl de Franceschi

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Porto Alegre, 2013.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós - Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE LEUCINA A RATAS WISTAR
DURANTE A GRAVIDEZ E A LACTAÇÃO SOBRE PARÂMETROS DE
ESTRESSE OXIDATIVO E DA REDE DE FOSFORILTRANSFERÊNCIA EM
CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO DA PROLE**

Itiane Diehl de Franceschi

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas:Bioquímica.

Porto Alegre, 2013.

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.

- Que quer dizer "cativar"?

- É algo quase sempre esquecido - disse a raposa. Significa "criar laços"...

- Criar laços?

- Exatamente - disse a raposa. - Tu não és ainda para mim senão um garoto inteiramente igual a cem mil outros garotos. (...) Não passo a teus olhos de uma raposa igual a cem mil outras raposas. Mas, se tu me cativas, nós teremos necessidade um do outro. Serás para mim único no mundo. E eu serei para ti única no mundo...

Começo a compreender - disse o pequeno príncipe. (...) Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez da tua rosa tão importante..."

(Livro O Pequeno Príncipe, de Antoine de Saint-Exupéry)

Dedico este trabalho aos meus pais, Enar e Nanci, que sempre foram (e serão) meu porto seguro. E ao meu noivo, Tiago.

Agradecimentos

Aos meus pais Nanci Sofia Diehl de Franceschi e Enar de Franceschi, meus primeiros amores e orientadores. E também aos meus avós Ivo e Ignêz Marli Diehl. Obrigado por acreditarem em mim e em meus sonhos, por fazerem de tudo para que eles se tornem realidade. Por terem sempre priorizado a minha educação e a de meu irmão. Pelo apoio e presença constante na minha vida. Pelo exemplo de caráter, honestidade e simplicidade. Por terem mostrado o significado de união e família. Amo vocês!

Ao meu querido orientador, Prof. Clovis M. D. Wannmacher, pela oportunidade, amizade e sabedoria. Pela paciência, pelos conselhos, por estar sempre pronto a esclarecer as dúvidas que foram surgindo durante a execução deste trabalho. Pelas conversas divertidas durante a hora do cafezinho, na companhia agradável do Prof. Dutra.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica e ao Departamento de Bioquímica, representados pelos professores e funcionários, pelo auxílio e suporte para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo de Aminoácidos (Lab.34). Em especial à Elenara, Denise e Alessandra pela amizade, companheirismo e pelo auxílio durante todas as etapas do Mestrado. Ao Thales e Vanessa, pela amizade e pelos momentos divertidíssimos que passamos durante as tarefas de bancada. Aos colegas Rodrigo, Tanise e Vivian. Às bolsistas Aline e Nariéle, pelo auxílio prestado. Às vizinhas de bancada – as gurias do Prof. Dutra: Tarsila, Priscila, Melaine e Giovana, pela convivência e pelos “chimas”.

Aos demais professores do Grupo de Erros Inatos do Metabolismo: Carlos Severo Dutra Filho, Moacir Wajner e Ângela T. S. Wyse.

Aos meus outros dois amores: meu irmão Vinícius Diehl de Franceschi, por ensinar-me a ser mais “leve”, alegre, por ser mais que um irmão, ser meu amigo. Meu noivo, Tiago Rathke, pelo carinho, amor, incentivo, companheirismo e compreensão. Por sonhar junto comigo.

A toda a minha grande família, apelidada carinhosamente de “Família Buscapé”, pela amizade e respeito que existe entre todos os membros, por eu me sentir tão bem e completa quando estamos juntos.

À família do Tiago (Rita, Roque, Luiza e Felipe), também. Por vibrarem juntos com as minhas conquistas e com as dele.

À Virginia Cielo Rech e Gilberto Orengo, pela amizade construída e por serem meus “mentores”. Obrigada!

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Bioquímica, pelos cuidados imprescindíveis com os animais.

À CAPES, CNPq, FAPERGS, pelo apoio financeiro.

Por último, mas não em menor grau de importância, a Deus. Pela fé, por me proporcionar saúde, conhecimento, amigos e tudo mais.

ÍNDICE

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1. INTRODUÇÃO	5
1.1 Erros Inatos do Metabolismo	5
1.2 Doença da Urina do Xarope do Bordo	6
1.2.1 Histórico	6
1.2.2 Conceito	6
1.2.3 Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada	7
1.2.4 Diagnóstico da DXB	9
1.2.5 Aspectos clínicos e classificação da DXB	10
1.2.5.1 Fenótipo Clássico	11
1.2.5.2 Fenótipo Intermediário	12
1.2.5.3 Fenótipo Intermitente	12
1.2.5.4 Fenótipo Responsivo à Tiamina	12
1.2.5.5 Deficiência de diidrolipoil desidrogenase (E3-deficiente)	13
1.2.6 Tratamento	13
1.2.7 Hiperleucinemia Materna	14
1.3 Rede de Fosforiltransferência	15
1.3.2 Creatinacinase	16
1.3.1 Adenilatocinase	18
1.3.3 Piruvatocinase	19
1.4 Estresse Oxidativo	20
1.4.1 Espécies Reativas	20
1.4.2 Defesas antioxidantes	22
1.4.2.1 Creatina	22
1.4.2.2 Piruvato	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.1 Objetivos específicos	25
PARTE II	27
3. METODOLOGIA E RESULTADOS	28
PARTE III	41
4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	42
5. CONCLUSÕES	46
6. PERSPECTIVAS	47
7. REFERÊNCIAS ADICIONAIS	48
8. ANEXOS	52
8.1 Lista de figuras	52
8.2 Lista de tabelas	52

PARTE I

Resumo, Lista de abreviaturas, Introdução e Objetivos

RESUMO

A doença da urina do xarope do bordo é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência severa na atividade do complexo enzimático da desidrogenase de α -cetoácidos de cadeia ramificada. Distúrbios neurológicos são comuns em pacientes com esta doença. Apesar de a leucina ser considerada o principal metabolito tóxico, os mecanismos envolvidos na neuropatologia das lesões cerebrais não são bem entendidos. No presente estudo, avaliou-se o possível efeito preventivo da coadministração de creatina e piruvato sobre os efeitos provocados pela administração de leucina a ratas Wistar durante a gestação e lactação sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, bem como sobre as atividades de certas enzimas envolvidas na rede de fosforiltransferência no córtex cerebral e no hipocampo da prole aos 21 dias de idade. A administração de leucina induziu o estresse oxidativo e alterou as atividades das enzimas piruvatocinase, adenilatocinase, creatinacinase citosólica e mitocondrial. A coadministração de creatina e piruvato foi parcialmente eficaz na prevenção de algumas alterações provocadas pela administração de leucina sobre o estresse oxidativo, mas não nas enzimas da rede de fosforiltransferência. Estes resultados sugerem que a hiperleucinemia materna não tratada pode ser tóxica para o cérebro da prole.

ABSTRACT

Maple Syrup Urine Disease is an inborn error of metabolism caused by severe deficiency in the activity of branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. Neurological disorders are common in patients with this disease. Although leucine is considered the main toxic metabolite, the mechanisms underlying the neuropathology of brain injury are poorly understood. In the present study, we evaluated the possible preventive effect of the co-administration of creatine plus pyruvate on the effects elicited by leucine administration to female Wistar rats during pregnancy and lactation on some oxidative stress parameters as well as the activities of some enzymes involved in the phosphoryltransfer network in the cerebral cortex and hippocampus of the offspring at 21 days of age. Leucine administration induced oxidative stress and altered the enzymes activities of pyruvate kinase, adenylate kinase, mitochondrial and cytosolic creatine kinase. Co-administration of creatine plus pyruvate was partially effective in the prevention of some alterations provoked by leucine administration on the oxidative stress but not in the enzymes of phosphoryltransfer network. These results suggest that non-treated maternal hyperleucinemia may be toxic to the brain of the offspring.

LISTA DE ABREVIATURAS

AACR	Aminoácidos de cadeia ramificada
AK	Adenilatocinase
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CK	Creatinacinase
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
CK-Ci	Creatinacinase citosólica
CK-Mi	Creatinacinase mitocondrial
Cr	Creatina
DCCR	Desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada
DXB	Doença da urina do xarope do bordo
EIM	Erros inatos do metabolismo
EO	Estresse oxidativo
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Ile	Isoleucina
KIC	Ácido α -cetoisocapróico
KIV	Ácido α -cetoisovalérico
KMV	Ácido α -ceto- β -metilvalérico
Leu	Leucina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PCr	Fosfocreatina
Pir	Piruvato
PK	Piruvatocinase
Val	Valina

1. INTRODUÇÃO

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) envolvem uma série de doenças hereditárias causadas pela deficiência total ou parcial de uma proteína, geralmente uma enzima. A deficiência na atividade desta enzima pode levar ao bloqueio da rota metabólica na qual ela está envolvida. O resultado deste bloqueio pode levar ao acúmulo de substratos ou de seus metabólitos e a falta dos produtos sintetizados por essa via, gerando, muitas vezes, prejuízo no desenvolvimento físico e/ou mental dos indivíduos afetados (Scriver et al., 2001).

O médico inglês Archibald Garrod foi o primeiro a sugerir o termo EIM em 1909 a partir de estudos com pacientes que apresentavam alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo. Ele observou que tais doenças apresentavam uma distribuição familiar, sendo mais frequente em filhos de casamentos consanguíneos. Baseado nas recém-descobertas Leis de Mendel, Garrod propôs que essas doenças apresentavam um modelo de herança autossômica recessiva. Assim, ele desenvolveu o conceito de que algumas doenças ocorreriam por uma deficiência ou ausência na atividade de uma enzima responsável por uma rota metabólica (Childs et al., 2001). Beadle, em 1945, reforça os estudos de Garrod, ao conceituar que cada gene é responsável pela síntese de uma proteína e que o processo metabólico se desdobra em etapas e que cada etapa é controlada por uma enzima específica – esse conceito explica a causa dos EIM (Scriver et al., 2001).

Desde os primeiros estudos de Garrod, já foram detectados mais de 500 EIM. Se avaliados de forma individual os EIM são raros, porém, quando considerados em conjunto essas doenças apresentam uma frequência relativamente alta, em torno de um

em 1.000 - 5.000 nascidos vivos (Scriver et al., 2001; Sanderson et al., 2006). Como os EIM abrangem várias doenças, diversas classificações têm sido propostas. A classificação mais utilizada leva em consideração a área do metabolismo afetada: EIM de ácidos orgânicos, aminoácidos, glicídios, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, purinas e pirimidinas, enzimas eritrocitárias, metais, lipoproteínas, hormônios e proteínas plasmáticas (Scriver et al., 2001). Nesse trabalho será abordado um EIM dos aminoácidos, a doença da urina do xarope do bordo.

1.2 Doença da Urina do Xarope do Bordo

1.2.1 Histórico

John Menkes e colaboradores, em 1954, descreveram quatro casos de doença degenerativa cerebral em uma mesma família. A manifestação da doença iniciava na primeira semana de vida com prognóstico fatal nos próximos três meses. O achado clínico mais importante foi um odor forte de açúcar queimado na urina, semelhante ao odor adocicado do xarope do bordo, um ingrediente culinário muito utilizado nos Estados Unidos e Canadá. Daí vem o nome da doença, Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) ou *Maple Syrup Urine Disease* (MSUD). A partir de então, foram identificados um aumento nas concentrações dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina (Westall et al., 1957) e seus α -cetoácidos (CACR) correspondentes, ácido α -cetoisocapróico (KIC), α -ceto- β -metilvalérico (KMV) e α -cetoisovalérico (KIV) no sangue e na urina de pacientes com DXB (Dancis et al, 1959; Menkes, 1959).

1.2.2 Conceito

A DXB é uma doença metabólica hereditária de caráter autossômico recessivo, causada por uma deficiência na atividade do complexo enzimático da desidrogenase de

α -cetoácidos de cadeia ramificada (DCCR) (Chuang & Shih, 2001). Como consequência deste bloqueio, há um acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina e seus respectivos α -cetoácidos nos tecidos e fluidos corporais de indivíduos com a doença (Scriver et al, 2001).

1.2.3 Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada

Os aminoácidos Leu, Ile e Val (Figura 1) são aminoácidos que não podem ser sintetizados pelos animais, sendo então classificados como aminoácidos essenciais e são obtidos exclusivamente através da dieta. Correspondem a 40% dos aminoácidos essenciais em indivíduos normais e 35% dos aminoácidos indispensáveis para o tecido muscular. O principal destino metabólico desses aminoácidos é a sua incorporação em proteínas (Schadewaldt & Wendel, 1997). Eles participam de uma rota catabólica comum, constituída de três etapas e, após, são degradados por vias diferentes (Figura 2).

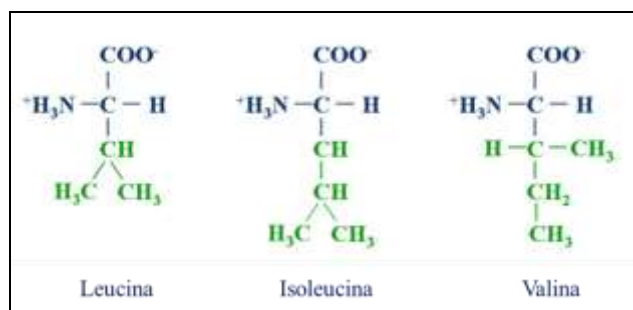


Figura 1. Estrutura química dos aminoácidos de cadeia ramificada.

Após a ingestão, são metabolizados pelo músculo esquelético como fonte alternativa de energia e também são oxidados pelos tecidos renal, cerebral, cardíaco e adiposo. A oxidação inicia com o transporte dos AACR para dentro da célula, através de um sistema de transporte L independente de sódio, localizado na membrana plasmática (Hawkins et al., 2006). Então, eles sofrem três reações iniciais comuns: transaminação, descarboxilação oxidativa e desidrogenação.

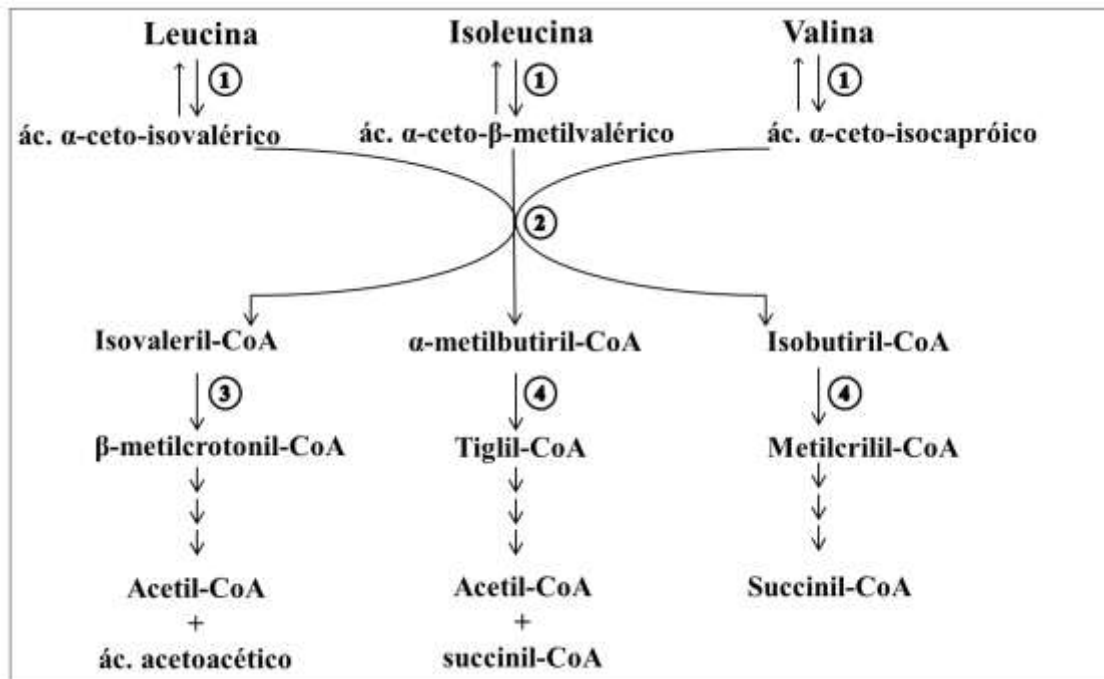


Figura 2. Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada. (1) Reação de transaminação catalisada pelas aminotransferases de aminoácidos de cadeia ramificada. (2) Reação de descarboxilação oxidativa catalisada pelo complexo enzimático desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada. (3) Reação de desidrogenação catalisada pela isovaleril-CoA desidrogenase. (4) Reação de desidrogenação catalisada pela α -metil desidrogenase de cadeia ramificada. (Adaptado de Chuang e Shih, 2001).

Inicialmente, os grupos amino dos AACR são removidos por aminotransferases de cadeia ramificada, tanto no citosol quanto na mitocôndria, produzindo os respectivos cetoácidos: KIC, KMV, KIV. Os CACR produzidos no citosol são translocados para o interior da mitocôndria por um transportador específico de CACR. Lá, eles sofrem descarboxilação oxidativa catalisada pelo complexo enzimático da desidrogenase de α -cetoácido de cadeia ramificada, que remove o grupo carboxílico dos cetoácidos.

Como produtos da desidrogenação dos cetoácidos, catalisada pelo complexo da DCCR, são formados os respectivos acil-CoA de cadeia ramificada: isovaleril-CoA, α -metilbutiril-CoA e isobutiril-CoA. Esses produtos sofrem uma desidrogenação catalisada por uma acil-CoA desidrogenase específica. A partir daí, cada aminoácido é degradado por vias diferentes.

Os produtos finais do metabolismo da leucina são a acetil-CoA e o acetoacetato, sendo, portanto, um aminoácido cetogênico. A valina dá origem ao succinil-CoA que,

entra no ciclo de Krebs e, é eventualmente convertido em glicose pela gliconeogênese, sendo classificada, então, como um aminoácido gliconeogênico. A isoleucina tem como produtos finais acetil-CoA e succinil-CoA, sendo, assim, um aminoácido glicocetogênico (Chuang e Shih, 2001).

1.2.4 Diagnóstico da DXB

A DXB e outras doenças genéticas e infecciosas podem ser detectadas pela triagem neonatal, popularmente conhecido como Teste do Pezinho. O sangue é coletado e impregnado em papel filtro, geralmente entre o 3º ao 7º dia de vida do recém-nascido, e enviado para análise (Schwartz et al., 2000).

O teste de triagem para DXB é feito através da identificação de altas concentrações dos AACR no sangue e seus CACR na urina, através de cromatografia de aminoácidos e de ácidos orgânicos, respectivamente (Chuang e Shih, 2001). Vários países vêm utilizando o método de espectrometria de massa em Tandem para a triagem neonatal, permitindo a identificação precoce da DXB quando os pacientes são ainda assintomáticos ou apresentam poucos sintomas (Peinemman e Danner, 1994; Simon et al., 2006). Aqui no Brasil, o teste do pezinho fornecido pelo Sistema Único de Saúde não contempla o teste de triagem para a DXB, o qual pode ser realizado somente em laboratórios particulares (Souza, et al., 2002).

A leucina é o principal metabólito acumulado, podendo atingir concentrações séricas de 5 mM, enquanto isoleucina e valina chegam às concentrações de 1mM no momento do diagnóstico (Bremer et al., 1981). A presença de L-aloisoleucina, um dos produtos da racemização da isoleucina, tem sido considerada patognomônica na DXB. Este metabólito tem uma lenta depuração e altos níveis estão presentes no plasma por vários dias após uma crise de descompensação metabólica em pacientes com DXB (Chuang e Shih, 2001).

O procedimento que confirma o diagnóstico da doença é a medida da atividade do complexo enzimático α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada em cultura de leucócitos periféricos de pacientes (Peinemann e Danner, 1994; Chuang e Shih, 2001).

O diagnóstico pré-natal da DXB pode ser realizado em cultura de células do líquido amniótico retiradas por amniocentese entre a 14 e 18ª semana de gestação, ou através de análise direta do tecido de vilosidades coriônicas (Chuang e Shih, 2001).

1.2.5 Aspectos clínicos e classificação da DXB

A manifestação clínica da DXB é variada e pode ser classificada em cinco fenótipos clínicos: clássica, intermediária, intermitente, responsiva a tiamina e deficiência de Diidrolipoil desidrogenase (E3-deficiente). Eles são classificados de acordo com apresentação clínica da doença, tolerância à leucina e a atividade residual enzimática (Tabela 1) (Chuang e Shih, 2001).

Tabela 1. **Classificação e aspectos clínicos da DXB.**

Fenótipo	Manifestações clínicas	Achados bioquímicos	Atividade normal do complexo DCCR
Clássica	Início neonatal Dificuldade de alimentação Letargia Hipotonia Cetoacidose Convulsão.	Níveis muito elevados de Leu, Ile, Val e seus cetoácidos. Níveis elevados de aloisoleucina.	0 – 2%
Intermediária	Atraso no desenvolvimento físico e psicomotor Cetoacidose pouco frequente.	Níveis elevados de Leu, Ile, Val e seus cetoácidos. Níveis elevados de aloisoleucina.	3 – 30%
Intermitente	No início, o desenvolvimento é normal. Episódios de ataxia e/ou cetoacidose, precedidos de infecções ou estresse.	Níveis de Leu, Ile e Val normais, quando assintomático.	5 – 20%

Responsiva à tiamina	Similar à forma intermediária.	Redução dos níveis de Leu, Ile, Val e/ou seus cetoácidos quando realizado tratamento com tiamina.	2 – 40%
E3 deficiente	Usualmente sem sintomas neonatais Deficiência de crescimento Hipotonia Acidose láctica Atraso no desenvolvimento Movimentos desordenados Deterioração progressiva	Moderado aumento dos níveis de Leu, Ile, Val e seus cetoácidos. Níveis aumentados de piruvato e α -cetogluturato.	0 – 25%

Fonte: Adaptado de Chuang e Shih (2001).

1.2.5.1 Fenótipo Clássico

Apresenta um quadro neonatal de encefalopatia é a mais comum (80% dos casos de DXB), mais severa e de evolução rápida. A atividade do complexo DCCR é extremamente baixa, menor que 2% do normal. Os níveis de AACR, principalmente leucina, estão extremamente elevados no sangue (podem chegar a 5 mM), líquido e urina e, a presença de aloisoleucina é o diagnóstico para a DXB clássica.

A doença manifesta-se durante os primeiros dias de vida, entre 4 e 7 dias após o nascimento. Os sintomas clínicos iniciais incluem letargia e recusa alimentar, evoluindo para perda de peso, cetoacidose, sinais neurológicos progressivos tais como episódios de alternância de hipotonia e hipertonia, distonia, convulsões, encefalopatia aguda e coma. A urina possui um odor de açúcar queimado.

A maioria dos pacientes não tratados morre nos primeiros meses de vida, devido às crises metabólicas recorrentes e progressiva deterioração neurológica, que são, frequentemente, precipitadas por infecções ou outros eventos que estimulem o catabolismo, como cirurgias e vacinações.

1.2.5.2 Fenótipo Intermediário

Pacientes com este fenótipo apresentam elevações persistentes de AACR, porém menores do que na forma clássica. A atividade do complexo DCCR varia de 3% a 30% do normal, os danos neurológicos são mais brandos e não apresentam sintomas severos durante o período neonatal. Muitos não apresentam quadro de descompensação metabólica aguda. Os sintomas manifestam-se mais tardiamente, entre os 5 meses e 7 anos, e os pacientes apresentam atraso no desenvolvimento, convulsões e episódios de cetoacidose.

1.2.5.3 Fenótipo Intermitente

Os pacientes apresentam um desenvolvimento próximo do normal, com crescimento e inteligência normais. Entretanto, possuem risco de desenvolver descompensação metabólica aguda em situações de estresse. A atividade do complexo DCCR varia de 5% a 20% do normal. Quando assintomáticos, os níveis de AACR são normais no plasma. Durante as crises agudas, a urina apresenta odor característico e os níveis de AACR e CACR estão aumentados no sangue e na urina. Os sintomas surgem entre os 5 meses a 2 anos de vida, geralmente associados a infecções.

1.2.5.4 Fenótipo Responsivo à Tiamina

Os pacientes não tem a doença neonatal aguda, o quadro clínico é semelhante ao fenótipo clássico e o curso inicial caracteriza-se por atraso no desenvolvimento neuromotor. A concentração de AACR é de 2 a 5 mM, cerca de 5 vezes maior do que o normal. A administração de 10 a 1000 mg/dia de tiamina, associada a uma dieta restrita em AACR reduz esses níveis ao normal. A atividade do complexo DCCR varia de 2 a 40% do normal. As manifestações clínico-laboratoriais mais frequentes são descompensação metabólica e acidose, acompanhada desenvolvimento físico normal.

1.2.5.5 Deficiência de diidrolipoil desidrogenase (E3-deficiente)

É uma forma rara, clinicamente semelhante à DXB intermediária e acompanhada por acidose láctica intensa. Os níveis de AACR estão levemente ou moderadamente aumentados no plasma. Após o aparecimento de acidose láctica persistente, entre 8 semanas e 6 meses de vida, ocorre deterioração neurológica progressiva, caracterizada por hipotonia, atraso no desenvolvimento e encefalopatia. Os resultados do tratamento com biotina, tiamina e ácido lipóico, combinados com restrição dietética de gorduras e AACR não têm sido satisfatórios.

1.2.6 Tratamento

O tratamento consiste na restrição da ingestão de proteínas, com o objetivo de diminuir o acúmulo de AACR e, conseqüentemente, seus efeitos tóxicos, principalmente ao sistema nervoso central. A finalidade do tratamento é normalizar as concentrações dos AACR, sem prejudicar o crescimento e o desenvolvimento dos pacientes. Para isso, além da restrição dietética, é realizada uma suplementação com uma fórmula de aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais. O tratamento deve ser iniciado o mais cedo possível, ainda durante o período neonatal, e deve ser mantido durante toda a vida dos pacientes. A terapia com tiamina, na dose de 50-30 mg/dia durante 3 semanas no início do tratamento, é utilizada para detectar pacientes com o fenótipo responsivo à tiamina (Chuang e Shih, 2001).

O transplante de fígado tem sido utilizado em casos mais graves de DXB. A substituição do órgão com o gene alterado por um órgão normal faz com que os AACR sejam metabolizados corretamente. É considerado um tratamento eficaz em longo prazo para DXB clássica, porém os danos cerebrais já estabelecidos não podem ser revertidos (Mazariegos et al., 2012).

Durante a fase aguda da DXB, que pode ser desencadeada por situações de estresse como infecções, febres e outros eventos que estimulem o catabolismo proteico, as intervenções devem ser mais agressivas. O objetivo é reduzir rapidamente os níveis de AACR e os outros metabólitos acumulados na doença, que podem levar à deterioração das funções cerebrais.

Há três pontos centrais no tratamento das crises metabólicas: 1- rápida remoção dos metabólitos tóxicos (diálise peritoneal, hemodiálise, transfusão sanguínea); 2- suporte nutricional adequado; 3- minimização do catabolismo/ estimulação do anabolismo. A descompensação metabólica é corrigida através do tratamento da situação precipitante (febre, infecções, etc.), além da oferta de calorias suficientes, insulina, aminoácidos livres, isoleucina e valina para conseguir sustentar a síntese de proteínas nos tecidos (Strauss et al., 1993; Chuang e Shih, 2001).

Os mecanismos pelos quais os AACR e seus CACR são tóxicos ao sistema nervoso central ainda não estão bem esclarecidos. Alguns fatores, tais como a complexidade do desenvolvimento cerebral, as concentrações alcançadas pelas toxinas e o estágio do desenvolvimento do cérebro no momento em que elas atuam prejudicam o esclarecimento desses efeitos.

1.2.7 Hiperleucinemia Materna

Levando-se em consideração que, atualmente, os EIM são diagnosticados mais precocemente através da triagem neonatal, um grande número de mulheres portadoras de EIM chega à idade adulta e podem engravidar. Sabe-se que em qualquer gravidez está associado o estresse fisiológico e que a descompensação metabólica pode ocorrer mais frequentemente em portadoras de EIM durante a gestação, mas são poucos os relatos existentes (Walter, 2000).

No entanto, os possíveis riscos a que essas crianças estarão submetidas é desconhecido na maioria das doenças, uma vez que pouco se conhece sobre os riscos associados à gravidez nesses casos (Radomyska, 2003).

O interesse pelo estudo da hiperleucinemia materna surgiu a partir do conhecimento de que a fenilcetonúria materna compromete o desenvolvimento físico e mental dos fetos (Vargas e Levy, 1998). Neste contexto, cabe salientar que a incidência da DXB detectada por programas de triagem neonatal é alta em algumas populações, podendo chegar a 1:39.300 nascidos vivos na região da Galícia, na Espanha (Couce Pico et al., 2007) e 1:86.800 nascidos vivos em Portugal (Quental et al., 2010). Isso torna, portanto, relevante a investigação dos efeitos da hiperleucinemia materna sobre as crianças geradas sob essa condição. Até o presente momento, não existem relatos do acompanhamento do desenvolvimento de crianças nascidas de mães com DXB.

1.3 Rede de Fosforiltransferência

Os mecanismos envolvidos na manutenção do equilíbrio entre a liberação e a captação de energia são finamente regulados por processos intracelulares. Para um ótimo funcionamento do sistema bioenergético celular, é necessário que compostos ricos em energia, como o trifosfato de adenosina (ATP), sejam produzidos e entregues aos locais de consumo em uma velocidade correspondente à sua taxa de consumo (Dzeja, 2003).

Sendo assim, uma rede de transferência de grupos fosforil (rede de fosforiltransferência), catalisada pelas enzimas creatinacinaase (CK), adenilatocinase (AK) e enzimas glicolítica (principalmente a piruvatocinase - PK) atua na transferência de grupos fosforil entre os locais de produção e de consumo de ATP (figura 3) (Wallimann, 1994; Saks et al., 1996; Dzeja et al., 1998).

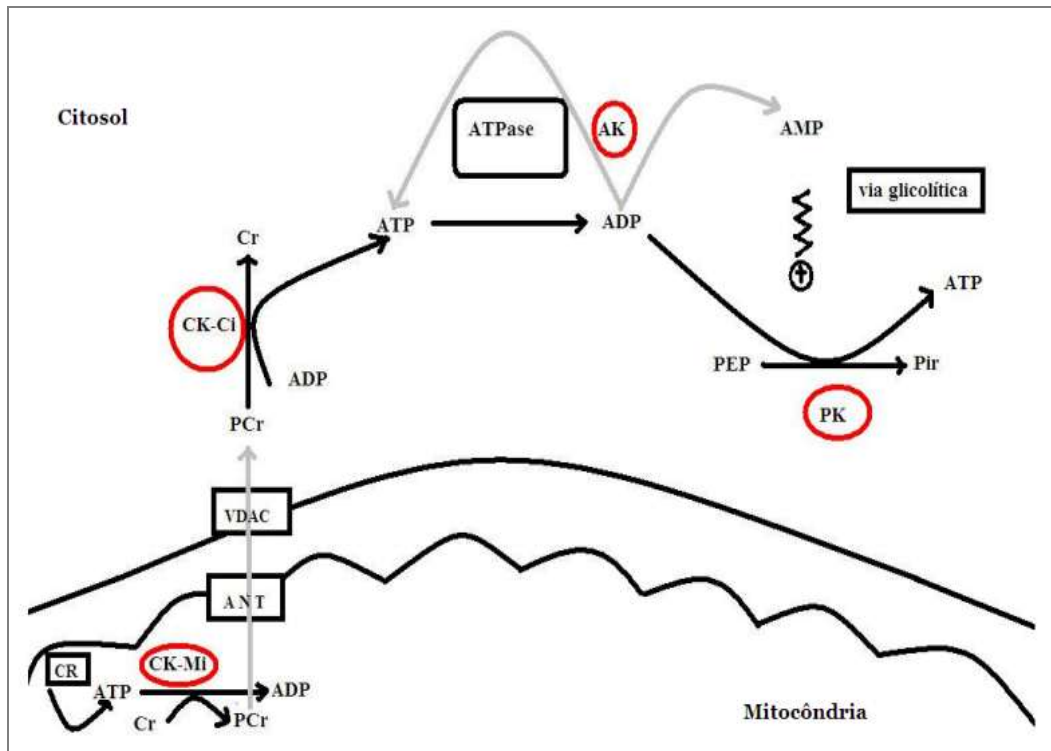


Figura 3. Esquema das principais enzimas envolvidas na rede de fosforiltransferência em tecidos com alta demanda energética como, por exemplo, músculo esquelético, coração e cérebro. A entrega de fosfocreatina (PCr) é facilitada pela CK mitocondrial (CK-Mi), a partir do ATP formado na fosforilação oxidativa (CR). A Pcr é exportada para o citosol e a CK citosólica (CK-Ci) transfere o grupo fosfato da PCr ao ADP, formando ATP. A AK é capaz de regenerar o ATP a partir de duas moléculas de ADP. Finalmente, a via glicolítica é estimulada pelo AMP formado na reação da AK, e a PK pode, então, sintetizar ATP a partir do fosfoenolpiruvato (PEP) e ADP. Como esses sistemas operam em conjunto, a atividade reduzida de uma enzima pode ser compensada pelo aumento na atividade de outra. Entretanto, uma alteração na atividade de duas ou mais enzimas pode levar a um comprometimento cumulativo na comunicação entre os sítios de consumo e produção de ATP (Adaptado de Andrade, 2012).

Em média, as concentrações de ATP, difosfato de adenosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP) são de 5 mM, 1 mM e 0,1 mM, respectivamente, e são mantidas em equilíbrio constante, dentro das células (Noma, 2005). Mudanças na concentração destes compostos podem alterar a atividade de enzimas importantes e regulatórias de diversas rotas oxidativas e biossintéticas, que percebem mudanças no estado energético e metabólico das células.

1.3.2 Creatinacina-se

A creatinacina-se (CK; EC 2.7.3.2) catalisa a transferência reversível de um grupo N-fosforil da fosfocreatina (PCr) para o ADP, formando ATP e creatina (Cr), em

uma reação dependente de magnésio, conforme a reação: $\text{PCr} + \text{MgADP} \leftrightarrow \text{MgATP} + \text{Cr}$ (Wallimann et al.,1992). Essa enzima possui um importante papel na homeostase energética de células com necessidades energéticas e intermitentes, como as do músculo esquelético e cardíaco, de tecidos neurais como o cérebro, retina e fotorreceptores (Wallimann et al.,1998).

Há quatro principais isoenzimas da CK, e os nomes são dados em função dos tecidos em que foram historicamente isoladas. Existem duas formas citosólicas (CKci): muscular (CK-MM) e cerebral (CK-BB), ambas formando homodímeros sob condições fisiológicas, podendo se apresentar como heterodímero CK-MB no coração. As isoformas mitocondriais (CK-mi) também são duas: a forma ubíqua (CK-Mil) e a sarcomérica (CK-Mis), as quais são expressas predominantemente no cérebro e músculo estriado, respectivamente (Wallimann et al.,1992). As isoenzimas mitocondriais e citosólica são sempre coexpressas em tecidos específicos, e essa interação é de fundamental importância para a manutenção da homeostasia energética e celular (da Silva et al., 2003).

Diferentes funções tem sido sugeridas para a comunicação entre as isoformas de CK-ci e CK-mi por PCr e Cr (Wallimann et al.,1994), levando à proposta do modelo do circuito da PCr/Cr (figura 4) (Rojo et al., 1991; Wallimann et al., 1992; Wyss et al., 1992).

Segundo esses autores, o sistema PCr serve como um tampão de energia flutuante, mantendo as concentrações de ATP e ADP estáveis e tamponando os H^+ gerados. Ele impede que haja uma queda acentuada nos níveis de ATP durante o trabalho celular, buscando manter a razão ATP/ADP elevada nos sítios subcelulares onde a CK está ligada a processos ou enzimas que consomem ATP, como por exemplo, as bombas de íons. Além disso, o sistema PCr também atua no tamponamento do

sistema de transporte de energia, já que a PCr serve como transportadora de energia, conectando sítios de liberação e captação a sítios de consumo de energia por meio das isoformas de CK compartmentalizadas.

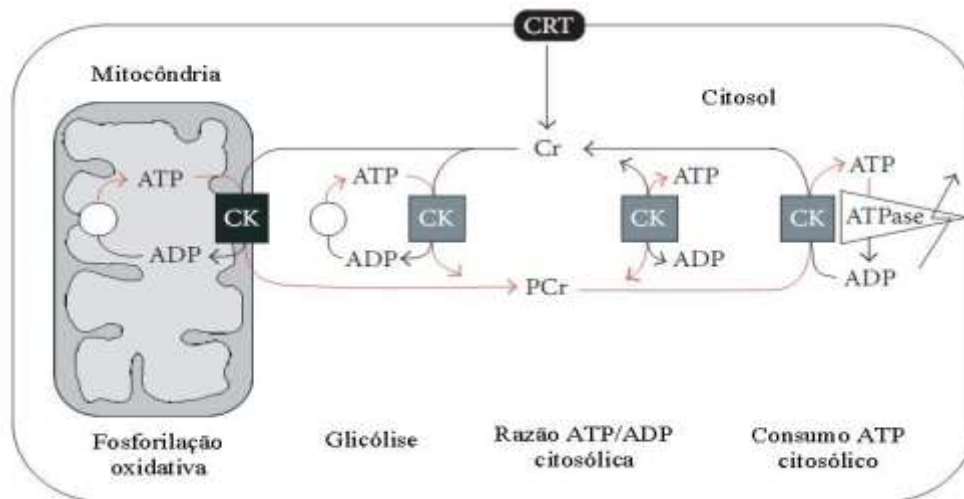


Figura 4. O modelo do circuito PCr, em tecidos de alta demanda energética (Adaptado de Bürklen et al., 2006).

1.3.1 Adenilatocinase

A adenilatoquinase (AK; EC 2.7.4.3) é a enzima que catalisa a reação de transferência de fosfatos de alta energia entre os nucleotídeos de adenina, ATP, ADP e AMP, conforme a reação: $2ADP \leftrightarrow ATP + AMP$ (Noma, 2005). Sendo assim, a AK é a enzima responsável pela interconversão de ATP, ADP e AMP.

Existem sete isoenzimas da AK (AK1-AK7), distribuídas em todos os compartimentos intracelulares, espaços intersticiais e líquidos corporais, com a finalidade de regular o metabolismo energético e a sinalização, proporcionando uma eficiente economia energética celular. (Dzeja e Terzic, 2009).

Foram identificadas três isoenzimas principais: AK1, AK2 e AK3. A AK1 existe no citosol das células do músculo esquelético, cérebro e nos eritrócitos. A AK2 está presente no citosol e, principalmente, no espaço intermembranas mitocondrial das

células do fígado, coração, rim e baço. Ambas AK1 e AK2 utilizam os nucleotídeos de adenina. A AK3 é encontrada, exclusivamente, na matriz mitocondrial e utiliza GTP para formação de GDP ou ADP, já que neste local ocorre a formação de GTP pelo ciclo do ácido cítrico. AK4 e AK5 estão localizadas principalmente na matriz mitocondrial e no citosol, respectivamente. AK5 é encontrada somente no cérebro. A AK6 está localizada no núcleo celular. Já a AK7 está relacionada com a motilidade celular e outros processos, é altamente expressa no epitélio brônquico e parece estar associada com o movimento ciliar (Dzeja e Terzic, 2009).

1.3.3 Piruvatocinase

A piruvatoquinase (PK; ATP: piruvato 2-O-fosfotransferase; EC 2.7.1.40) é uma das enzimas regulatórias da rota glicolítica e catalisa a transferência de um grupamento fosforil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o ADP formando piruvato e ATP, conforme a reação: $PEP + ADP \rightarrow ATP + \text{piruvato}$ (Valentini et al., 2000). A PK pode ser considerada uma enzima-chave para todo o metabolismo celular, não somente para a via glicolítica porque o produto da reação catalítica (piruvato) está envolvido em diversas rotas metabólicas (Mattevi et al., 1996).

São conhecidas quatro isoenzimas (L, R, M₁ e M₂) da PK expressas em diferentes tecidos nos mamíferos. Cada uma delas possui propriedades regulatórias e cinéticas distintas, refletindo a sua importância no suprimento das necessidades metabólicas de cada tecido (Jurica et al., 1998). Os genes L e M codificam as quatro isoenzimas em humanos. O gene L codifica a isozima L encontrada no fígado e R que está presente nos eritrócitos (Noguchi et al., 1987). Já o gene M codifica as isozimas M₁ e M₂ (Noguchi et al., 1986). M₁ está predominantemente presente no músculo esquelético e no cérebro, enquanto a M₂ é encontrada primariamente no tecido fetal,

células proliferativas e tumorais (Mazurek et al., 2005, Dombrauckas et al., 2005). Os tipos M₂, L e R apresentam regulação alostérica e são ativados heterotropicamente pela frutose-1,6-bisfosfato (FBP) (Jurica et al., 1998). Por outro lado, o tipo M₁ apresenta cinética hiperbólica e não exibe regulação alostérica (Mattevi et al., 1996).

1.4 Estresse Oxidativo

Estresse Oxidativo (EO) é um termo utilizado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis. Consiste numa alteração do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor do pró-oxidante (Halliwell, 1999; Halliwell 2006).

O EO pode ser resultante tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção exacerbada de substâncias pró-oxidantes, bem como da liberação de metais de transição que aceleram a formação de algumas espécies reativas ou então, da combinação destes fatores (Halliwell, 2006).

Estudos demonstram que o estresse oxidativo possa estar envolvido na fisiopatologia de diversas doenças, como as cardíacas, inflamatórias, câncer e doenças neurodegenerativas (Valko et al., 2007). Ultimamente, tem sido verificado que vários metabolitos acumulados em EIM, com grande comprometimento do SNC, induzem o estresse oxidativo em cérebro de ratos (Bridi et al., 2005; Feksa et al., 2008; Meska et al., 2011) e em seres humanos (Barschak et al., 2008 a,b; Sitta, et al., 2011).

1.4.1 Espécies Reativas

Espécies reativas (ER) de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são termos utilizados para denominar qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Este não pareamento faz com que a molécula ou

átomo tornem-se instáveis e muito reativos, sendo capazes de reagir com qualquer composto (Valko et al., 2007).

As ER (tabela 2) são produzidas constantemente durante processos metabólicos e atuam como mediadores de transferência de elétrons em várias reações bioquímicas. Sendo assim, elas desempenham funções relevantes no metabolismo, incluindo a comunicação intracelular, apoptose, defesa contra agentes infecciosos dentre outros (Valko et al., 2007; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Tabela 2. Algumas espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN).

	Radicais	Não radicais
ERO	Superóxido, $O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrogênio, H_2O_2
	Hidroxila, OH^{\bullet}	Oxigênio singlet, 1O_2
	Peroxila, RO_2^{\bullet}	Ácido hipocloroso, HOCl
	Hidroperoxila, HO_2^{\bullet}	Peroxinitrito, $ONOO^-$
		Ozônio, O_3
ERN	Óxido nítrico, NO^{\bullet}	Ácido nitroso, HNO_2
	Dióxido de nitrogênio, NO_2^{\bullet}	Peroxinitrito, $ONOO^-$
		Peroxinitrato, O_2NOO^-

Fonte: Adaptado de Halliwell e Gutteridge (2007)

Quando ocorre uma produção excessiva dessas ER ou uma remoção ineficiente, é gerado um estado pró-oxidante, favorecendo o dano oxidativo em estruturas celulares como os ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (Valko et al., 2007; Halliwell e Gutteridge, 2007). O radical OH^{\bullet} é o mais reativo a todos os componentes do DNA, reagindo com as bases púricas e pirimídicas. Os ácidos graxos poli-insaturados também são muito sensíveis a esse radical, que ataca principalmente os resíduos de fosfolípidos (Halliwell, 2000). ERO e ERN agem sobre resíduos de aminoácidos de proteínas, oxidando principalmente resíduos ricos em cisteína e metionina, podendo alterar a estrutura de proteínas, tornando-as inativas (Valko et al., 2007).

1.4.2 Defesas antioxidantes

Para evitar os efeitos nocivos das ER, o organismo possui mecanismos de defesas antioxidantes, que reduzem a formação de ER ou promovem sua inativação. Antioxidante, conforme Halliwell (2000), “é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”.

As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas e não enzimáticas. Dentre as defesas antioxidantes enzimáticas, podemos citar as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Vitaminas (ácido ascórbico e vitamina E, por exemplo) e o tripeptídeo glutathione (na sua forma reduzida, GSH) são consideradas defesas antioxidantes não enzimáticas.

1.4.2.1 Creatina

A creatina e a sua forma fosforilada, a fosfocreatina, são substâncias que estão envolvidas na manutenção da homeostase de energia celular na maioria dos tecidos, principalmente no músculo esquelético e cérebro. A Cr desempenha um papel central no fornecimento de energia por meio de uma reação catalisada pela creatinase, descrita anteriormente. Sob a forma de fosfocreatina, torna-se essencial para vários processos metabólicos, funcionando como uma reserva de energia (Schulze et al, 1997; Kolling e Wyse, 2010).

Além de ser utilizada como suplemento nutricional por atletas, principalmente, com o objetivo de manter os níveis de fosfatos de alta energia durante o exercício físico, a Cr tem sido eficaz também para prevenir a citotoxicidade causada por diferentes estressores oxidativos (Sestili et al., 2009). Estudos tem demonstrado que a Cr possui propriedades antioxidantes “*per se*” (Lawler et al., 2002; Sestili et al., 2006).

Embora o papel da Cr no sistema muscular seja bem reconhecido, existe uma evidência crescente de que ela também desempenha um papel importante no sistema nervoso central (Andres et al., 2008).

A Cr vem sendo considerada um agente neuroprotetor em modelos animais de doenças neurodegenerativas, como a doença de Huntington e Parkinson (Mathews et al., 1999; Ferrante et al., 2000; Beal, 2011). Este efeito neuroprotetor da Cr tem sido atribuído às suas propriedades antioxidantes, que podem resultar de diferentes mecanismos de ação: a eliminação de espécies de radicais livres e a melhora do status energético celular (Wyss e Schulze, 2002).

1.4.2.2 Piruvato

O piruvato (Pir) desempenha um papel chave no metabolismo intermediário, como um produto intermediário da glicólise e a fonte de acetil-CoA para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Pir é considerado um poderoso agente antioxidante e neuroprotetor (Giandomenico, 1997; Jagtap et al., 2003, Varma e Hegde, 2007), pois é capaz de oferecer, simultaneamente, uma resistência ao estresse oxidativo e ao insulto mitocondrial (Mazzio e Soliman, 2003).

Em virtude da sua capacidade de sequestrar ROS, o Pir tem sido estudado extensivamente como um agente citoprotetor. Ele é capaz de proteger as células de culturas contra os efeitos letais do H₂O₂ (Andrae et al., 1985), sendo uma provável defesa celular chave contra o estresse oxidativo, principalmente em células proliferativas (Brand, 1997; Brand e Hermfisse, 1997).

Estudos *in vitro* tem demonstrado que o Pir protege contra a morte celular mediada por N-metil-D-aspartato (NMDA) e zinco, provavelmente por prevenir a intensa diminuição energética em cultura de neurônios (Giandomenico et al., 1997).

Além disso, o piruvato evita o acúmulo de glutamato, o qual que é neurotóxico após uma pré-exposição dos neurônios ao NMDA (Maus, 1999).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando que a hiperleucinemia pode estar associada a lesões cerebrais cujos mecanismos patogênicos ainda não foram completamente elucidados; que não há informações sobre os efeitos da hiperleucinemia materna; que o uso de substâncias antioxidantes pode apresentar efeitos neuroprotetores, o principal objetivo deste projeto será determinar os efeitos da hiperleucinemia materna sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo e da rede de fosforiltransferência na prole de ratas Wistar tornadas hiperleucêmicas e uma possível neuroproteção da associação de piruvato com creatina.

2.1 Objetivos específicos

1 - Avaliar os efeitos da administração de leucina na concentração de 4,8 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal a ratas Wistar durante o período de gestação e de lactação em córtex cerebral e hipocampo da prole aos 21 dias de vida, sobre:

- Parâmetros de estresse oxidativo:
 - Atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx);
 - Conteúdo de glutathione reduzida (GSH)
 - Oxidação da diclorofluoresceína (DCFH);
 - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS);
 - Conteúdo de carbonilas em proteínas;
 - Conteúdo de sulfidrilas.
- Parâmetros da rede de fosforiltransferência:
 - Atividade da enzima creatinacinaase nas frações citosólica e mitocondrial;
 - Atividade da enzima adenilatocinase;
 - Atividade da enzima piruvatocinase.

2 - Avaliar o possível efeito neuroprotetor da coadministração de duas substâncias energéticas e antioxidantes – creatina, na dose de 0,4 mg/ g de peso corporal, e piruvato, na dose de 0,2 mg/ g de peso corporal a ratas Wistar durante o período de gestação e de lactação em homogeneizado de córtex cerebral e de hipocampo da prole aos 21 dias de vida, sobre os mesmos parâmetros citados anteriormente.

PARTE II

Metodologia e resultados

3. METODOLOGIA E RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho e a metodologia empregada serão apresentados na sequência, sob a forma de um artigo científico publicado na revista *Neurochemical Research*.

PARTE III

Discussão, Conclusões, Perspectivas e Anexos

4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Concentrações elevadas de AACR e seus CACR no sangue, no líquor e na urina são características bioquímicas da DXB, devido à deficiência na atividade do complexo enzimático da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada. Os pacientes apresentam diversos sintomas, incluindo crises de descompensação metabólica, convulsões e atraso no desenvolvimento psicomotor e deficiência mental (Chuang e Shih, 2001). O tratamento é principalmente dietético (Strauss et al, 2010) e de difícil aderência pelos pacientes, principalmente adolescentes e mulheres (Kemper et al, 2010).

Considerando que um grande número de pacientes com EIM estão alcançando a idade adulta em condições reprodutivas (Radomyska, 2003), neste trabalho investigamos o efeito da sobrecarga de L-leucina a ratas Wistar durante a gravidez e a lactação sobre a prole e o possível efeito preventivo da coadministração de creatina e piruvato. Deve-se salientar que nosso modelo não reproduz de maneira fidedigna a doença, pois não temos, neste caso, a inibição da enzima como acontece na DXB.

Inicialmente, foi avaliado se a administração de leucina poderia provocar alterações em alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex e hipocampo da prole aos 21 dias de vida.

Neste trabalho, foi observado um aumento da geração de ER, através do aumento da oxidação do DCFH em córtex cerebral dos filhotes das ratas que receberam leucina. Além disso, os níveis de TBA-RS também estavam aumentados, sugerindo que a leucina provoca lipoperoxidação. A coadministração de creatina e piruvato impediu a lipoperoxidação induzida pela administração de leucina somente no córtex cerebral.

O conteúdo de carbonilas e de grupos tióis são medidas de dano oxidativo às proteínas (Reznick e Packer, 1994; Stadtman e Levine, 2003). Essas medidas, no córtex cerebral dos filhotes não foram alteradas pela administração de leucina, sugerindo que,

diferentemente dos lipídeos, as proteínas não foram afetadas pelo aumento das ER. No entanto, a administração de leucina reduziu os níveis de GSH sugerindo que este potente antioxidante endógeno foi utilizado para combater as ER, protegendo as proteínas dos danos. A prevenção da diminuição de GSH pela coadministração de creatina e piruvato reforça esta interpretação. No hipocampo, o conteúdo total de sulfidrilas diminuiu pela administração de leucina e a associação de creatina e piruvato preveniu este efeito, sugerindo que as defesas antioxidantes no hipocampo foram menos eficazes do que no córtex cerebral.

Dentre os antioxidantes, as enzimas catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) apresentam um importante papel na remoção das ER. A SOD catalisa a reação de dismutação de dois radicais superóxidos a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e é chamada de defesa primária contra o estresse oxidativo, visto que o superóxido é uma molécula bastante reativa, sendo um forte iniciador de reações oxidativas em cadeia (Marklund, 1985). O H_2O_2 formado é menos reativo que o superóxido e, posteriormente, pode ser removido por outras enzimas como a CAT e a GPx.

A CAT catalisa a decomposição direta do H_2O_2 em duas moléculas de água e uma de oxigênio molecular e é extremamente sensível ao ataque de ER (Aebi, 1984). Já a GPx catalisa a reação de degradação de vários peróxidos, principalmente peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos. Para isso, ela utiliza o grupamento sulfidril da glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG).

Neste trabalho pode-se observar que as enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD tiveram suas atividades significativamente reduzidas no córtex cerebral da prole das ratas que receberam leucina. Já no hipocampo, somente a GPx e SOD tiveram atividades diminuídas.

A inibição das três enzimas sugere a formação de superóxido e peróxidos em função do aumento da oxidação do DCFH, TBARS, GSH e conteúdo de sulfidrilas totais. A coadministração de creatina e piruvato preveniu a inibição da atividade da SOD e da CAT, mas não da GPx no córtex cerebral. No entanto essa associação não impediu a inibição dessas enzimas no hipocampo.

Em resumo, a administração de leucina induziu a formação de ER, que promovem o estresse oxidativo, e a diminuição das defesas antioxidantes. A coadministração de creatina e piruvato preveniu parcialmente os efeitos provocados pela administração de leucina a ratas Wistar sobre parâmetros de estresse oxidativo na prole.

Com base nesses resultados, sabendo que enzimas que contém grupos tióis, como a PK, CK e AK são sensíveis ao estresse oxidativo (Gilbert, 1984) e que elas participam da rede de fosforiltransferência (Saks et al., 2006), foram avaliadas as atividades dessas enzimas em córtex e hipocampo da prole aos 21 dias de vida.

A administração de leucina inibiu a atividade da CK citosólica e mitocondrial nos dois tecidos estudados, enquanto que a atividade da AK aumentou nesses mesmos tecidos. A atividade da PK aumentou no córtex cerebral, mas não no hipocampo. Estes resultados já eram esperados, visto que a diminuição na atividade de uma ou mais enzimas da rede de fosforiltransferência pode promover o aumento na atividade de uma ou mais enzimas, na tentativa de preservar a homeostase energética celular (Dzeja e Terzic, 2003; Pucar et al., 2004; Alekseev et al., 2012). A coadministração de creatina e piruvato não preveniu as alterações nas atividades enzimáticas. É possível que a prevenção parcial do estresse oxidativo pela coadministração de creatina e piruvato não tenha sido suficiente para prevenir as alterações causadas pela administração de leucina na rede de fosforiltransferência.

A rede de fosforiltransferência contribui para que haja uma eficiente comunicação energética intracelular, mantendo o equilíbrio entre o consumo e a produção de ATP, preservando as células em condições de estresse metabólico (Dzeja et al., 2009; Alekseev et al., 2012). Portanto, é possível levantar a hipótese de que o estresse oxidativo associado à deficiência da rede de fosforiltransferência pode prejudicar o funcionamento cerebral, alterando a homeostase energética.

Neste estudo, foi demonstrado pela primeira vez que a sobrecarga de leucina materna altera alguns importantes parâmetros de estresse oxidativo e da rede de fosforiltransferência no córtex cerebral e no hipocampo da prole. Além disso, a coadministração de creatina e piruvato foi capaz de impedir parcialmente os efeitos nocivos da leucina em alguns parâmetros de estresse oxidativo. No entanto, a creatina e piruvato não foram capazes de prevenir os danos causados pela leucina em enzimas relacionadas à rede de fosforiltransferência.

Se estas alterações também ocorrerem em crianças nascidas de mães DXB, será importante que as mulheres com DXB mantenham os níveis de leucina baixos durante a gravidez e lactação para prevenir danos cerebrais nos seus filhos, durante as fases de desenvolvimento intrauterino e lactação. A coadministração de creatina e piruvato parece ser insuficiente para prevenir totalmente os danos cerebrais observados nos filhotes.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir:

- 1-** parâmetros de estresse oxidativo em córtex e hipocampo da prole, aos 21 dias de vida, de ratas que receberam sobrecarga de leucina encontram-se alterados;
- 2-** a sobrecarga de leucina nas mães alterou a rede de fosforiltransferência em córtex e hipocampo da prole aos 21 dias de vida;
- 3-** a coadministração de creatina e piruvato preveniu parcialmente as alterações nos parâmetros de estresse oxidativo observadas pela sobrecarga de leucina;
- 4-** a coadministração de creatina e piruvato não foi eficiente para prevenir as alterações encontradas na rede de fosforiltransferência.

6. PERSPECTIVAS

Avaliar o efeito do processo inflamatório em ratas grávidas e lactantes sobre o efeito da leucina no córtex e hipocampo da prole, avaliando parâmetros de metabolismo energético, estresse oxidativo, comportamentais e de desenvolvimento físico e neuromotor.

7. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

Anderson D. (1996) Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res.* 350(1):103-108.

Andrade, RB.(2012) Efeito in vitro e in vivo, da tirosina sobre algumas enzimas do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre.

Andrae U, Singh J, Ziegler-Skylakakis K (1985) Pyruvate and related α -ketoacids protect mammalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Toxicol Lett.* 28:93–98.

Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR. 2008 Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 76:329-343.

Barschak AG, Marchesan C, Sitta A, Deon M, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. (2008 a) Maple syrup urine disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles. *Clin Biochem.* 41(4-5):317-324.

Barschak AG, Sitta A, Deon M, Barden AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. (2008 b) Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab Brain Dis.* 23(1):71-80.

Brand K. (1997) Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield. *J Bioenerg Biomembr.* 29:355–364.

Brand K A, Hermfisse U (1997) Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J.* 11:388–395.

Bremer HJ, Duran M, Kamerling JP, Przyrembel H, Wadman SK (1981) Disturbances of amino acids metabolism: Clinical chemistry and diagnosis. Munchen: urban & Swarzenberg.

Bürklen TS, Schlattner U, Homayouni R, Gough K, Rak M, Szeghalmi A, Wallimann T. (2006) The creatine kinase/creatine connection to Alzheimer's disease: CK-inactivation, APP-CK complexes and focal creatine deposits. *J Biomed Biotechnol.* 2006:1-11.

Childs B, Valle D, Jimenez-Sanchez G. (2001) The inborn error and biochemical individuality. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (eds): *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8th ed., McGraw-Hill, New York, 155-166.

Couce Pico ML, Castiñeiras Ramos DE, Bóveda Fontán MD, Iglesias Rodríguez AJ, Cocho de Juan JA, Fraga Bermúdez JM. (2007) Advances in the diagnosis and treatment of maple syrup urine disease: experience in Galicia (Spain). *An Pediatr (Barc).* 67(4):337-343.

da Silva CG, Bueno AR, Schuck PF, Leipnitz G, Ribeiro CA, Wannmacher CM, Wyse AT, Wajner M. (2003) D-2-hydroxyglutaric acid inhibits creatine kinase activity from cardiac and skeletal muscle of young rats. *Eur J Clin Invest.* 33(10):840-847.

Dancis J, Levitz M, Miller S, Westall RG. (1959) Maple syrup urine disease. *Br. Med. J.* 1:91-93.

Dombrauckas JD, Santarsiero BD, Mesecar AD. (2005) Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. *Biochemistry.* 44:9417-9429.

Gilbert HF. (1984) Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods Enzymol* 107:330-351.

Halliwell B. (2000) Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr.* 72(5):1082-1087.

Halliwell B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141(2):312-322.

Hawkins RA, O'Kane, RL, Simpson IA, Viña JR. (2006) Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr Jan*;136 (1 Suppl):218S-226S.

Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, Shi W, Nowak T, Stoddard BL. (1998) The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure.* 6:195-210.

Kemper AR, Brewer CA, Singh RH.(2010). Perspectives on dietary adherence among women with inborn errors of metabolism. *J Am Diet Assoc.* 110:247-252.

Kolling J, Wyse ATS. 2010 Creatine prevents the inhibition of energy metabolism and lipid peroxidation in rats subjected to GAA administration, *Metab Brain Dis* 25:331-338.

Mattevi A, Bolognesi M, Valentini G. (1996) The allosteric regulation of pyruvate kinase. *Federation of European Biochemical Societies Letters, FEBS Lett.* 389(1):15-19.

Maus M, Marin P, Israël M, Glowinski J, Prémont J (1999) Pyruvate and lactate protect striatal neurons against n-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 11(9):3215-3224.

Mazariegos GV, Morton DH, Sindhi R, Soltys K, Nayyar N, Bond G, Shellmer D, Shneider B, Vockley J, Strauss KA (2012) Liver transplantation for classical maple syrup urine disease: long-term follow-up in 37 patients and comparative United Network for Organ Sharing experience. *J Pediatr.*160(1):116-121.

Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. (2005) Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol.* 15:300-308.

- Noguchi T, Yamada K, Inoue H, Matsuda T, Tanaka T. (1987) The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. *J Biol Chem.* 262:14366-14371.
- Noma T. (2005) Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena. *J Med Invest.* 52(3-4):127-136.
- Peinemann F, Danner, DJ. (1994) Maple syrup urine disease 1954-1993. *J Inherit Metab Dis* 17:3-15.
- Quental S, Vilarinho L, Martins E, Teles EL, Rodrigues E, Diogo L, Garcia P, Eusébio F, Gaspar A, Sequeira S, Amorim A, Prata MJ. (2010) Incidence of maple syrup urine disease in Portugal. *Mol Genet Metab.* 100(4):385-387.
- Radomyska B. (2003) Pregnancy and inborn errors of metabolism. *Ginekol Pol* 74:479-485.
- Rajo M, Hovius R, Demel R, Wallimann T, Eppenberger HM, Nicolay K. (1991) Interaction of mitochondrial creatine kinase with model membranes. A monolayer study. *FEBS Lett.* 281(1-2):123-129.
- Saks VA, Ventura-Clapier R, Aliev MK. (1996) Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim Biophys Acta.* 1274(3):81-88.
- Sanderson S, Green A, Preece MA, Burton H. (2006) The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. *Arch Dis Child.* 91(11):896-899.
- Schadewaldt PL, Wendel U. (1997) Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *Eur J pediatr* 156:62-66.
- Schulze A, Hess T, Wevers R, Mayatepek E, Bachert P, Marecau B, Knopp MV, De Deyn PP, Bremer HJ, Rating D. 1997 Creatine deficiency: diagnostic tools for a new inborn error of metabolism. *J Pediatr* 131, 626-631.
- Schwartz IVD, Neto EC, Giugliani R 2000. Considerações sobre o momento da colheita da triagem neonatal. *Jornal de Pediatria* 76 (6):474-475.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (2001) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8th ed., McGraw-Hill, New York.
- Sestili P, Barbieri E, Martinelli C, Battistelli M, Guescini M, Vallorani L, Casadei L, D'Emilio A, Falcieri E, Piccoli G, Agostini D, Annibalini G, Paolillo M., Gioacchini AM, Stocchi V. 2009 Creatine supplementation prevents the inhibition of myogenic differentiation in oxidatively injured C2C12 murine myoblasts. *Mol. Nutr. Food Res.* 53:1187-1204.
- Simon E, Fingerhut R, Baukötter J, Konstantopoulou V, Wendel U. (2006) Maple Syrup Urine Disease: favorable effect of early diagnosis by newborn screening on the neonatal course of the disease. *J Inherit Metab Disease.* 29 (4):532-537.

Sitta A, Vanzin CS, Biancini GB, Manfredini V, de Oliveira AB, Wayhs CA, Ribas GO, Giugliani L, Schwartz IV, Bohrer D, Garcia SC, Wajner M, Vargas CR. (2011) Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol.* 31(3):429-436.

Souza CFM, Schwartz IV, Giugliani R (2002) Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciências & Saúde Coletiva* 7 (1):129-137.

Strauss KA, Puffenberger EG, Morton T. (1993) Maple Syrup Urine Disease. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Valentini G, Chiarelli LR, Fortin R, Speranza ML, Galizzi A, Mattevi A. (2000) The allosteric regulation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 275:18145-18152.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84.

Vargas JE, Levy HL. (1998) Maternal and fetal considerations in metabolic disorders. *J Jap Soc Mass-Screening* 8:29-45.

Varma, SD, Hegde, KR.(2007) Lens thiol depletion by peroxynitrite. Protective effect of pyruvate. *Mol. Cell Biochem.* 298:199-204.

Wallimann T, Dolder M, Schlattner U, Eder M, Hornemann T, O'Gorman E, Rück A, Brdiczka D (1998) Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. *Biofactors* 8:229-234.

Wallimann T. (1994) Bioenergetics. Dissecting the role of creatine kinase. *Curr Biol.* 4(1):42-46.

Walter JH. (2000) Inborn errors of metabolism and pregnancy. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23 (3):229-236.

Westall RG, Dancis J, Miller S (1957) Maple syrup urine disease. *Am J Dis Child* 94:571-572.

Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T. (1992) Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1102(2):119-166.

Wyss M, Schulze A. (2002) Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience* 112:243-260.

8. ANEXOS

8.1 Lista de figuras

Figura 1. Estrutura química dos aminoácidos de cadeia ramificada.	7
Figura 2. Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada.	8
Figura 3. Esquema das principais enzimas envolvidas na rede de fosforiltransferência em tecidos com alta demanda energética.	16
Figura 4. O modelo do circuito PCr, em tecidos de alta demanda energética .	18

8.2 Lista de tabelas

Tabela 1. Classificação e aspectos clínicos da DXB.	10
Tabela 2. Algumas espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN).	21