BIBLIOTECA

INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Vanessa Eid da Silva Cardoso

**ESTRESSE OXIDATIVO EM PORFIRIA HEPÁTICA
EXPERIMENTAL DISPARADA POR SUCCINILACETONA -
UM INIBIDOR DA ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO
DESIDRATASE**

São Paulo

Data de Depósito da SPG:

21/10/2009

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

23609

Vanessa Eid da Silva Cardoso

**ESTRESSE OXIDATIVO EM PORFIRIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL
DISPARADA POR SUCCINILACETONA - UM INIBIDOR DA ÁCIDO 5-
AMINOLEVULÍNICO DESIDRATASE**

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Bioquímica).

Orientador: Prof. Etelvino José Henriques Bechara

10
544.1921
C268e

São Paulo
2009

DEDALUS - ACERVO - CQ

30100016715

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cardoso, Vanessa Eid da Silva

C268e Estresse oxidativo em porfiria hepática experimental disparada
por succinilacetona – um inibidor da ácido 5-aminolevulínico
desidratase / Vanessa Eid da Silva Cardoso. -- São Paulo, 2009.
177p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Bechara, Etelvino José Henriques

1. Espécies reativas de oxigênio no ser vivo : Bioquímica 2.
Estresse oxidativo I. T. II. Bechara, Etelvino José Henriques,
orientador.

574.1921 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**“Estresse oxidativo em porfiria hepática experimental
disparada por succinilacetona - um inibidor da ácido 5
aminolevulínico desidratase”**

VANESSA EID DA SILVA CARDOSO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários
obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. ETELVINO JOSÉ HENRIQUES BECHARA
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. ANA MARIA DA COSTA FERREIRA
IQ - USP

Profa. Dra. ALÍCIA JULIANA KOWALTOWSKI
IQ - USP

Prof. Dr. PAULO EURIPEDES MARCHIORI
FM – USP

Profa. Dra. JANICE ONUKI
Butantan

SÃO PAULO
28 DE JANEIRO DE 2010

Vanessa Eid da Silva Cardoso

Estresse oxidativo em porfiria hepática experimental disparada por succinilacetona - um inibidor da ácido 5-aminolevulínico desidratase

**Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Bioquímica).**

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

A Deus, pelo amor incondicional...

Ao Clóvis, pelo amor, pelo apoio, e pelo respeito ao meu tempo em busca do conhecimento.

Aos meus pais, Gildasio e Yvonne, e à Juliana, minha irmã, por enriquecerem minha vida.

Aos meus amigos e familiares, pelo amor, dedicação e apoio.

A vocês dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o Prof. Etelvino José Henriques Bechara, pelo exemplo pessoal e profissional, pelo encorajamento, pela compreensão, e pelo respeito à minha ignorância. A você, meu eterno reconhecimento.

Ao meu co-orientador, o Prof. Dr. Fernando Dutra, da Universidade Cruzeiro do Sul, pela amizade e competência compartilhadas.

À Profa. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela pronta colaboração e pela excelência do seu trabalho. À Sônia Gaglioti, pelo apoio no preparo e na análise do material histológico e da imunohistoquímica.

À Dra. Atecla Nunciata Lopes Alves, da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da USP, e ao Dr. Hermes Vieira Barbeiro, da Faculdade de Medicina da USP, pela colaboração e competência compartilhadas.

Aos amigos do laboratório, em especial ao Adriano, à Chrislaine e ao Nilson, pela convivência, carinho, companheirismo, respeito e compreensão. À Chris, meu eterno obrigado pelo apoio imprescindível na fase final deste trabalho. À Adriana e à Doris, pela eficiência e dedicação com que desempenham seu trabalho.

À Universidade de São Paulo (USP) e ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, por me oferecerem toda a estrutura para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roger Springett, da Dartmouth Medical School (DMC), Hanover, NH, USA, pela excelência científica compartilhada.

À Michelle Abajian (DMC), pelo carinho e pelo apoio técnico com a cirurgia dos animais.

À Eliana e ao Carlos Penatti, e à Mirela Dias, pelo carinho durante minha estada em Hanover. Agradeço ainda ao Carlos por viabilizar nosso contato com o Prof. Roger.

À Kelly Polido Kaneshiro Olympio, pela amizade sincera e fiel, e pelo estímulo fundamental para a conclusão deste trabalho.

À Profa. Marília Buzalaf, da Faculdade de Odontologia de Bauru da USP, por me impulsionar a construir este caminho. Obrigada pela amizade e pela complementariedade científica.

À Priscilla e ao Alexandre Hashimoto, pela amizade, e por se fazerem a família do Clóvis nos momentos em que eu não pude estar presente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo reconhecimento da importância deste projeto e pelos incentivos concedidos nas modalidades Bolsa de Doutorado / Bolsa de Estágio no Exterior (Proc. No. 04/09991-0) e Auxílio à Pesquisa Temático (Proc. No. 01/09641-1 e Proc. No. 06/56530-4).

Ao CNPq, ao Projeto do Milênio Redoxoma e ao INCT Redoxoma, pelos incentivos concedidos ao projeto.

À DentsCare Ltda. (Joinville, SC), pela oportunidade profissional, ajudando-me a traduzir conhecimentos teóricos em práticos. Obrigada aos amigos do Departamento de P&D pelo carinho, apoio e incentivo.

Vocês fazem parte desta conquista!

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima”. (Louis Pasteur)

RESUMO

Cardoso, V.E.S. **Estresse oxidativo em porfiria hepática experimental disparada por succinilacetona - um inibidor da ácido 5-aminolevulínico desidratase**. 2009. 177p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Para otimizar um modelo experimental para o estudo do desbalanço redox em porfirias relacionadas ao acúmulo de ácido 5-aminolevulínico-(ALA), via inibição da ALA desidratase-(ALA-D), ratos foram tratados com o éster metílico de succinilacetona-(SAME), um catabólito da tirosina que inibe fortemente a ALA-D, mimetizando o estado metabólico observado nos portadores de porfirias e tirosinemias. Estabeleceram-se modelos de tratamento agudo por 36 e 18 h. No primeiro, os animais receberam 3 injeções de SAME (10, 40 ou 80 mg/kg, grupos All-IV). No segundo, os animais receberam 3 injeções de 40 mg/kg de SAME, ALA ou éster metílico de ALA (grupos BII-IV), ALA:SAME (30:10 mg/kg, grupo BV), ou 10 mg/kg SAME (grupo BVI). Paralelamente, avaliou-se se os sintomas neurológicos característicos das porfirias decorriam de danos oxidativos mitocondriais. Para isso, aplicou-se uma tecnologia óptica para medidas da difusão da depressão cortical que determinou a oxigenação e o estado redox do cit c em mitocôndrias do córtex cerebral de ratos submetidos ao tratamento crônico com ALA (40 mg/kg), SAME (10 e 40 mg/kg) e ALA:SAME (30:10 mg/kg), a cada 48 h, durante 30 dias. **Tratamento agudo/36 h:** Os níveis de ALA no plasma, fígado, cérebro e urina e o *clearance* renal do ALA aumentaram nos grupos tratados. A atividade de ALA-D e a coproporfirina urinária reduziram. A marcação para proteínas carboniladas, ferro e ferritina aumentou no fígado e cérebro dos grupos tratados, especialmente no All.

Os níveis de malondialdeído hepático aumentaram no grupo AIV. A razão GSH/GSH+GSSG e a atividade de GPx cerebrais aumentaram nos grupos AIV e AIII, respectivamente. Consistentemente com estes dados indicando um desbalanço oxidativo induzido pelo SAME, alterações mitocondriais e citosólicas ultraestruturais foram reveladas, especialmente no fígado.

Tratamento agudo/18 h: Os níveis de ALA plasmáticos aumentaram nos grupos tratados, exceto em BIV. O grupo BII mostrou aumento dos níveis hepáticos de ALA. Interessantemente, a inibição da atividade de ALA-D não foi evidenciada. O conteúdo de ferro plasmático aumentou no grupo BII. Para os grupos tratados com 10 e 40 mg SAME/kg, a atividade de SOD hepática reduziu ~50% com a extensão do tratamento de 18 para 36 h, sugerindo que este último é mais efetivo em promover danos oxidativos induzidos pelo ALA.

Tratamento crônico/30 dias: Embora nenhuma alteração tenha sido evidenciada no estado redox dos animais tratados, o tratamento com ALA reduziu o fluxo sanguíneo cerebral (CBF) e o consumo de oxigênio-(CMRO₂), sugerindo uma vasoconstrição mediada pelo ALA, efeito este confirmado por ensaios de reatividade vascular conduzidos em anéis de aorta de ratos incubados com ALA. O tratamento com ALA:SAME restaurou os níveis de CBF e CMRO₂. Interessantemente, a disponibilidade do radical superóxido-(O₂^{•-}) estava reduzida nos anéis de aorta incubados com ALA. Juntos, estes dados: a) validam o modelo de tratamento agudo/36 h para o estudo bioquímico e dos possíveis efeitos fisiológicos induzidos pelo ALA, e b) sugerem que as alterações mediadas pelo ALA exógeno levam à vasoconstrição.

Palavras-chave: ácido 5-aminolevulínico, succinilacetona, porfiria aguda intermitente, tirosinemia hereditária tipo 1, desbalanço redox, danos oxidativos mitocondriais.

ABSTRACT

Cardoso, V.E.S. **Oxidative stress in experimental hepatic porphyria triggered by succinylacetone – an inhibitor of 5-aminolevulinic acid dehydratase**. 2009. 177p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

To optimize an experimental model for studying redox imbalance in porphyrias related to 5-aminolevulinic acid (ALA) accumulation through the inhibition of ALA dehydratase (ALA-D), rats were treated with methyl ester of succinylacetone (SAME), a tyrosine catabolite that strongly inhibits ALA-D, what mimics the metabolic state observed in patients suffering from porphyrias and tyrosinemias. Models of acute treatment were established during 36 and 18 h. In the first model, animals received 3 injections of SAME (10, 40 or 80 mg/kg, groups AII-IV). In the second model, animals received 3 injections of 40 mg/kg SAME, ALA or methyl ester of ALA (groups BII-IV), ALA:SAME (30:10 mg/kg, group BV), or 10 mg/kg SAME (group BVI). Concomitantly, we evaluated if the neurologic symptoms characteristics of porphyrias were a consequence of the oxidative mitochondrial impairment. For this, an optical technology for the measurement of cortical spreading depression was applied. This technology determined the cerebral oxygenation and the redox state of cit c in mitochondria of the cerebral cortex of rats submitted to a chronic treatment with ALA (40 mg/kg), SAME (10 and 40 mg/kg) and ALA:SAME (30:10 mg/kg), alternate days, during 30 days. **Acute treatment/36 h:** ALA levels in plasma, liver and urine and clearance of renal ALA increased in treated groups. ALA-D activities and urinary coproporphyrin were found to be decreased. Liver and brain proteins carbonyl, iron and ferritin were higher in the liver of treated groups, especially in AII. Liver

malondialdehyde levels were higher in group AIV. Cerebral GSH/GSH+GSSG ratio and GPx activities increased in groups AIV and AIII, respectively. Consistently with these data indicating SAME-induced oxidative imbalance, mitochondrial and cytosolic ultrastructural changes were revealed, especially in the liver. **Acute treatment/18 h:** Plasma ALA levels increased in all treated groups but BIV. Group BII showed increased hepatic ALA levels. Interestingly, inhibition in ALA-D activities was not evidenced. Plasma iron content increased in group BII. For the groups treated with 10 and 40 mg SAME/kg, liver SOD activities reduced ~50% by extending the treatment from 18 to 36 h, suggesting that the latter is more effective in ALA-induced oxidative damage. **Chronic treatment /30 days:** Despite no changes in the redox state of treated animals were observed, the treatment with ALA reduced the cerebral blood flow (CBF) and the consumption of oxygen (CMRO₂), suggesting a vasoconstriction mediated by ALA. This effect was confirmed by vascular reactivity assay performed in aortic rings of rats incubated with ALA. The treatment with ALA:SAME recovered the CBF and CMRO₂ levels. Interestingly, the availability of superoxide radical (O₂^{•-}) was reduced in the aortic rings incubated with ALA. Altogether, these data *a*)validate the model of acute treatment/36 h for studying biochemical and possibly physiological effects induced by ALA, and *b*)suggest that the changes mediated by exogenous ALA lead to vasoconstriction.

Keywords: 5-aminolevulinic acid, succinylacetone, intermittent acute porphyria, hereditary tyrosinemia type 1, redox imbalance, oxidative mitochondrial damage.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$^1\Delta_g \text{O}_2$: oxigênio no estado singlete

ALA $^\bullet$: radical enoil de ALA

ALA: ácido 5-aminolevulínico

ALA-D: ácido 5-aminolevulínico desidratase

ALAME: éster metílico de ALA

ALA-S: ácido 5-aminolevulínico sintetase

CBF: fluxo sanguíneo cerebral

CDR: curvas de dose resposta

cit c: citocromo c

CMRO $_2$: consumo de oxigênio

CO: monóxido de carbono

COPRO: coproporfirina

CP: coproporfinogênio

CPO: coproporfinogênio oxidase

CuZnSOD: superóxido dismutase cobre-zinco

DDC: difusão da depressão cortical

DOVA: ácido 4,5-dioxovalérico

DTT: ditionitrosol

FAH: fumarilacetoacetato hidrolase

FCS: fluido cerebrospinal

GABA: ácido γ -aminobutírico

GPx: glutathione peroxidase

GSH/GSH+GSSG: razão glutathione reduzida/glutathione total

GSH: glutathione reduzida

H $_2$ O $_2$: peróxido de hidrogênio

HO: heme oxygenase

HO $^\bullet$: radical hidroxila

MDA: malondialdeído

MnSOD: superóxido dismutase manganês

MTP: transição da permeabilidade mitocondrial

mRNA: RNA mensageiro

NH_4^+ : íon amônia

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

$\text{O}_2^{\bullet-}$: ânion superóxido

PAI: porfiria aguda intermitente

PBG: porfobilinogênio

PBG-D: porfobilinogênio desaminase

PDT: terapia fotodinâmica

PEPT2: transporte ativo específico de peptídeos

PP-IX: protoporfirina IX

PPO: protoporfirinogênio oxidase

PrP: protoporfirinogênio

PT: triptofano pirrolase hepática

ROS: espécies reativas de oxigênio

SA: succinilacetona

SAME: éster metílico de succinilacetona

SDS: espectroscopia de domínio espectral

SmcO₂: saturação média de hemoglobina

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

TH1: tirosinemia hereditária tipo 1

URO: uroporfirinogênio

URO-D: uroporfirinogênio descarboxilase

URO-S: uroporfirinogênio sintetase

SÚMULA

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Metabolismo do heme e porfirias.....	19
1.2. Tirosinemia hereditária tipo 1 (TH1) no contexto das porfirias.....	27
1.3. Porfirias e efeitos pró-oxidantes do ácido 5-aminolevulínico (ALA).....	34
1.4. Base neurogênica das manifestações clínicas das porfirias.....	40
1.4.1 O transporte de ALA no SNC.....	42
1.4.2. ALA e receptores gabaérgicos.....	43
1.4.3. Efeitos do ALA na estrutura e na atividade mitocondrial.....	45
1.4.4. Espectroscopia de domínio espectral.....	46
2. OBJETIVOS.....	50
3. MATERIAL e MÉTODOS.....	52
3.1. Modelo de estudo de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, baseado na administração de SAME- Tratamento agudo por 36 e 18 h.....	52
3.1.1. Protocolo de estudo.....	52
3.1.1.1. Tratamento agudo por 36 h.....	53
3.1.1.2. Tratamento agudo por 18 h.....	54
3.1.2. Preparação da solução de SAME.....	55

3.1.3. Preparação das soluções de SA, ALA e ALAME.....	56
3.1.4. Determinação de ALA.....	56
3.1.5. Determinação da atividade de ALA-D.....	58
3.1.6. Determinação de GSH e GSSG.....	59
3.1.7. Peroxidação lipídica – determinação de MDA.....	60
3.1.8. Carbonil proteínas.....	61
3.1.9. Determinação de porfirinas na urina.....	62
3.1.10. Determinação de creatinina.....	64
3.1.11. Determinação do clearance renal do ALA.....	65
3.1.12. Determinação de ferro livre não hemínico.....	65
3.1.13. Análise de ferro sérico.....	66
3.1.14. Análise da atividade de SOD.....	67
3.1.15. Determinação da atividade da GPx.....	68
3.1.16. Determinação de proteína.....	69
3.1.17. Análise histológica.....	70
3.1.17.1. Análise por microscopia eletrônica de transmissão.....	70
3.1.17.2. Análise histoquímica e imunohistoquímica por microscopia de luz: marcação para ferro, ferritina e proteínas carboniladas.....	71
3.2. Mecanismos de danos neurológicos induzidos a ratos por SAME e/ou ALA – Tratamento crônico por 30 dias.....	73
3.2.1. Protocolo de estudo.....	73
3.2.2. Análises pelo sistema SDS.....	74
3.2.3. Ensaio de reatividade vascular da aorta.....	76

3.2.4. Quantificação de superóxido.....	76
3.3. Análise estatística.....	77
4. RESULTADOS.....	79
4.1. Modelo de estudo de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, baseado na administração de SAME – Tratamento agudo por 36 h....	79
4.1.1. Mensuração dos precursores do heme e da atividade da ALA-D.....	79
4.1.2. Mensuração dos parâmetros de desbalanço redox.....	85
4.1.3. Ensaios histoquímicos e imunohistoquímicos.....	89
4.1.4. Análise ultraestrutural.....	90
4.2. Modelo de estudo de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, baseado na administração de SAME – Tratamento agudo por 18 h..	101
4.2.1. Mensuração de ALA e da atividade da ALA-D.....	101
4.2.2. Mensuração dos parâmetros de desbalanço redox.....	103
4.3. Mecanismos de danos neurológicos induzidos a ratos por SAME e/ou ALA – Tratamento crônico por 30 dias.....	105
4.3.1. Alterações nos parâmetros sistêmicos e vasculares no córtex parietal durante a anoxia e a reoxidação.....	105
4.3.2. Alterações nos parâmetros sistêmicos e vasculares no córtex parietal durante a DDC.....	107
4.3.3. Alterações nos parâmetros sistêmicos e vasculares no córtex parietal durante a anoxia final.....	109
4.3.4. Ensaios de reatividade vascular da aorta e quantificação de superóxido.....	116

5. DISCUSSÃO	118
5.1. Modelo de estudo de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, baseado na administração de SAME – Tratamento agudo por 36 h.....	118
5.2. Modelo de estudo de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, baseado na administração de SAME – Tratamento agudo por 18 h.....	134
5.3. Mecanismos de danos neurológicos induzidos a ratos por SAME e/ou ALA – Tratamento crônico por 30 dias.....	139
6. CONCLUSÕES.....	151
6.1. Modelo de estudo de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, baseado na administração de SAME – Tratamento agudo por 36 e 18 h.....	151
6.2. Mecanismos de danos neurológicos induzidos a ratos por SAME e/ou ALA – Tratamento crônico por 30 dias.....	153
7. REFERÊNCIAS.....	154
ANEXO 1.....	178

1. INTRODUÇÃO

O ácido 5-aminolevulínico (ALA) é o primeiro precursor na biossíntese do grupo heme (Sassa et al., 1989; Sassa, 1998) - o grupo prostético de diversas proteínas e enzimas de transporte (hemoglobina), metabolização do oxigênio e derivados (citocromos, catalase) (King; Marchesini, 2002), e detoxificação de xenobióticos (citocromo P₄₅₀) (Daniell et al., 1997; Heinemann et al., 2008). Em humanos, a inibição ou insuficiência de qualquer das enzimas que participa da via biossintética do heme resulta no acúmulo intracelular de porfirinas e de seus precursores (Hindmarsh, 1986; Gordon, 1999; Kappas et al., 1995; Kauppinen, 2005), levando à manifestação de um grupo de doenças denominadas porfirias (Brodie et al., 1977; Hindmarsh, 1986; Daniell et al., 1997; Kauppinen, 2005). Concentrações elevadas de precursores do heme, especialmente ALA, no sangue, na urina, e em diversos tecidos, incluindo o cérebro, de pacientes que sofrem de porfirias inatas hepáticas (porfiria aguda intermitente - PAI) (Hindmarsch, 1986), também ocorrem em pacientes que sofrem de tirosinoses (como tirosinemia hereditária tipo 1 - TH1) (Berger et al., 1983; Sassa; Kappas, 1983; Bechara et al., 2007) e porfirias químicas (como intoxicação por chumbo - saturnismo) (Kappas et al., 1995; Sakai; Morita, 1996; Gurer; Ercal, 2000; Fujita et al., 2002; Bechara et al., 2007). Pacientes com estas doenças apresentam características neurológicas agudas e psiquiátricas semelhantes, que incluem ansiedade, quadros de psicoses, insônia, transtornos de personalidade e do humor, crises convulsivas e espasmos (Sassa; Kappas, 1983; Kappas et al., 1983; Kappas et al., 1995; Klaassen, 1996). Há ainda ataques agudos de dor abdominal, enfraquecimento das extremidades e

danos hepáticos, que podem evoluir para adenocarcinoma (Dehner et al., 1989; Gluber et al., 1990). Com exceção dos danos hepáticos, este conjunto de sintomas pode ser essencialmente explicado por uma base neurogênica, disparado pelo acúmulo de ALA (Stein; Tschudy, 1970; Muller; Snyder, 1977; Gorchein, 1984; Yeung Laiwah et al., 1987; Kappas et al., 1995; Bechara, 1996; Emanuelli et al., 2000), podendo ainda ser precipitado e agravado pelas drogas anti-epilépticas utilizadas pelos pacientes (Muller; Snyder, 1977; Bylesjo et al., 1996). Neste ponto, vale ressaltar que durante os períodos de ataque de porfirias e tirosinemias (Sassa; Kappas, 1983; Kappas et al., 1995; Emanuelli et al., 2000), altas concentrações de ALA são encontradas no sangue e no fluido cerebrospinal (FCS) (Bylesjo et al., 1996).

Embora as bases moleculares das porfirias e tirosinemias tenham sido extensivamente estudadas, uma condição essencial para o desenvolvimento de terapias efetivas para os ataques agudos típicos destas doenças (especialmente as crises com base neurogênica) é o entendimento dos mecanismos envolvidos nos eventos celulares e clínicos relacionados à sua patologia.

1.1. Metabolismo do heme e porfirias

O heme é o grupo prostético de muitas enzimas e proteínas chaves do metabolismo aeróbico. Consiste de um íon de ferro II mantido no centro de um anel tetrapirrólico policarboxilado, denominado genericamente de porfirina. O primeiro intermediário da via de biossíntese do heme é o ALA, uma α -aminoacetona de origem mitocondrial formada pela ação da ALA sintetase (ALA-S) sobre os substratos glicina e succinil-CoA. Estudos com mitocôndrias isoladas de fígado de

rato e ^{14}C -ALA mostraram que a distribuição de ALA intra- e extramitocondrial é uniforme (Medeiros et al., 1994). A ALA desidratase (ALA-D), segunda enzima da via de biossíntese do heme, catalisa, no citosol, a condensação assimétrica de duas moléculas de ALA, formando o porfobilinogênio (PBG) monopirrólico, que em passos subsequentes é organizado, pela PBG desaminase (PBG-D), em uroporfirinogênio (URO) I, uma molécula tetrapirrólica. O URO I é então convertido ao URO III pela URO sintetase (URO-S), o qual é descarboxilado pela URO descarboxilase (URO-D) para formar o coproporfirinogênio (CP) III, que entra na mitocôndria onde ele é oxidativamente descarboxilado pela CP oxidase (CPO) para formar o protoporfirinogênio (PrP) IX. O PrP IX é então oxidado a protoporfirina IX (PP-IX) pela PrP oxidase (PrPO). Finalmente, o íon ferroso é inserido na PP-IX pela ferroquelatase para formar o heme (**Esquema 1**). Esta enzima é fortemente inibida por íons de chumbo em indivíduos expostos ao metal. A PP-IX é a precursora imediata de grupo heme de várias proteínas e enzimas, inclusive aquele das clorofilas (Sassa, 2006a).

A biossíntese do heme ocorre em todas as células humanas, especialmente nas células eritropoéticas (~ 85%), onde todo heme sintetizado é incorporado à hemoglobina (King; Marchesini, 2002), e nos hepatócitos, onde o heme sintetizado é incorporado às hemoproteínas que compõem os citocromos, principalmente os desintoxicantes da classe P_{450} (Elder; Urquhart, 1987; King; Marchesini, 2002) e aqueles com atividade redox (a , a_3 , b_1 , c e c_1) (King; Marchesini, 2002). As diferenças entre estes dois tecidos e suas necessidades pelo heme resultam em mecanismos completamente diferentes, tecido-específicos, para a regulação da biossíntese do heme (King; Marchesini, 2002; Sassa, 2006b,c). Por exemplo, há dois

genes separados para ALA-S, o gene ALA-S específico hepático e o eritróide, os quais são denominados *ALAS1* (ou *ALAS-N*) e *ALAS2* (ou *ALAS-E*), respectivamente. Enquanto a expressão de *ALAS1* é reprimida por heme, a de *ALAS2* não é (Sassa, 2006b,c). Nos eritrócitos, este controle é exercido pelo produto de oxidação do heme, a hemina (Fe^{3+}), que inibe não apenas a ALA-S, mas também seu transporte do citosol, onde é produzida, para a mitocôndria. Por isso, portadores de PAI em crise aguda são tratados pela injeção intravenosa de hemina, visando recompor a concentração de heme (Siegert; Holt, 2008). O controle da biossíntese do heme, nos eritrócitos, ocorre ainda nas etapas catalisadas pela ferroquelatase e pela PBG-D (King; Marchesini, 2002). Em adição, há RNA mensageiro (mRNA) de ALA-D, e genes para PBG-D (*HMBS*) e URO-S, específicos para fígado e eritrócito (Sassa, 2006a).

A importância do heme não se limita ao seu papel como grupo prostético de diversas proteínas e enzimas essenciais de transporte, respiração e desintoxicação (King; Marchesini, 2002). Todos os intermediários da via de biossíntese do heme são potencialmente tóxicos se produzidos em excesso (Sassa, 2006a), e uma variedade de desordens genéticas está associada com a deficiência das enzimas que participam desta via (Brodie et al., 1977; Hindmarsh, 1986; Kappas et al., 1995; Daniell et al., 1997; Gordon, 1999; Kauppinen, 2005; Sassa, 2006a) (**Esquema 1**). Em humanos, estas doenças, em que há superprodução dos intermediários da via biossintética do heme, causando sintomas neuroviscerais e/ou fotodegradação da pele característicos (Sassa, 2006a), são denominadas genericamente de porfirias (Brodie et al., 1977; Hindmarsh, 1986; Daniell et al., 1997; Kauppinen, 2005).

Esquema 1. Via biossintética do grupo heme. As enzimas e os intermediários estão demonstrados. Paralelamente, são indicadas as deficiências enzimáticas em porfirias com acúmulo de ácido 5-aminolevulínico (ALA). a) Retroinibição por heme, em porfiria aguda intermitente (PAI), ativada por drogas (sulfonamidas e barbiturados) e metabólitos (hormônios sexuais endógenos); b) Inibição por chumbo (saturnismo); c) Inibição por succinilacetona (tirosinemia); d) Biossíntese deficiente em PAI. (Extraído de Onuki et al., 2002a).

As porfirias são desordens metabólicas incomuns, complexas e instigadoras (Sassa, 2006a). Podem ser hereditárias (herança autossômica dominante, com exceção da porfiria eritropoiética congênita, onde a herança é autossômica recessiva) (Murray et al., 1994; Sassa, 2006a), ou adquiridas por exposição a xenobióticos como alguns metais pesados e inseticidas (Hindmarsh, 1986; Sassa, 2006a). Há uma interação significativa entre o defeito genético primário e a aquisição secundária ou fatores ambientais (Sassa, 2006a). Dependendo dos tipos de mutações genéticas, a deficiência (inibição ou insuficiência) de enzimas que participam da via de biossíntese do heme pode ser completa ou parcial (Sassa, 2006a), e várias porfirinas e seus precursores podem se acumular intracelularmente,

e, por não chegarem a incorporar o ferro para formar o grupo heme, escapam da rota intracelular e são liberados na circulação ou oxidados por processos celulares, originando produtos derivados de porfirinas (Hindmarsh, 1986; Bechara et al., 1993; Kappas et al., 1995; Andersson et al., 1996; Gordon, 1999). Em conjunto, estes eventos elevam os níveis das porfirinas ou seus derivados no plasma, na urina e nas fezes (Hindmarsh, 1986; Kauppinen, 2005; Floderus et al., 2006; Sassa, 2006a).

Fotossensibilidade cutânea e distúrbios neurológicos podem ocorrer nas porfirias (Sassa, 2006a). Acúmulo de PP-IX em porfirias hereditárias cutâneas, como a porfiria eritropoiética, torna o indivíduo fotossensível quando exposto à luz ultravioleta (~ 400 nm), devido à atividade fotossensibilizadora da PP-IX sobre o oxigênio molecular, excitando-o ao seu estado singlete ($^1\Delta_g$ O₂), uma espécie extremamente oxidante e portanto, reativa com ácidos graxos poliinsaturados, alguns aminoácidos e bases purínicas e pirimidínicas (Halliwell; Gutteridge, 2007), causando ulcerações na pele exposta ao sol. Já as manifestações neurológicas são disparadas pelo acúmulo de ALA (Brennan; Cantrill, 1979; Emanuelli et al. 2000; Bechara et al., 2007) ou outros intermediários da via de biossíntese do heme, como o PBG (Stein; Tschudy, 1970; Gorchein, 1984; Battle, 1993).

Na biossíntese do heme, a partir do URO, ocorre uma descarboxilação progressiva dos intermediários da via, produzindo compostos mais polares, chamados de porfirinogênicos. Dependendo da sua solubilidade (a qual está associada ao número de grupos carboxila na molécula) (Falk, 1964), os intermediários são excretados na urina e/ou nas fezes (Sassa, 2006a). Os intermediários com 4 a 8 grupos carboxílicos, como uroporfirina e coproporfirina (COPRO), são mais hidrossolúveis, sendo eliminados na urina. Já os intermediários

com 2 grupos carboxílicos, como a PP-IX, são excretados nas fezes (Verdon et al., 2004). Excreção urinária massiva de PBG em pacientes sintomáticos de PAI torna a urina de cor púrpura após exposição à luz natural, daí o termo “porfíria”.

As porfirinas podem ainda atingir outros tecidos, como os dentes, que adquirem um aspecto marrom-avermelhado (eritrodontia), e ossos (Sassa, 2006a). Outra manifestação clínica das porfirias é o aumento do crescimento de pêlos na face, mãos e pés (hirsutismo) (Sassa, 2006a). Especula-se que estas manifestações de porfirias tenham gerado os mitos dos vampiros e dos lobisomens (Hermes-Lima, 2004).

De uma maneira simplificada, as porfirias podem ser classificadas em (i) porfíria eritropoiética, (ii) porfíria hepática aguda, ou (iii) porfíria hepática crônica (Sassa, 2006a), dependendo do sítio principal de expressão da enzima defeituosa que produz o excesso de metabólitos porfíricos, da principal enzima envolvida, da ocorrência ou não de ataques agudos, e da produção de lesões cutâneas (fotossensibilidade) e/ou neurológicas (Batlle, 1993; Kappas et al., 1995; Daniell et al., 1997; Sassa; Kappas, 2000). As porfirias eritropoiética e hepática crônica acompanham fotossensibilidade cutânea, mas não estão associadas aos sintomas neurológicos, enquanto que as porfirias hepáticas agudas são caracterizadas por sintomas neurológicos e eventualmente, fotossensibilidade (Sassa, 2006a).

O quadro clínico nos casos de ataques agudos recorrentes é bastante variável (Doss et al., 2000), com duração de dias ou meses, seguido de períodos relativamente longos de remissão clínica. A manifestação de um quadro de porfíria pode estar associada ou ser exacerbada por uma série de agentes que apresentam efeitos regulatórios na via de biossíntese do heme, como indução da *ALAS1*, fatores

endócrinos e hormônios (como esteróides) (Lamon et al., 1979; Anderson, 1989, 1993), exposição ambiental e ocupacional a organoclorados, arsênio e metais pesados (Hg, Pb) (Verdon et al., 2004), medicamentos (especialmente antibióticos barbiturados e sulfonamida) (Anderson, 1993; Kappas et al., 1995; Anderson et al., 2001; Verdon et al., 2004), excesso de álcool (Thunell et al., 1992; Verdon et al., 2004), nutrição inadequada (Anderson, 1993; Handschin et al., 2005), estresse (Rodgers; Stevenson, 1990; Thunell et al., 1995), infecções virais ou bacterianas (Stein; Tschudy, 1970; Rodgers; Stevenson, 1990;), e fumo (Lip et al., 1991).

Oito tipos diferentes de porfirias foram descritos (**Tabela 1**) (King; Marchesini, 2002). O interesse principal das nossas pesquisas está nas porfirias caracterizadas pela produção excessiva de ALA, importante precursor da biossíntese do grupo heme (**Esquema 1**) e fonte endógena potencial de espécies reativas de oxigênio (ROS) *in vivo* (Monteiro et al., 1989; Hermes-Lima et al., 1992; Pereira et al., 1992; Fraga et al., 1994; Demasi, 1995; Bechara, 1996; Bechara et al., 2007), cujos efeitos deletérios sobre biomoléculas importantes (proteínas, DNA, lipídios) (Stadtman, 1991; McBride et al., 1991; Dean et al., 1991; Dizdaroglu, 1991; Park; Floyd, 1992) e estruturas supramoleculares (mitocôndria, retículo endoplasmático) levam à inibição de funções celulares vitais e da atividade funcional de vários órgãos (Monteiro et al., 1986; Pereira et al., 1992; Bechara et al., 1993; Hermes-Lima et al., 1991; Hermes-Lima et al., 1992; Hermes-Lima, 1995; Rocha et al., 2000b; Rocha et al., 2003; Halliwell; Gutteridge, 2007). Dentro deste grupo estão incluídas doenças hereditárias como a PAI, e doenças relacionadas à deficiência da ALA-D, bem conhecidas por desenvolverem sinais e sintomas típicos de porfiria hepática, como as porfirias por

deficiência da ALA-D, a TH1 e as porfirias adquiridas pela ação de substâncias tóxicas, como chumbo, tricloroetileno e estireno (Fujita et al., 1995).

Tabela 1. Classificação das porfirias.

Tipo de porfria	Sintoma primário	Ataque
Porfria por deficiência da ALA-D	Neurovisceral	Agudo
Porfria aguda intermitente	Neurovisceral	Agudo
Coproporfria hereditária	Neurovisceral, fotossensibilidade branda	Agudo
Porfria variegata	Neurovisceral, fotossensibilidade branda	Agudo
Porfria cutânea tarda	Fotossensibilidade	
Porfria hepatoeritropoiética	Neurovisceral, fotossensibilidade branda	Agudo
Porfria eritropoiética congênita	Fotossensibilidade	
Protoporfria eritropoiética	Fotossensibilidade	

PAI, TH1 e saturnismo são patologias que desencadeiam manifestações clínicas semelhantes, caracterizadas por danos hepáticos progressivos e distúrbios neurológicos como agitação psicomotora, alucinações e depressão. Curiosamente, elas têm em comum o acúmulo tecidual e excreção urinária de ALA, embora com etiologias diversas: deficiência genética de PBG-D na PAI (Hindmarsh, 1986; Thunell, 2000; Grompe, 2001), defeito no catabolismo de tirosina na TH1 (Kappas et al., 1989; Thunell, 2000; Grompe, 2001) e inibição da ALA-D por íons de chumbo no saturnismo (Fujita et al., 1995), reconhecido hoje como uma pandemia (Olympio et al., 2009). Quanto ao chumbo, ele pode comprometer a biossíntese do grupo heme ao inibir diferentes enzimas da via além da ALA-D, como por exemplo, CPO e ferroquelatase, levando ao acúmulo de ALA, COPRO e zinco protoporfirina, respectivamente (**Esquema 1**) (Chilson, 1971; Hindmarsh, 1986; Stohs; Bagchi, 1995; Gurer; Ercal, 2000). Nesta tese de doutoramento é focalizada a TH1.

1.2. Tirosinemia hereditária tipo 1 (TH1) no contexto das porfirias

A TH1 ou tirosinemia hepato-renal é uma doença autossômica recessiva rara, causada por mutação heterogênea (Michell et al., 1995; St-Louis; Tanguay, 1997; Karnik et al., 2004) no gene que codifica a fumarilacetoacetato hidrolase (FAH), última enzima da via de degradação da tirosina (Kvittingen, 1991; Mitchell, 1995; Grompe, 2001). Em humanos, o gene da FAH está localizado na região q23-q25 do cromossomo 15 (Phaneuf et al., 1991). A deficiência da FAH favorece a redução de metabólitos tóxicos como fumarilacetoacetato e maleilacetoacetato a succinilacetoacetato, que é então descarboxilado a succinilacetona (SA), resultando em elevação dos níveis deste metabólito no sangue e urina dos portadores de TH1, e acúmulo de ALA via inibição da enzima ALA-D por SA (Grompe, 2001) (**Esquemas 1 e 2**).

De fato, o tratamento de animais experimentais com SA resulta em inibição da referida enzima, principalmente nos rins e cérebro, órgãos que parecem “sequestrar” e reter este metabólito a partir de fluidos extracelulares (Wyss et al., 1993). Embora as bases moleculares da TH1 tenham sido extensivamente estudadas, os mecanismos envolvendo os eventos celulares relacionados à patologia da doença precisam ser melhores elucidados. Diversos estudos têm mostrado que SA e ALA são citotóxicos às células, podendo ainda ser mutagênicos (Onuki et al., 2002c; Bechara et al., 2007).

Duas formas de TH1 têm sido descritas: (i) aguda, onde é observada falha renal e acelerada deterioração hepática seguida de morte antes do primeiro ano de vida, e (ii) crônica, onde os pacientes apresentam disfunção renal tubular, instalação de um quadro inicial de cirrose com alto risco de progressão para carcinoma

hepatocelular (Dehner et al., 1989; Gluber et al., 1990) e distúrbios neurológicos semelhantes aos observados em portadores de PAI (Kappas et al., 1983; Hindmarsh, 1986). A doença é encontrada em todo o mundo, com alta prevalência no Quebec, nordeste da França e Escandinávia (Kvittingen, 1986; De Brackeleer, 1991; Karnik et al., 2004).

Esquema 2: Via de degradação da tirosina e inibição da ácido 5-aminolevulínico desidratase (ALA-D) por succinilacetona (SA). A linha tracejada representa a enzima deficiente nos portadores de HT1, e a linha dupla representa o ponto de inibição da via de biossíntese do grupo heme por SA.

Dentre os efeitos diretos que a SA pode exercer sobre biomoléculas estão incluídos: *i*) reação não enzimática com proteínas e aminoácidos livres ricos em lisina e arginina, via formação de bases de Schiff (Manabe et al., 1985); *ii*) inibição da atividade da DNA-ligase em extrato de células normais (Pietro-Alamo; Laval, 1998); e *iii*) alteração da fluidez de membrana. No campo da Fisiologia, uma redução da capacidade de transporte de aminoácidos e açúcares em vesículas renais de ratos, promovida pela SA, tem sido descrita (Roth et al., 1989). Foi proposto que o acúmulo de SA estaria envolvido com a aparente depleção de glutathiona reduzida (GSH), importante redutor biológico, observada nos pacientes com TH1 (Manabe et al., 1985), e parcialmente relacionado com o desenvolvimento de disfunção renal do tipo síndrome de Fanconi (Sun et al., 2000). Sabidamente, níveis celulares baixos de GSH desencadeiam desequilíbrio redox (Halliwell; Gutteridge, 2007).

Recentemente, Royer e colab. (2004) demonstraram que a forma enólica da SA é passível de oxidação aeróbica por diversos oxidantes biológicos como peroxinitrito, citocromo c/H₂O₂ e hemoglobina/H₂O₂, produzindo radicais livres como intermediários e espécies tripletes como produtos. Caracteristicamente, carbonilas tripletes excitadas eletronicamente têm um longo tempo de vida (~ microsegundos) (Cilento; Adam, 1995; Royer et al., 2004) e se comportam quimicamente como radicais alcóxilas. Desta maneira, elas podem danificar biomoléculas e organelas celulares como DNA, lipídeos de membrana e mitocôndrias (Indig et al., 1988; Almeida et al., 1999). Os resultados deste trabalho sugerem ainda uma via de decomposição para SA onde um dos produtos finais poderia ser o ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA), o mesmo metabólito obtido a partir da oxidação aeróbica de

ALA (**Esquemas 3 e 4**). O DOVA é um α -oxoaldeído com putativas cito- e genotoxicidade (Kalapos, 1992; Thornalley, 1985; Douki et al. 1998).

Esquema 3: Via de oxidação de SA por O_2 , iniciada por oxidantes biológicos tais como peroxinitrito e hemoproteínas (mioglobina, hemoglobina, peroxidase de raiz forte e citocromo c) (Ganini et al., 2009).

A SA parece não influenciar a síntese da ALA-D (Sassa et al., 1990), porém apresenta-se como um forte inibidor desta enzima ($K_i = 0,03 \mu\text{M}$), levando ao acúmulo de ALA (Berger et al., 1983). A ALA-D é uma enzima que contém grupo sulfidríla ($-\text{SH}$), e consequentemente sua atividade é altamente sensível a íons de metais pesados, como o chumbo, e à presença de agentes oxidantes, que convertem os grupos $-\text{SH}$ a pontes dissulfeto ($-\text{S}-\text{S}-$) (Afonso et al., 1996; Barbosa et al., 1998; Maciel et al., 2000; Farina et al., 2001; Jaques-Silva et al., 2001). A inibição de ALA-D por SA resulta, portanto, no acúmulo de ALA e, por esse motivo, indivíduos com TH1 excretam ALA em concentrações acima do normal (Kang; Gerald, 1970; Schierbeek et al., 1993).

Esquema 4: Via de oxidação aeróbica de ALA a DOVA, acompanhada da geração de espécies reativas de oxigênio.

Neste sentido, considerando-se que aproximadamente 40% das crianças com TH1 desenvolvem os sinais e os sintomas da PAI, parece bastante provável o envolvimento de radicais livres gerados pelo acúmulo de ALA em ambas patologias (Bechara, 1996). Embora na literatura não sejam relatados dados experimentais que comprovem esta hipótese, correlações incipientes podem ser feitas com base em análises do perfil metabólico apresentado por portadores de tirosinemia após transplante de fígado, as quais demonstram que: *i*) os níveis anormais de SA são acentuadamente reduzidos (Tuchman et al., 1987), *ii*) a atividade da enzima ALA-D é quase completamente restaurada (Tuchman et al., 1987; Sassa et al., 1990), e *iii*) a maior parte dos pacientes transplantados parece estar curada da neoplasia hepática relacionada à doença (Gordon et al., 1986). Adicionalmente, a PAI é caracterizada por uma produção aumentada tanto de ALA como de PBG, geralmente em quantidades proporcionais. O fato de que a PAI e a porfiria associada à deficiência

da ALA-D sejam indistinguíveis clinicamente sugere que o ALA ou seus metabólitos, ao invés do PBG, possam ser os agentes neurotóxicos. Esta hipótese é ainda suportada pelo fato de que pacientes com TH1 frequentemente desenvolvem porfiria associada à deficiência da ALA-D em conjunto com suas anormalidades neurológicas, muito provavelmente pela inibição da ALA-D por SA (Sassa, 2006a). Em conjunto, estes dados sugerem que o ALA deve de fato estar envolvido com os distúrbios metabólicos da TH1, porém novas investigações são necessárias para estabelecer uma correlação precisa.

Alguns modelos animais já foram descritos para estudo de porfirias, como tratamento de ratos com injeção intraperitoneal de ALA (McGillion et al., 1975) e o tratamento com SA (Puy et al., 1996; Rocha et al., 2000a), o inibidor da ALA-D. Um modelo de ratos por mutações pontuais da FAH no cromossomo 7 também foi descrito (Lindberg et al., 1996; Aponte et al., 2001).

Nos últimos 30 anos, Bechara e colab. (2007) realizaram vários estudos com ratos para avaliar os efeitos pró-oxidantes do ALA *in vivo*, injetando o composto diretamente no peritônio dos animais. Este modelo possivelmente sofre interferência do aumento intracelular de porfirinas, concomitante ao aumento de ALA, as quais podem promover a produção de radicais livres à custa de NADPH (Morehouse et al., 1987), além de serem potentes sensibilizadoras de danos fotodinâmicos mediados por $^1\Delta_g \text{O}_2$ (Batlle, 1993). Na tentativa de eliminar tais interferências, Bechara e colab. estudam a administração do éster metílico de SA (SAME) para induzir o acúmulo de ALA via inibição da enzima ALA-D (Rocha et al., 2000a). É esperado que SAME seja mais difusível através das membranas do que seu ácido correspondente, o SA, o que o torna uma droga adequada para o estabelecimento

de estados porfíricos em animais experimentais. Esta foi a proposta central desta tese de doutoramento.

Resultados de um trabalho preliminar comprovaram que o tratamento de ratos com o SAME eleva em 27% a concentração plasmática de ALA, aumentando simultaneamente o nível de peroxidação lipídica e a atividade da superóxido dismutase (SOD) cobre-zinco (CuZnSOD) no cérebro, e o aumento do nível de carbonil proteínas no fígado (Rocha et al., 2000a). Alterações significativas no metabolismo de ferro também foram provocadas, com mobilização de ferro para o fígado e cérebro e aumento de ferro no plasma e da saturação de transferrina com este metal (Rocha et al., 2000a). Uma diversidade de dados revelou um papel central do ferro na geração de radicais livres biológicos, particularmente $\text{HO}^\bullet$, através da reação de Fenton, tanto como ferro quelatável dissolvido no meio celular ou como ferro coordenado a grupos específicos de proteínas (como grupo ϵ -amino do resíduo de lisina) e ligações fosfodiéster do DNA (Welch et al., 2002; Halliwell; Gutteridge, 2007). Desta forma, as alterações na homeostase de ferro podem potencializar os danos oxidativos provocados por compostos potencialmente reativos como é o caso do ALA, e levar aos danos oxidativos de proteínas, DNA e outras biomoléculas e desencadear respostas biológicas deletérias. Confirmando estas informações, (i) biópsias de fígado de pacientes de PAI revelaram a presença de depósitos de ferritina e danos mitocondriais extensos (Biempica et al., 1974); (ii) concentrações baixas de citrato sintase e elevadas de SOD-manganês (MnSOD) foram detectadas em amostras de fígado de ratos injetados com ALA (Pereira et al., 1992); (iii) a frequência de câncer hepático primário em pacientes de PAI é bem maior do que em portadores latentes (Thunnissen et al., 1991); e (iv) o tratamento de

ratos com ALA resulta em danos oxidativos aos receptores de ácido γ -aminobutírico (GABA) de diversas áreas do cérebro (Demasi et al., 1996; Adhikari et al., 2006).

No contexto neuronal, experimentos preliminares realizados no laboratório da Dartmouth Medical School por Penatti, ainda não publicados, sugeriram que o tratamento com SA é muito mais eficiente para danificar receptores gabaérgicos de tecidos cerebrais de rato do que o tratamento direto com ALA, como verificado anteriormente por Adhikari e colab. (2006).

A análise destes dados em conjunto sugere que o tratamento de ratos com SAME pode simular uma condição de porfiria.

1.3 Porfirias e efeitos pró-oxidantes do ácido 5-aminolevulínico (ALA)

Em meados dos anos 80, vários estudos demonstraram que portadores de PAI e saturnismo apresentavam atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e SOD acima do normal (Medeiros et al., 1982; Monteiro et al., 1985). Este foi o primeiro indício de que o ALA, metabólito que se acumula nestas doenças, poderia de alguma forma alterar o balanço redox em células de mamíferos. O grupo do professor Etelvino Bechara (IQ-USP) passou então a investigar *in vivo* e *in vitro* a associação da oxidação do ALA mediada por radicais livres com os danos oxidativos a diversas biomoléculas (proteínas, DNA, lipídios), levando à perda das funções celulares (Bechara et al., 2007). Hoje se sabe que similarmente aos compostos α -hidroxicarbonílicos, como dihidroxiacetona, gliceraldeído e glicose (Thornalley, 1985; Mashino; Fridovich, 1987; Dutra et al., 2001), a forma enólica do ALA pode sofrer oxidação aeróbica catalisada por complexos de ferro, como $\text{Fe}^{2+,3+}$ -EDTA, $\text{Fe}^{2+,3+}$ -

ATP, meta e oxihemoglobina, e ferritina (Monteiro et al, 1989; Jaffe; Rajagopalan, 1990; Oteiza et al., 1995; Bechara et al., 1996; Rocha et al., 2000b), gerando intermediários reativos ($O_2^{\bullet-}$ - ânion superóxido, H_2O_2 - peróxido de hidrogênio, $HO^{\bullet}$ - radical hidroxila, $ALA^{\bullet}$ - radical enoil de ALA), DOVA e íon amônia (NH_4^+) como produtos finais (**Esquema 4**) (Bechara, 1996). Não menos interessantes são os relatos de que o íon fosfato age como catalisador bifuncional da enolização do ALA, e que este ânion governa a liberação de ferro da ferritina induzida por $O_2^{\bullet-}$, semiquinonas, e $ALA^{\bullet}$ (Monteiro; Winterbourn, 1989; Rocha et al., 2000b).

O mecanismo de reação da oxidação química do ALA pode ser imaginado como ocorrendo pelas etapas seguintes (**Esquema 4**). Após ser enolizado, o ALA é oxidado pelo O_2 formando $ALA^{\bullet}$, enquanto que o O_2 é reduzido ao $O_2^{\bullet-}$. Tanto o $O_2^{\bullet-}$ quanto o $ALA^{\bullet}$ podem desencadear a reação radicalar em cadeia. A posterior oxidação do $ALA^{\bullet}$ pelo O_2 origina $O_2^{\bullet-}$ e ALA imina (ALA_{imina}), que após hidrólise, produz DOVA e NH_4^+ em quantidades estequiométricas em relação ao O_2 consumido. O H_2O_2 formado pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ e pela redução do $O_2^{\bullet-}$ pelo ALA e pelo $ALA^{\bullet}$, reage subconsequentemente com o ferro, produzindo $HO^{\bullet}$ altamente reativo (reação de Fenton) (Monteiro et al., 1989; Bechara, 1996; Timmins et al., 1999).

Estudos *in vitro* comprovaram que o processo de oxidação do ALA é particularmente importante no ambiente biológico porque as espécies reativas geradas são capazes de promover:

- i) Oxidação *in vitro* de oxihemoglobina a metahemoglobina, provocando perda de estrutura secundária, possivelmente devido à oxidação dos resíduos de aminoácidos (Monteiro et al., 1986).
- ii) Danos à funcionalidade mitocondrial, como aumento de permeabilidade, rompimento do potencial transmembrana, aumento da liberação de Ca^{2+} da matriz intramitocondrial, liberação do estado 4 da respiração mitocondrial, com o consequente inchamento de mitocôndrias isoladas de fígado de rato (Hermes-Lima et al., 1991; Hermes-Lima et al., 1992; Hermes-Lima, 1995).
- iii) Liberação de Fe^{2+} da ferritina (Oteiza et al., 1995; Demasi et al., 1996; Rocha et al., 2000b; Rocha et al., 2003), resultando em alteração da estrutura secundária (perda da α -hélice) e do padrão eletroforético da proteína (danos aos resíduos de triptofano e cisteína), comprometendo a estabilidade da ferritina, o que diminui seu reconhecimento por anticorpos e sua capacidade de ligar ferro (função antioxidante) (Rocha et al., 2003). Ativação da proteína ligadora do elemento de resposta ao ferro (IRP-1) também foi observada (Carvalho et al., 1997).
- iv) Aumento da oxidação de lipídeos (Gederaas et al., 2000; Weiss et al., 2003) e de lipossomos de membranas (Oteiza; Bechara, 1993).
- v) Quebra de fita simples de DNA plasmidial (Onuki et al., 1994; Di Mascio et al., 2000), danos ao DNA nuclear e mitocondrial de células das linhagens SVNF (humano) e PC12 (ratos) (Onuki et al., 2004), e aumento acentuado na formação de adutos 8-hidroxi 2'-

deoxiguanosina (8-HodG) (Fraga et al., 1994; Douki et al., 1998; DiMascio et al., 2000; Onuki et al., 2002; Onuki et al., 2004) e 5-hidroxi 2'-deoxicitidina (Douki et al., 1998; Onuki et al., 2002) de DNA *in vitro*, num processo possivelmente mediado pela presença de HO• (Fraga et al., 1994; Douki et al., 1998). Esta habilidade do ALA (catalisada pelo ferro) em lesar o DNA, associada ao deficiente sequestramento de ferro, pode ser crítica no desenvolvimento de hepatocarcinoma em indivíduos com PAI (Lithner; Wetterberg, 1984; Kauppinen; Mustajoki, 1988; Gubler et al., 1990; Thunnissen et al., 1991) e TH1 (Weinberg et al., 1976; Grompe, 2001).

- vi) Liberação de ferro de preparações microssomais de fígado de rato pelo O₂•⁻ gerado por ALA adicionado ao sistema, apontando para a possibilidade de ocorrer mobilização *in vivo* do ferro aprisionado no retículo endoplasmático e sua captação pela mitocôndria, seguida da inserção do metal à PP-IX, catalisada pela ferroquelatase, com formação do grupo heme (Minotti, 1992).

Uma série de estudos foi capaz de comprovar os efeitos nocivos do ALA também *in vivo*. Ratos tratados diretamente com ALA apresentaram:

- i) Aumento da concentração de radical HO•, detectado por EPR - spin trapping com DPMPO, em camundongos injetados com ALA (Timmins et al., 1999).

- ii) Aumento da oxidação de lipídeos e proteínas no cérebro, fígado e músculo estriado (Demasi, 1995).
- iii) Aumento de aproximadamente 5 vezes na formação de resíduos 8-HOdGuo (Fraga et al., 1994).
- iv) Redução na atividade de enzimas mitocondriais, como MnSOD e citrato sintase, deslocando o metabolismo aeróbico para prioritariamente glicolítico. Essa mudança foi constatada pelo aumento sérico dos níveis de lactato e ácidos graxos livres, e pela maior mobilização de glicogênio hepático e de fibras vermelhas (Pereira et al., 1992).
- v) Indução da biossíntese de enzimas antioxidantes importantes, como SOD e GPx (Rocha et al., 2000a).

Assim, com base na possibilidade do ALA ser gerador endógeno de intermediários reativos, postula-se que a alta incidência de câncer hepático em pacientes sintomáticos de PAI poderia ter origem nas lesões de DNA induzidas diretamente pelos efeitos oxidativos do ALA ou indiretamente pelo DOVA, produto final da oxidação de ALA (**Esquema 4**), que é potencialmente genotóxico devido à sua capacidade de alquilar bases de DNA (O'Brien et al., 1989; Balu et al., 2002; Onuki et al., 2002b), formando bases de Schiff entre os grupos amino ²N da 2'-deoxiguanosina (dGuO) e a função cetona do DOVA (Douki et al., 1998; Cadet et al., 1999, Onuki et al., 2002b). Quebras nas fitas de DNA plasmidal também podem ser induzidas pelo ácido 3,6-dihidropirazina-2,5-dipropanóico (Teixeira et al., 2001;

Onuki et al., 2002b), um produto cíclico resultante da condensação das moléculas de ALA. Tal hipótese é reforçada por resultados de análises histológicas que podem ser correlacionadas com os efeitos *in vivo* e *in vitro* do ALA listados anteriormente. Biempica e colab. (1974) demonstraram a existência de alterações estruturais em hepatócitos de portadores de PAI, tais como dilatação e hiperplasia de retículo endoplasmático e deformação mitocondrial, com presença de grânulos de ferritina na matriz desta organela. Outras anormalidades observadas foram presença de vacúolos autofágicos e acúmulo de lipídeos e ferro (Biempica et al., 1974). Ainda, Tomáz-Zapico e colab. (2002) comprovaram que o tratamento com ALA provoca danos teciduais em células lacrimais de hamsters, os quais podem ser parcialmente revertidos pelo tratamento com melatonina – eficiente sequestrador de radicais livres.

Ainda sob a perspectiva do ALA ser gerador endógeno de intermediários reativos, os sintomas neurológicos característicos das porfirias seriam provenientes da competição entre ALA e GABA por receptores sinápticos de GABA do sistema nervoso central (SNC) (Brennan; Cantrill, 1979a), seguida de lesão química aos receptores promovida por oxi-radicaís gerados na oxidação *in situ* do referido ácido, diminuindo a afinidade (K_d) do receptor GABA_A (um canal de cloreto) pelo GABA (Demasi et al., 1996; Emanuelli et al., 2003), aumentando a liberação de cálcio e comprometendo funções mitocondriais de sinaptosomas (Demasi et al., 1996; Penatti et al., 1996). Essas lesões oxidativas ao receptor também são promovidas pelo DOVA. Ensaio de radiomarcção mostraram que a exposição de sinaptosomas ao DOVA resulta em redução da população de sítios gabaérgicos à metade, diminuição da densidade de receptores GABA_A, alteração da morfologia

dos receptores, e ainda, aumento da taxa de mortalidade celular. O tratamento com ALA levou à perda de morfologia neuronal e diminuição da densidade de sítios gabaérgicos em células (Adhikari et al., 2006).

1.4. Base neurogênica das manifestações clínicas das porfirias

As manifestações clínicas neuroviscerais mais comuns nas porfirias hepáticas agudas, das quais a PAI é uma das variações, são (% de ocorrência nos casos): ataques agudos de dor abdominal (85–95%), enfraquecimento das extremidades (42–60%), e danos hepáticos, que podem evoluir para hepatocarcinoma (Dehner et al., 1989; Gluber et al., 1990). Há ainda vômito (43–88%), constipação (48–84%), dor nos membros, na cabeça, no pescoço e no peito (50–52%), hipertensão (36–54%), taquicardia (28–80%), convulsão (10–20%), perda sensorial (9–38%), febre (9–37%), paralisia respiratória (5–12%), diarreia (5–12%) e sintomas mentais (40–58%), (Waldenstrom, 1957; Goldberg, 1959; Stein; Tschudy, 1970; Sassa, 2006a). Especificamente, as manifestações neuropsiquiátricas das porfirias associadas ao ALA são bastante similares, e incluem ansiedade, psicoses, insônia, transtornos de personalidade e do humor, crises convulsivas e espasmos (Sassa; Kappas, 1983; Kappas et al., 1983; Kappas et al., 1995; Klaassen, 1996).

Enquanto os mecanismos destas manifestações não são plenamente compreendidos, várias hipóteses são apontadas, entre elas: (i) quantidades excessivas de PBG ou ALA podem causar neurotoxicidade (Meyer et al., 1998); (ii) os níveis aumentados de ALA no cérebro podem inibir a liberação de GABA (Mueller; Snyder, 1977; Brennan; Cantrill, 1979a); (iii) a deficiência de heme pode resultar em mudanças degenerativas no SNC (Whetsell et al., 1984); (iv) a redução

da síntese de heme no fígado resulta em diminuição da ação da triptofano pirrolase hepática (PT), uma enzima dependente de heme, possivelmente resultando em níveis elevados de triptofano no cérebro, e no aumento do *turnover* de serotonina, um neurotransmissor (Litman; Correia, 1985); (v) como todas as porfirias que são associadas às manifestações neuroviscerais mostram um aumento na excreção urinária de ALA, e o ALA está associado ao aumento da peroxidação lipídica, esta pode desencadear as crises agudas de porfiria (Bechara, 1996); e (vi) a deficiência de PT resulta na redução dos níveis de melatonina (Puy et al., 1996), o que pode promover uma perda de proteção contra a peroxidação lipídica mediada pelo ALA (Sassa, 2006a).

Algumas evidências da toxicidade do ALA *in vivo* são provenientes de estudos que avaliaram os efeitos comportamentais e bioquímicos da administração sistêmica ou intracerebroventricular deste composto em roedores (McGillion et al., 1973; Shanley et al., 1975; Pierach et al., 1978; Cutler et al., 1979; Demasi et al., 1996), inclusive as convulsões observadas em ataques de porfirias e tirosinemias (Sassa; Kappas, 1983; Kappas et al., 1995; Emanuelli et al., 2000). Estes modelos animais mostraram que, enquanto a administração sistêmica de ALA produz apenas discretos efeitos locomotores (McGillion et al., 1973; Cutler et al., 1979), a administração intracerebroventricular aguda de ALA aumenta a atividade locomotora (Shanley et al., 1975; Pierach et al., 1978) e induz convulsões (Shanley et al., 1975; Pierach et al., 1978; Prauchner et al., 2004) e morte (Shanley et al., 1975; Pierach et al., 1978). Estes efeitos comportamentais (aumento da atividade locomotora, indução de convulsão e de assimetria corporal) também foram confirmados após a administração intraatrial de ALA (Emanuelli et al., 2000). A diferença na resposta

entre os tratamentos (sistêmico e intracerebroventricular) poderia ser explicada pela baixa permeabilidade da barreira hemato–encefálica ao ALA (McGillion et al., 1975; Ennis et al., 2003).

1.4.1. O transporte de ALA no SNC

As concentrações de ALA no cérebro e em outros órgãos de portadores de PAI e TH1 permanecem desconhecidas. Apesar da literatura não ser consensual quanto ao transporte de ALA para o SNC, é importante se pontuar que foi demonstrado o acúmulo de ALA em áreas do tecido cerebral (Juknat et al., 1995).

Diversos estudos concluíram que o acúmulo de ALA no cérebro pode ocorrer através de difusão passiva através da barreira hemato-encefálica (Ennis et al., 2003). No mais, evidências recentes mostraram a existência de um transporte ativo específico de peptídeos (PEPT2) em sinaptossomos corticais (Fujitaa et al., 2004). Considerando-se que o ALA é um substrato para transportadores similares, torna-se bastante provável que ele seja translocado através deste sistema de transportadores peptídicos, especialmente o PEPT2, (Ocheltree et al., 2004), que representaria um mecanismo cerebral regular para manter ativamente baixos os níveis deste precursor do grupo heme no SNC, evitando o acúmulo de ALA (Adhikari et al., 2006). No plexo coróide, o transportador PEPT2 contribui para o *clearance* de ALA do FCS para o sangue, de maneira a manter as concentrações de ALA baixas no FCS (Ocheltree et al., 2004).

Por outro lado, embora dados preliminares tenham implicado a barreira hemato-encefálica em uma baixa captação de ALA exógeno (McGillion et al., 1975),

evidências recentes indicam que em condições de elevada concentração de ALA endógeno, como nos distúrbios porfirínicos, o tecido cerebral é capaz de captar este metabólito e de acumulá-lo no córtex (Juknat et al., 1995). No mais, nestes distúrbios, o ALA é ativamente produzido dentro do cérebro (Matteis; Ray, 1982; Kappas et al., 1995). Estas observações, associadas ao fato de que durante as crises de PAI a concentração de ALA no plasma é de 10 μ M (40 vezes maior do que os níveis normais) (Minder, 1986), sugerem que os níveis cerebrais de ALA podem ser maiores que aos encontrados no FCS (de 10^{-5} a 10^{-7} M) (Percy; Shanley, 1997; Emanuelli et al., 2000), atingindo níveis milimolares em vários tecidos, inclusive fígado, coração, músculos e rins (McGillion et al., 1975; Kappas et al., 1995).

Estudos com linhagem de células de adenocarcinoma humano (WiDr) mostraram que o transporte de ALA é dependente de íons sódio (1:3) e parcialmente de cloreto. Este transporte é ainda mediado por carreadores de β -aminoácidos e de GABA (Rud et al., 2000). Estudos em *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que ALA e GABA compartilham uma permease (Bermúdez Moretti et al., 1993), em que GABA é melhor substrato do que ALA.

1.4.2. ALA e receptores gabaérgicos

Diversos mecanismos parecem estar envolvidos no aumento da atividade da via excitatória do ALA (e DOVA), a qual estaria associada com a alta incidência de sintomas comuns em pacientes portadores de porfirias e tirosinemias, como espasmos e convulsões (Kappas et al., 1995; Obrenovitch; Urenjak, 1997).

As evidências neuroquímicas clássicas para as manifestações neuropsiquiátricas supostamente promovidas pelo ALA apóiam-se na analogia

estrutural entre o ALA e o GABA (Brennan; Cantrill, 1979a; Puy et al., 1996). O ALA compete seletivamente com o GABA pela ligação aos receptores sinápticos de GABA nas membranas do SNC, mimetizando o GABA nos sítios de seus receptores no SNC (Muller; Snyder, 1977), reduzindo desta maneira, o tônus gabaérgico.

Vários estudos demonstraram que o ALA apresenta propriedades excitatórias *in vitro*. O ALA é um agonista dos autoreceptores pré-sinápticos do GABA, reduzindo a liberação estimulada por potássio deste neurotransmissor inibitório pelos sinaptosomos pré-carregados (Brennan; Cantrill, 1979a), e aumentando o efluxo de GABA (Brennan; Cantrill, 1979c), sugerindo que as manifestações neuropsiquiátricas dos ataques agudos de porfirias são provavelmente atribuídas à redução da liberação de GABA nas sinapses centrais (Brennan; Cantrill, 1981). Em adição, o ALA inibe a incorporação de alta afinidade de glutamato, estimulando o efluxo basal de aminoácidos em sinaptosomos corticais de ratos (Brennan; Cantrill, 1979b) e nas terminações de nervos purificados (Brennan; Cantrill, 1979b, 1981; McLoughlin; Cantrill, 1984). O ALA também estimula a liberação deste neurotransmissor excitatório (glutamato) dos sinaptosomos de ratos (Brennan; Cantrill, 1979b; McLoughlin; Cantrill, 1984), além de inibir irreversivelmente a incorporação de glutamato em astrócitos através da inibição do transportador de glutamato GLT-1 (Emanuelli et al., 2003). No mais, o ALA é também um inibidor da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase (Becker et al., 1971) isolada de hemáceas de cérebro de coelho (Brennan; Cantrill, 1979a). Estas propriedades neuroquímicas têm sido implicadas na ação excitatória do ALA, embora a contribuição destes mecanismos aos episódios convulsivos não esteja elucidada (Emanuelli et al., 2000).

Outros aspectos a serem considerados são relativos à hipótese de que o ALA, bem como o seu produto final de oxidação, o DOVA, interfere com a neurotransmissão gabaérgica, e de que há um aumento da neurite mediada pelo GABA durante o desenvolvimento (Barbin et al., 1993).

Um aspecto interessante deste sistema foi revelado pelos dados de Emanuelli e colab. (2000). Estes autores demonstraram que o tratamento de ratos com muscimol, um antagonista gabaérgico, apenas diminui o número de convulsões em animais tratados com ALA, sugerindo uma possível modificação estrutural, talvez oxidativa, no próprio receptor de GABA, ou na sua vizinhança, induzidos pelo ALA. Estes achados foram preconizados por Demasi e colab. (1996), em membranas sinápticas.

1.4.3. Efeitos do ALA na estrutura e na atividade mitocondrial

A transição da permeabilidade mitocondrial (MTP) é uma permeabilização não seletiva da membrana interna, decorrente de danos oxidativos à membrana, resultando em redução da funcionalidade mitocondrial e aumento da organela, com conseqüente ruptura da membrana externa e liberação de citocromo c (cit c) (Zoratti; Szabò, 1995; Green; Reed, 1998; Kowaltowski et al., 1996b; Kowaltowski et al., 2000). Em conjunto, estes eventos desorganizam os componentes da cadeia respiratória, potencializando a formação de ROS e a conseqüente oxidação proteica e lipídica da membrana (Kowaltowski et al., 1996a; Kowaltowski et al., 1996b; Kowaltowski et al., 1997; Kowaltowski et al., 1998; Vercesi et al., 1997).

A MTP pode ser estimulada por uma variedade de compostos ou condições, como fosfato inorgânico, desacopladores ou pró-oxidantes (Zoratti; Szabò, 1995;

Kowaltowski et al., 1996b; Vercesi et al., 1997). Entre os prooxidantes, inclui-se o ALA (Hermes-Lima et al., 1991), acumulado em porfirias; a aminoacetona, acumulada em diabetes (Sartori et al., 2008); e o 1,4-diaminobutanona, uma toxina de *Trypanosoma cruzi* e de vários fungos (Soares; Bechara, 2009). A ocorrência intracelular de MTP pode constituir uma estratégia para eliminar mitocôndrias individuais danificadas que produzam ROS em excesso (Skulachev, 1999).

O acúmulo de ALA está relacionado com o aumento nos níveis de ROS no cérebro, causando estresse oxidativo (Bechara, 1996). No mais, em sinaptossomos, o ALA tem mostrado comprometer a função mitocondrial, reduzir o consumo de oxigênio e aumentar a liberação de cálcio (Penatti et al., 1996). Desta maneira, considerando-se que o desbalanço redox e os altos níveis intracelulares de cálcio são fatores que podem levar à MTP e morte celular (Crompton, 1999), e ainda, que o estresse oxidativo pode sensibilizar a MTP ao cálcio (Kowaltowski et al., 2001), uma hipótese para os sintomas neurológicos característicos das porfirias seria que o desbalanço redox associado a estas desordens comprometeria as mitocôndrias, sensibilizando o tecido cerebral aos insultos subseqüentes, como uma difusão da depressão cortical (DDC).

1.4.4. Espectroscopia de domínio espectral

A espectroscopia de domínio espectral (SDS) é uma abordagem experimental que mede o espectro de atenuação tecidual completo em uma faixa entre 510 a 640 nm, e que utiliza um modelo Monte Carlo de transporte de luz através do tecido para calcular a concentração absoluta de hemoglobina, a saturação média de hemoglobina (SmcO_2) e a concentração absoluta de cit c reduzido em uma área de

aproximadamente $0,2 \text{ mm}^3$ do córtex cerebral. Recentemente o professor Roger Springett (Dartmouth Medical School, Hanover, NH, USA) desenvolveu um sistema SDS integrado a uma medição Doppler a laser do fluxo sanguíneo cerebral (CBF) que, usando a SmcO_2 como um substituto à saturação venosa local, permite calcular a taxa metabólica cerebral para o consumo de oxigênio (CMRO_2) (De Visscher et al., 2002). Este sistema foi idealizado para mensurar a oxigenação e a função mitocondrial em cérebro porque os dados da SmcO_2 e do cit c proporcionam informações sobre a oxigenação nos níveis vascular e mitocondrial, respectivamente, enquanto que os dados da CMRO_2 fornecem a taxa com que a mitocôndria está consumindo oxigênio. Esta tecnologia foi aplicada nesta tese de doutoramento para tentar elucidar se os sintomas neurológicos característicos das porfirias eram consequentes de danos mitocondriais associados ao efeito pro-oxidante do ALA.

A DDC é uma onda de despolarização rápida de uma população mensurável de células neuronais, que se propaga através do córtex a uma velocidade de 3 a 5 mm/min. O evento da DDC foi descrito pela primeira vez em 1944, pelo pesquisador brasileiro Aristides Leão (Leão, 1944).

O estudo da DDC é importante por poder elucidar certas condições neurológicas clínicas, expondo um panorama geral da neurofisiologia. A passagem de uma onda DDC é um desafio metabólico substancial ao tecido, pois a repolarização neuronal é um processo dependente de energia (Somjen; Aitken, 1984; Selman et al., 2004). Durante a DDC há uma massiva redistribuição de íons entre os compartimentos intra e extracelular, que atua como um processo regenerativo do tipo “tudo ou nada” (Somjen, 2001). Na DDC, há um amplo fluxo de

cálcio no citosol (Jing et al., 1993), o qual será captado pela mitocôndria (Nicholls; Chalmers, 2004) e deverá ser extruído pelas bombas de cálcio dependentes de ATP da membrana plasmática. Embora o acúmulo excessivo de cálcio pela mitocôndria possa levar à MTP e subsequente, à morte neuronal (Nicholls; Budd, 2000), após a indução de uma DDC em córtex normal, os neurônios possuem capacidade de geração de energia suficiente para repolarizar rapidamente a membrana plasmática e para extrair rapidamente o cálcio intracelular, fazendo com que as alterações promovidas pela DDC sejam plenamente reversíveis (Nedergaard; Hansen, 1988). No córtex normal, após a indução de uma DDC, a fase hiperoxidativa é rápida. Contudo, após a indução de uma DDC em cérebro isquêmico, a insuficiência de energia leva a uma despolarização prolongada e a um aumento na incorporação de cálcio pela mitocôndria, o que promove uma hiperpolarização mais intensa e prolongada, aumentando o grau de disfunção mitocondrial.

As DDCs podem ser facilmente provocadas em modelos animais por diversos estímulos, incluindo aplicação tópica de KCl (Busch et al., 1996), danos mecânicos (punção da agulha) (Fabricius et al., 1995) e estimulação elétrica no córtex (Guedes et al., 1987).

O cit c é uma proteína da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial que transporta os elétrons entre o Complexo III (complexo bc₁) e o Complexo IV (citocromo oxidase). É uma proteína sensível ao estado metabólico e à oxigenação mitocondrial, que pode ser tanto reduzida quanto oxidada. Em tensões altas de oxigênio, o estado de oxidação do cit c (definido como a porcentagem de cit c que está oxidado) é independente da tensão de oxigênio, embora não seja totalmente

oxidado. Em baixas tensões de oxigênio, o estado de oxidação do cit c torna-se sensível à oxigenação à medida que os elétrons prosseguem na cadeia e o cit c torna-se reduzido (Hollis et al., 2003). Estes achados também foram confirmados com porcos (Springett et al., 2000a, 2000b) e ratos (De Visscher et al., 2002), ao se mostrar que em condições normais, a oxidação do cit c é independente da distribuição (tensão) de oxigênio mitocondrial, e que sua redução é iniciada quando a SmcO_2 cai abaixo de 60%.

2. OBJETIVOS

O objetivo central desta tese de doutoramento foi otimizar um modelo animal confiável para o estudo bioquímico, histoquímico, imunohistoquímico e histológico de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, via inibição da enzima ALA-D, através do uso de SAME, mimetizando o estado metabólico observado nos portadores de porfirias e tirosinemias. A injeção intraperitoneal direta de ALA em ratos é passível de questionamento em virtude do acúmulo tecidual resultante não só de ALA, mas também das porfirinas precursoras de heme, às quais foram atribuída atividade pró-oxidante (Battle, 1993). A geração de ALA via bloqueio de sua desidratação bimolecular a PBG por SAME levaria a concentrações elevadas de ALA sem aumentar os níveis de porfirinas.

Neste trabalho, foram estudados os efeitos do SAME sobre indicadores de desbalanço redox e ultraestruturas celulares, correlacionando estes dados com os níveis de precursores do heme (ALA e COPRO) acumulados em animais experimentais tratados com SAME. Especificamente, analisamos o efeito do tratamento agudo com diferentes doses de SAME sobre os níveis de ALA no plasma, fígado, córtex cerebral e urina de ratos, e sobre os níveis de porfirinas (COPRO) na urina. O critério de escolha destes tecidos foi baseado nas manifestações clínicas comuns da TH1, especialmente os sintomas neurológicos e hepáticos, conforme citado no item 1.2. Dentro deste tratamento dose-resposta, realizamos a caracterização bioquímica de desbalanço oxidativo através da análise do conteúdo de ferro livre, GSH/GSH+GSSG (glutathiona reduzida/glutathiona total),

nível de peroxidação lipídica (malondialdeído - MDA) e oxidação proteica (carbonil proteínas) e atividade das enzimas SOD e GPx. Além disso, determinamos a atividade da enzima ALA-D. Análises adicionais por histoquímica para ferro livre, e por imunohistoquímica para ferritina e proteínas carboniladas em fígado e córtex cerebral foram realizadas. Também foram avaliados os efeitos da SA sobre a ultraestrutura celular através de caracterização histológica de fígado e córtex cerebral, tentando-se reproduzir no modelo de porfiria experimental as alterações ultraestruturais relatadas por Biempica e colab. (1974) ao estudar biópsias de fígado pacientes de PAI.

Paralelamente ao aprimoramento de um modelo de estudo *in vivo* de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, baseado na administração aguda de SAME, foi objetivo desta tese de doutoramento caracterizar *in vivo* os efeitos crônicos de ALA em mitocôndrias de córtex cerebral de ratos, avaliando se os sintomas neurológicos característicos das porfirias podem decorrer do comprometimento mitocondrial frente ao desbalanço oxidativo associado a estas desordens, sensibilizando o tecido aos insultos subseqüentes como a DDC. Para testar esta hipótese, decidiu-se aplicar uma nova tecnologia óptica (sistema SDS) para medidas de DDC capaz de determinar simultaneamente a oxigenação cerebral (S_{mcO_2} e CBF), o consumo de oxigênio ($CMRO_2$) e o estado redox do cit c em ratos submetidos a tratamento com ALA e SAME, como indutores de um quadro porfírico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes foram adquiridos da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha), da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA), da Boehringer Mannheim e da Amersham Biosciences.

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapurificada em sistema Millipor.

3.1. Modelo de estudo de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, baseado na administração de SAME - Tratamento agudo por 36 e 18 h

3.1.1. Protocolo de estudo

Participaram deste estudo ratos machos jovens da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com massa corporal em torno de 250-300 g. Durante o período experimental os animais foram mantidos no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da USP. Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas, em condições controladas de temperatura (25°C) e luz (ciclos de claro-escuro de 12 h, com luz das 7:00 às 19:00 h). Os animais receberam água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, submetidos e aprovado pelo Comitê de Ética em Cuidados e Uso Animal do IQ-USP, e pela Comissão de Ensino e Pesquisa da Divisão de Laboratório Central do Instituto Central do Hospital das Clínicas – USP.

3.1.1.1. Tratamento agudo por 36 h

Os animais foram submetidos a um jejum de 44 h (6 h previamente ao estudo, durante as 36 h de tratamento, e 2 h após a finalização do tratamento). Durante o período do tratamento (36 h) os animais receberam 3 administrações intraperitoneais, a cada 18 h. Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos, de acordo com o tratamento recebido: os animais do grupo AI receberam solução salina (NaCl 0,9%; 0,67 mL/kg peso corporal); os dos grupos AII, AIII e AIV receberam SAME (10, 40 e 80 mg/kg peso corporal, respectivamente). Para efeito de comparação, também foram utilizados SA (grupo AV), ALAME (grupo AVI) e ALA (grupo AVII), na dose de 40 mg/kg peso corporal. É sabido de experimentos de terapia fotodinâmica (PDT) que o ALAME é mais rapidamente captado por células do que sua forma ionizada, o cloridrato de ALA (Reed et al., 1999; Casas et al., 2001; Luksiene et al., 2001; Gerscher et al., 2001). O volume de cada injeção não excedeu 0,20 mL.

Duas horas após a última injeção os animais foram mortos por decapitação. Amostras de sangue, fígado e cérebro foram coletadas. A eutanásia dos animais se deu 2 h após a última injeção devido ao fato da atividade da ALA-S hepática apresentar 3 picos de atividade após a injeção de SA, sendo um deles depois de 90 min (Tschudy et al., 1981).

O sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos Vacutainer® contendo K₃EDTA e centrifugado a 3000 x g por 10 min para obtenção do plasma. Nos casos de fígado e cérebro, após a separação de parte do material para análise histológica, histoquímica e imunohistoquímica, as amostras foram imediatamente congeladas em N₂ líquido.

Além disso, amostras de urina foram coletadas no período de jejum (coleta de 6 h), e no intervalo de 18 h entre cada injeção (coleta entre a primeira e a segunda, e entre a segunda e a terceira injeção), usando-se gaiolas metabólicas.

Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até a realização das análises.

Deteção de ALA por HPLC foi realizada nas amostras de plasma, fígado, cérebro e urina. Determinação da atividade de ALA-D foi realizada por espectrometria nas amostras de fígado e cérebro. Deteções de GSH e GSSG, e MDA, foram realizadas nas amostras de fígado e cérebro. As amostras de fígado foram analisadas para carbonil proteínas. Deteção de porfirinas por HPLC foi realizada nas amostras de urina. Análises de ferro total não-heminico também foram conduzidas nas amostras de fígado e cérebro. Análises das atividades de SOD e GPx foram realizadas nas amostras de fígado e cérebro.

A caracterização histológica dos fragmentos de fígado e cérebro foi realizada apenas para os animais dos grupos AI, AII AIII e AIV. Marcações por histoquímica para ferro, e por imunohistoquímica para ferritina e carbonil proteínas, também foram realizadas para as amostras de fígado e cérebro.

3.1.1.2. Tratamento agudo por 18 h

Os animais foram submetidos a um jejum de 24 h (4 h previamente ao estudo, durante as 18 h de tratamento, e 2 h após a finalização do tratamento). Durante o período do tratamento (18 h) os animais receberam 3 administrações intraperitoneais, com intervalos de 8 e 10 h, respectivamente. Os animais foram aleatoriamente divididos em 6 grupos, de acordo com o tratamento recebido: os animais do grupo BI receberam solução salina (NaCl 0,9%; 0,67 mL/kg peso

corporal); os animais dos grupos BII, BIII e BIV receberam 40 mg/kg peso corporal de SAME, ALA e éster metílico de ALA (ALAME), respectivamente; os animais do grupo BV receberam 30 mg ALA + 10 mg SAME/kg peso corporal; e os animais do grupo BVI receberam 10 mg SAME/kg peso corporal. O volume de cada injeção não excedeu 0,2 mL.

Duas horas após a última injeção os animais foram mortos por decapitação. Amostras de sangue, fígado e cérebro foram coletadas.

O sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos Vacutainer® contendo K₃EDTA e centrifugado a 3000 x *g* por 10 min para obtenção do plasma.

As amostras de fígado e cérebro foram imediatamente congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C até a realização das análises.

Deteção de ALA foi realizada nas amostras de plasma e fígado. Determinação da atividade de ALA-D foi realizada nas amostras de fígado. Análise da atividade de SOD e GPx, e de ferro, foram realizadas nas amostras de fígado. Análise de ferro sérico também foi realizada.

3.1.2. Preparação da solução de SAME

O SAME foi preparado por reação direta de SA com diazometano em éter etílico como solvente (0,1 g SA: 5,1 mL de diazometano). Após evaporação do éter etílico o resíduo de SAME foi dissolvido em solução salina e teve o pH ajustado em 7,0 com bicarbonato de sódio para ser usado no tratamento dos animais (Rocha, 1998).

Para obtenção do diazometano, uma solução contendo 8 g de Diazald® em 100 mL de éter etílico foi preparada e transferida para uma aparelhagem de

destilação desprovida de juntas esmeriladas mantida em banho de gelo (0°C). Seguiu-se a uma adição rápida de uma solução etanólica de KOH (5 g em 20 mL) a -10°C. Após a adição, o banho de gelo foi removido e a mistura reacional foi aquecida a 40°C permitindo a destilação do diazometano, que foi então recolhido em éter (~150 mL), à aproximadamente -78°C (Voegel, 1989).

Este método apresenta as vantagens de não produzir produtos secundários, de apresentar um alto rendimento (ao redor de 100%, dependendo do composto de partida), e de o nitrogênio molecular, o outro produto da reação, ser eliminado natural e rapidamente como gás.

3.1.3. Preparação das soluções de SA, ALA e ALAME

As soluções de SA, ALA e ALAME foram preparadas pela dissolução de SA, ALA e ALAME, respectivamente, em solução salina, e tiveram o pH ajustado em 7,0 com bicarbonato de sódio para ser usado no tratamento dos animais.

3.1.4. Determinação de ALA

A determinação de ALA foi realizada em HPLC acoplado ao detector de fluorescência (Waters Corporation), após a desproteinização e derivatização das amostras (Murata et al., 2003).

Com o fígado e o cérebro, foram preparados homogenatos com tampão Hepes 10 mM, pH 7,2, contendo KCl 125 mM (300 mg de tecido: 1,5 mL de tampão), seguido de centrifugação a 3000 x g, por 5 min, a 4°C. Para as análises, utilizou-se o sobrenadante.

A desproteinização das amostras foi realizada com acetonitrila, na proporção de 1:1 (v:v), seguida de centrifugação em $18000 \times g$, por 5 min, a 4°C.

A derivatização das amostras foi realizada com acetilacetona e formaldeído (Murata et al., 2003). Para isto, preparou-se uma mistura contendo 100 μL da amostra desproteinada, 25 μL de água Milli-Q, 125 μL de tampão acetato de sódio 200 mM pH 7,2, 625 μL de uma solução A e 125 μL de uma solução B. Esta mistura foi incubada a 95°C (Thermomixer 5437 – Eppendorf) por 15 min, sob agitação (800 rpm) e proteção da luz. Nesta etapa, tomou-se o cuidado de realizar um orifício na tampa dos Eppendorfs para a eliminação do vapor. As amostras foram então resfriadas em gelo por 10 min, sob proteção da luz, e imediatamente transferidas para os frascos de injeção.

A solução A consiste de acetilacetona:etanol:água na proporção 15:10:55 (v/v/v). A solução B consiste de formaldeído 8,5% (w/v). Estas soluções foram preparadas no dia da análise, e armazenadas em frasco âmbar.

A curva padrão foi realizada a partir de diluições seriadas de uma solução estoque de ALA 6 mM (= 1 mg/mL). Os padrões de ALA foram derivatizados nas mesmas condições que as amostras. Para isso, o volume final do padrão diluído foi de 125 μL (equivalente ao volume de 100 μL de amostra + 25 μL de água).

O sistema cromatográfico da Waters Corporation consiste de uma bomba 515-HPLC acoplada a um detector de fluorescência (474). O sinal foi transferido para um computador digital e os dados foram processados através do Millenium Chromatography Manager Software. As amostras foram introduzidas com o injetor automático Waters 717 plus. A fase móvel utilizada consistia de uma mistura de água Milli-Q, metanol e ácido acético glacial (50:50:0,1 v/v/v), pré-filtrada e

degaseificada. A detecção fluorimétrica foi realizada sob as seguintes condições cromatográficas: coluna analítica Phenosphere C₁₈ fase reversa 5 µm (150 x 4,6 mm) mantida a uma temperatura de 40°C; sistema de eluição isocrática; fluxo de 0,7 mL/min; volume de injeção de 80 µL; tempo de corrida de 12 min; λ de excitação de 373 nm e λ de emissão de 463 nm.

3.1.5. Determinação da atividade de ALA-D

A atividade de ALA-D foi determinada como descrito por Sassa (1982), através da medida colorimétrica de PBG (produto final da condensação de duas moléculas de ALA catalisada por ALA-D). Para isso, foi utilizado o reagente de Ehrlich (*p*-dimetilaminobenzaldeído, um eletrófilo extremamente reativo), que se liga ao PBG sintetizado pela enzima formando um complexo que absorve luz a 553 nm ($\epsilon = 6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Para o fígado e o cérebro, foi preparado homogenato com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4 (300 mg de tecido: 1,5 mL de tampão), seguido de centrifugação em 18000 x *g* por 5 min, a 4°C. Para as análises utilizou-se o sobrenadante.

Vinte µL do homogenato foram incubados por 60 min, a 37°C, em 200 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 5,8) contendo 20 mM de ditioneitol (DTT) e 8 mM de ALA. A reação foi terminada pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 6% (mistura de 2,72 g de HgCl₂ em 100 mL de TCA 6%). Após centrifugação a 1000 *g* por 5 min, 600 µL do sobrenadante foi incubado por 10 min (no escuro e a temperatura ambiente) com 600 µL do reagente de Ehrlich modificado (mistura de

0,175 g de HgCl_2 , 45 mL de ácido acético glacial, 10 mL de ácido perclórico 70% e 1g de *p*-dimetilaminobenzaldeído). Para o branco, 20 μL do homogenato foram incubadas por 60 min, a 37°C, em 200 μL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 5,8) contendo DTT 20 mM, e a reação seguiu como descrito acima.

As análises foram feitas em triplicata, utilizando-se um espectrofotômetro de duplo feixe Hitachi U2010, munido de banho termostatizado e com agitador magnético para cubetas.

3.1.6. Determinação de GSH e GSSG

GSH e GSSG foram determinados como descrito por Smith e colab. (1995). Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu equipado com bombas modelo LC-10AD, com detector eletroquímico ESA coulochem III. A coluna utilizada foi uma nucleosil C18 (250 x 4,6 mm, tamanho de partículas 5 μm e 100 Å de tamanho de poro - supelco) com eletrodo poroso de carbono vítreo, a uma temperatura de 44° C. A eluição foi feita com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 2,7, contendo ácido octanossulfônico 5 μM e 2% de acetonitrila.

Para as análises, fez-se homogenatos usando-se 500 mg de tecido para 3 mL do eluente, centrifugando-se a 20000 rpm, por 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi tratado com acetonitrila (1:1, v/v) e centrifugado a 20000 rpm, por 5 min, a 4°C, sendo posteriormente filtrado com filtro Millex 0,45 μm .

A curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas de soluções estoque de GSH e GSSG.

Condições da corrida: Para o homogenato de fígado, o fluxo foi de 1,2 mL/min, o tempo de corrida foi de 5,5 min, e o tempo de retenção foi de 3,4 a 3,8

min, e de 4,5 a 4,7 min, para GSH e GSSG, respectivamente. Para o cérebro, o fluxo foi de 1 mL/min, o tempo de corrida foi de 7 min, e o tempo de retenção foi de 4,43 a 4,53 min, e de 5,6 a 5,73 min, para GSH e GSSG, respectivamente. Para as corridas, utilizou-se um potencial eletroquímico de 700 mV para E1, de 800 mV para E2, e de 980 mV para o Guard Cell. A corrente utilizada foi de 5 μ A.

3.1.7. Peroxidação lipídica – determinação de MDA

A determinação de MDA foi realizada em HPLC pelo método de Esterbauer e colab. (1984).

Para o fígado e o cérebro, foi preparado homogenato com tampão Tris 30 mM pH 7,4 contendo 10% de acetonitrila (200 mg de tecido/1 mL de tampão), seguido de centrifugação a 3000 x g, por 5 min, a 4°C. Para as análises foi utilizado o sobrenadante.

A desproteinização das amostras foi realizada com acetonitrila na proporção de 1:1 (v:v), seguida de centrifugação em 3500 x g, por 10 min, a 4°C. A fase lipídica foi descartada e o sobrenadante filtrado em filtro GV com membrana Durapore 0,22 μ m (Millex/Millipore). As amostras foram armazenadas a -20°C por no máximo 1 h antes de serem analisadas. As frações obtidas foram transferidas para os frascos de injeção.

A curva padrão foi feita a partir de diluições seriadas (entre 1-100 μ M) de uma solução 10 mM de MDA na forma de seu dietilacetil. Esta solução foi preparada por dissolução de 220 mg (1 mmol) de diacetil em 100 mL de ácido sulfúrico 1%, e foi deixada por 2 h em temperatura ambiente para obtenção da hidrólise total do dietilacetil ao aldeído desejado (MDA).

O sistema cromatográfico da Waters Corporation consiste de uma bomba 515-HPLC acoplada a um detector Photodiode Array (746). O sinal foi transferido para um computador digital, onde os dados foram processados. As amostras foram introduzidas com o injetor automático Waters 717 Plus. A fase móvel utilizada foi uma solução de tampão Tris 30 mM pH 7,4 contendo 10% de acetonitrila, pré-filtrada e degaseificada. A detecção foi realizada sob as seguintes condições cromatográficas: coluna analítica Phenosphere LC-NH₂ (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm e 100 Å de tamanho de poro), equipada com uma pré-coluna de 20 mm de mesma fase; a coluna foi mantida em temperatura ambiente; sistema de eluição isocrática; fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL; tempo de corrida de 8 min; λ de 270 nm.

3.1.8. Carbonil proteínas

Os níveis de carbonil-proteínas das amostras de fígado foram determinados pelo método do borohidreto tritiado (NaB³H₄) como descrito por Levine e colab. (1990) e modificado por Rocha e colab. (2000). Para o fígado foi preparado homogenato com tampão Hepes 50 mM pH 7,2, contendo KCl 125 mM, seguido de centrifugação a 1000 x g, por 5 min, a 4°C. As análises foram conduzidas com frações do sobrenadante contendo de 4-5 mg de proteína/mL. As amostras foram tratadas com estreptomicina (9:1, v/v, de amostra e estreptomicina, respectivamente), deixadas em repouso por 15 min, e centrifugadas a 11000 x g, por 10 min, a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio saturado (1:1, v/v), seguido de nova centrifugação a 11000 x g, por 10 min, a 4°C. O *pellet* foi então ressuspensionado em 50 µL de Tris-HCL 0,1 M pH 8,5 contendo EDTA 10 mM. Catorze

μL de NaB^3H_4 diluído foi adicionado à amostra, que foi então incubada a 37°C por 30 min. Após a incubação foi realizada lavagem da amostra através da adição de TCA 10%, seguida de repouso de 5 min e centrifugação a $11000 \times g$, por 3 min, a 4°C . Este procedimento foi realizado 3 vezes. Após a última lavagem o *pellet* foi redissolvido em 0,6 mL de NaOH 0,1 M e incubado a 37°C por 15 min. Um volume da amostra de 50 μL foi transferido para um filtro de papel, e após secagem a 50°C por 50 min, a radioatividade foi determinada pelo coquetel PPO (2,5 difeniloxazole) - POPOP (1,4-bis-(4 metil-5-fenil-2 oxazolil) benzeno). Como controle positivo foram utilizados 50 μL do NaB^3H_4 diluído. Dosagem de proteína também foi realizada na solução final.

O preparado da solução radioativa (NaB^3H_4 diluído) continha 490 μL de NaB^3H_4 25 mCi e 800 μL de NaBH_4 1,0 M em NaOH 0,1 M.

Análises adicionais de carbonil proteínas para o fígado, bem como para o cérebro, foram conduzidas por imunohistoquímica.

3.1.9. Determinação de porfirinas na urina

As análises de porfirinas foram realizadas em HPLC acoplado ao detector de fluorescência (Shimadzu Co., Kioto, Japão), de acordo com o método descrito por Alves e colab. (2007). As frações de porfirinas determinadas foram a uroporfirina (8-carboxiporfirina, URO), a heptaporfirina (7-carboxiporfirina, HEPTA), a hexaporfirina (6-carboxiporfirina, HEXA), a pentaporfirina (5-carboxiporfirina, PENTA), e a coproporfirina (4-carboxiporfirina, COPRO). Esta etapa do trabalho foi realizada em

colaboração com a Dra. Atleca Nunciata Lopes Alves, da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP (DLC-HCFMUSP).

Aos 500 μL da amostra foram adicionados 17,5 μL de HCl 37%. Esta mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 10 min e filtrada em Millex HV 0,45 μm , membrana durapore PVDF, 13 mm de diâmetro, não estéril (Millipore). O pH da mistura foi medido com uma fita indicadora ($\text{pH} \leq 2$), e as amostras foram transferidas para os frascos de injeção.

Como padrão foi utilizado um calibrador comercial de porfirinas que consiste de um liofilizado de urina humana da Immundiagnostik (Bensheim, Alemanha KC3601 ka) com concentrações conhecidas de URO, HEPTA, HEXA, PENTA, COPRO I e II e mesoporfirina IX. Este material foi armazenado a -8°C até o momento das análises. A partir da ressuspensão deste material liofilizado em água Grau I (NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards C3-A3, 1997), acidificada com 25 μL de HCl 37%, foi preparada uma solução padrão, obtendo-se frações de 90,8, 86,9, 88,8, 118,8, e 187,2 $\mu\text{g/L}$ de URO, HEPTA, HEXA, PENTA, COPRO, respectivamente. Em adição, uma segunda curva padrão foi realizada a partir de um “pool” de urina de indivíduos normais.

O sistema cromatográfico da Shimadzu consistia de duas bombas (LC-10AD) acopladas a um detector de fluorescência (RF-535), um controlador (SCL-10A), um desgaseificador (DGU-2A), um forno de coluna (CTO-10A), e um integrador (CR7APLUS). O sinal foi transferido para um computador digital, onde os dados foram processados. As amostras foram introduzidas com o injetor automático SIL-10A.

As fases móveis utilizadas consistiam de acetato de amônio 1 M, pH 4 (Solução A) e de metanol grau HPLC (Solução B), pré-filtradas e degaseificadas. A detecção de fluorescência foi realizada sob as seguintes condições cromatográficas: coluna analítica Lichrospher 100 RP-18 5 μm (125 x 4 mm) e pré-coluna Lichrospher 100 RP-18 5 μm (4 x 4 mm), mantida em temperatura ambiente; fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção de 100 μL ; tempo de corrida de 21 min; λ de excitação de 400 nm e λ de emissão de 620 nm. As frações de porfirinas foram separadas pela diferença de polaridade (resultante do número de carboxilas). Para isso utilizou-se um sistema de eluição de tampão de acetato de amônio 1 M, pH 4, com gradiente passando de 10 a 95% de metanol em 14 min e retornando a 10% aos 18 minutos (**Tabela 2**).

Tabela 2. Sistema de gradiente utilizado para a separação das frações das porfirinas de acordo com a polaridade.

Tempo (min)	% de tampão acetato de amônio 1 M, pH 7,4	% de metanol
0,01	90	10
14	5	95
15	5	95
18	90	10
20	90	10
21	Fim da corrida	Fim da corrida

3.1.10. Determinação de creatinina

As análises para creatinina foram realizadas na DLC do Hospital das Clínicas da FMUSP. As análises foram feitas com picrato alcalino, de acordo com a reação de Jaffé, pelo teste cinético colorimétrico e utilização de branco de amostra, no analisador bioquímico Roche/Hitachi, modelo MODULAR P (Roche Laboratory Systems, Mannheim, Alemanha). O reagente proveniente da Roche Diagnostics ® é

padronizado através do método de referência de diluição isotópica seguida por espectrometria de massa (Soares, 2008).

3.1.11. Determinação do clearance renal do ALA

Sabendo-se o volume total de urina coletado no período de 24 h, foi calculado o clearance renal do ALA (Cl_{ALA} , mL.min⁻¹), de acordo com a seguinte equação:

$$Cl_{ALA} = \frac{\Delta X_u}{V_u \cdot C_p}, \text{ onde}$$

$$C_p$$

ΔX_u é a quantidade de ALA na urina durante o intervalo de tempo de 24 h, V_u é o volume de urina/min no intervalo de tempo de 24 h, e C_p é a concentração plasmática de ALA obtida.

3.1.12. Determinação de ferro livre não hemínico

A concentração de ferro livre não hemínico foi determinada conforme descrito por Riederer e colab. (1989) e modificado por Bralet e colab. (1992).

Para o preparo dos homogenatos de fígado e cérebro, 50 mg de tecido foram homogeneizados em 2 mL de solução de HCl 0,1 M, pH 2,5, contendo pepsina (10 mg/mL), 2,2-bipiridil 5 mM e ácido ascórbico (20 mg/mL) (branco de reagentes).

As amostras (plasma ou homogenatos) foram incubadas a 37°C por 24 h, e centrifugados a 14000 x g por 20 min. Após repouso de 20 min, fez-se a medida de absorbância do sobrenadante em $\lambda=520$ nm contra um branco de reagentes incubados nas mesmas condições das amostras. A curva padrão foi feita com o sal de Mohr, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (0,05-5,0 μ g de Fe^{2+} /mL de HCl 0,1 M pH 2,5

contendo 2,2-bipiridilo 5 mM). Os resultados foram expressos em μg de equivalentes de ferro/g de tecido.

3.1.13. Análise de ferro sérico

A análise de ferro nas amostras de plasma foi realizada em um leitor de microplacas de 96 poços automatizado, empregando-se um Sistema Colorimétrico para Determinação do Ferro Sérico (Doles, Goiânia, Brasil). Este ensaio é baseado em uma modificação do método de Goodwin (1966), em que frente a um agente redutor (cloreto de hidroxilamina 0,36 M, glicina 0,1 M, tiosemicarbazida 0,014M, t-octilfenoxipolietoxietanol 0,5 mmol, pH 2,2), o ferro sérico é liberado da transferrina sob a forma de íon ferroso, e nestas condições, reage com a ferrozina (3-(2 piridil) 5-6 bis (4-ácido fenol sulfônico) – 1,2,4, triazina, 0,5 mM) originando uma solução magenta que absorve a 560 nm.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 x g, por 5 min, a 4°C.

A uma alíquota de 25 μL de plasma foram adicionados 75 μL de solução redutora. A amostra teste foi incubada a 37°C, por 10 min, e a leitura foi realizada a 560 nm. Na seqüência, 8 μL de ferrozina foram adicionados à amostra, e uma nova leitura foi realizada. Para o branco, 25 μL de água foram utilizados, e para o cromatograma padrão, 25 μL de solução estoque contendo 200 $\mu\text{cg/dL}$ de ferro, e a reação seguiu como para o plasma.

Para os cálculos, considerou-se

$$\frac{(A_{\text{plasma}} - A_{\text{branco}}) \times 200}{A_{\text{padrão}}} \quad (\mu\text{cg/dL ferro})$$

3.1.14. Análise da atividade de SOD

As análises de SOD foram empregando-se um gerador não enzimático de $O_2^{\bullet-}$, como descrito a seguir. O microensaio de SOD foi baseado na monitoração espectrofotométrica do $O_2^{\bullet-}$ mediado pela redução do nitro azul tetrazólio (NBT) por uma mistura aerada de NADH e fenazina metossulfato (PMS), que gera $O_2^{\bullet-}$ quimicamente em pH não ácido (Ewing; Janero, 1995). O ensaio foi conduzido em um leitor de microplacas automatizado de 96 poços a 560 nm.

Para as análises, os homogenatos foram preparados em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, seguindo-se a proporção de 200 mg tecido/1mL solução, e as amostras de fígado e cérebro foram diluídas 80 e 40 x, respectivamente.

Uma alíquota de 200 μ L de uma solução A foi adicionada a 25 μ L de tampão fosfato ou amostra, e a 25 μ L de uma solução B. As amostras foram analisadas em duplicata, a 25°C, durante 2 min (leituras a cada 24 s), em microplacas e leitor de ELISA.

A solução A continha 50 μ L de EDTA 0,1 M (em NaOH 3M), 20,4 mg de NBT, e 3,5 mg de NADH. Estas proporções foram para 50 mL de solução, que foi preparada em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4.

Para a solução B, 2,5 mg de PMS foram diluídos em 2,5 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,4. Cem μ L desta solução foram adicionados a 9,9 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 e a 10 μ L de EDTA 0,1 M (diluição de 100x). As soluções A e B foram preparadas na hora da análise, mantidas em gelo e protegidas da luz.

Após as leituras, as amostras foram analisadas quanto ao teor de proteína.

3.1.15. Determinação da atividade da GPx

A atividade da GPx foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Wendel (1981). O microensaio da GPx foi baseado na detecção da oxidação do NADPH por GSSG, na presença de GSSG redutase. A atividade da GPx é acoplada ao consumo estequiométrico de NADPH. Os ensaios foram conduzidos em um leitor de microplaca de 96 poços automatizado, em 340 nm.

Para as análises, os homogenatos foram preparados em tampão fosfato de sódio, 200 mM, pH 7,4, seguindo-se a proporção de 100 mg tecido/1 mL solução, e centrifugados a 15000 x g por 30 min a 4°C.

Após a centrifugação, as amostras foram derivatizadas adicionando-se a 80 µL da amostra, 40 µL de solução transformante e aguardando-se 5 min à temperatura ambiente. Esta etapa permite que os grupos heme da hemoglobina sejam transformados em grupos meta-ciano (meta-ciano-hemoglobina) e perca a atividade peroxidásica. O reagente transformante contém KCN 4,5 mM/ K₃[Fe(CN)₆] 0,45 mM em tampão fosfato de potássio 0,25 M pH 7,0. A solução foi preparada no momento dos ensaios, a partir das duas soluções-estoque de cianeto e ferricianeto misturadas em partes iguais (1:1).

Para o ensaio, a uma alíquota de 35 µL de amostra transformada foram adicionados 10 µL de NaN₃ 2,5 mM (em tampão de ensaio: EDTA 6,3 mM em tampão fosfato 0,2 M pH 7,5), 10 µL de NADPH 1,2 mM (em bicarbonato 0,5%), 10 µL de GSH 10 mM (em ácido metafosfórico 5%) e 10 µL da GSSG redutase 2,5 U/mL (em tampão de ensaio). A solução final foi agitada e incubada por 10 min a 37°C, e a reação foi iniciada com 25 µL de *terc*-butilhidroperóxido (TBHP 4,8 mM).

As amostras foram lidas em duplicata, a 37°C, durante 8 min (leituras a cada 24 s).

Para o branco foram utilizados 35 µL de tampão de ensaio

Em paralelo, foram dosadas as proteínas da amostra e os resultados da atividade de GPx foram expressos como nmols de NADPH consumido/min/mg de proteína ($\epsilon_{\text{NADPH}/340 \text{ nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

3.1.16. Determinação de proteína

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford (1976). As análises foram feitas em duplicata, utilizando-se como padrão uma curva obtida com concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA).

Uma parte das análises foi realizada pelo método convencional, e a outra em microplacas.

Para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford em microplacas, 155 µL de água e 5 µL de amostra (diluição de 40x para o cérebro, e de 100x para o fígado) foram adicionados nas microplacas, seguido da adição de 40 µL do reagente de Bradford. Após agitação das amostras por 10 s, as leituras foram realizadas em leitora de ELISA, a 595 nm, em temperatura ambiente, em um período de até 20 min após o início da reação. As amostras foram lidas em duplicata.

A curva padrão foi preparada a partir de uma solução de BSA a 0,1 mg/mL em água, da seguinte maneira: 0, 4, 8, 12, 16, 20, 30 e 40 µL de BSA foram adicionados a 160, 156, 152, 148, 144, 140, 130 e 120 µL de água, respectivamente, e a 40 µL de reagente de Bradford. As leituras foram feitas como descrito para as amostras.

3.1.17. Análise histológica

A caracterização morfológica dos tecidos hepático e cerebral foi feita por técnicas clássicas de microscopia de luz e eletrônica. Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Professora Estela Bevilacqua, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

3.1.17.1. Análise por microscopia eletrônica de transmissão

Para o preparo das amostras, foi indicada a fixação por perfusão sanguínea. Para a perfusão, após anestesia dos animais com Ketamina e Xilazima (2:1), expôs-se a cavidade peritoneal e torácica dos animais, deixando livre o acesso ao coração. Introduziu-se uma cânula no ventrículo esquerdo e fez-se um picote na aurícula direita para permitir a limpeza dos tecidos através da perfusão de solução salina (em pH fisiológico) e a remoção da circulação sanguínea, respectivamente. Posteriormente, procedeu-se à fixação dos tecidos com a solução fixadora. A pressão das soluções perfundidas foi controlada por uma bomba peristáltica, regulada de maneira que a pressão de injeção da solução não excedesse a pressão do sangue. A solução fixadora continha glutaraldeído 2,5% v/v, em tampão fosfato de sódio 0,2 M e pH 7,2. Após a perfusão, foram obtidas amostras de cérebro e fígado. A pós-fixação se deu com a solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão PBS 0,1 M, pH 7,4 por 1 h, a 4° C. Para o processamento das amostras, as peças foram lavadas em tampão fosfato de sódio salina (PBS) 0,1 M pH 7,2, e desidratadas em etanol em série crescente (50, 70, 85, 95 e 100%), permanecendo 15 min em cada solução. Para a solução a 100%, este procedimento foi realizado 3 vezes. Posteriormente as amostras passaram por dois banhos de óxido de propileno (1:1, v/v, por 15 min, e 1:2, v/v por 1 h, respectivamente), por um banho de óxido

puro e por dois banhos em óxido resina SPURR (Spurr Embedding Kit – Lad Research Industries – Vermont) (1:1 e 1:2, v/v, respectivamente) por 1 h cada. Imergiu-se então as peças em resina, e após polimerização por 72 h em estufa a 60°C e ultramicrotomia (~60 nm; ultramicrotomo Ultracut R., Leica, USA), os cortes foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% por 20 min e em solução de citrato de chumbo 0,5% por 10 min. As amostras foram observadas e documentadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL-100 CX (JEOL, Tokyo, Japan).

3.1.17.2. Análise histoquímica e imunohistoquímica por microscopia de luz: marcação para ferro, ferritina e proteínas carboniladas

Fragmentos hepáticos e de cérebro foram imediatamente removidos do corpo dos animais mortos e fixados por imersão em paraformaldeído a 4% em PBS 0,1 M pH 7,4 e em *metacan* (clorofórmio 30% + metanol 60% + ácido acético 10%) para análise histoquímica e imunohistoquímica ao microscópio de luz convencional. Sob estereomicroscópio, os fragmentos banhados em solução fixadora foram seccionados. Após 24 h na solução fixadora, a 4° C, os materiais foram rotineiramente processados para inclusão em parafina Histosec®. Inicialmente os materiais foram lavados em água corrente durante 1 h. Em seguida processou-se a desidratação em série crescente de etanóis (70%, 85%, 95% e 100%) com 2 banhos de 15 min em cada um deles. Seguiram-se 3 banhos de 4 h em xilol, e 2 banhos em parafina líquida, por 1 e 4 h, respectivamente. As peças foram processadas em parafina (Histosec®), e obtidos cortes histológicos de 5 µm. Esses cortes foram montados em lâminas contendo adesivo poli-L-lisina ou silano, e incubados por 20

min em H_2O_2 a 1% em PBS 0,1 M para bloquear a atividade da peroxidase endógena.

a) Detecção histoquímica de ferro (II)/(III)

As secções foram incubadas por 15 h a temperatura ambiente em ferrocianeto de potássio a 7% em solução de HCl a 3%, e, na sequência, em H_2O_2 a 0,015% em 0,75 mg/mL de 3,3–diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) por 5 min (Schroeter et al., 2004).

b) Análise imunohistoquímica de ferritina

Ferritina, a proteína intracelular de armazenagem de ferro, foi localizada por reações convencionais de imunohistoquímica. Em síntese, as secções foram incubadas a 37°C por 1 h com anticorpo para ferritina policlonal de galinha anti-humano (Geneway) diluído 1:200 em PBS. O anticorpo primário foi detectado usando-se anticorpo policlonal de coelho contra IgY de galinha (Geneway, diluído 1:200 em PBS) complexado para peroxidase. DAB foi utilizado como um cromógeno. As secções foram contracoradas com hematoxilina de Mayer ou solução de verde de metila (a 0,5% em tampão acetato de sódio 0,1M), secado e embebido em glicerol.

c) Análise imunohistoquímica de proteínas carboniladas.

Como marcador de estresse oxidativo, proteínas carboniladas também foram imunolocalizadas nas amostras de fígado e cérebro, como descrito por Astruc e colab. (2007), com modificações. Como um derivatizador de grupos carbonilas, foi utilizada 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), enquanto as formas conjugadas de

proteínas carboniladas foram detectadas usando-se um anticorpo anti-DNP (dinitrofenil). Após hidratação e bloqueio da peroxidase endógena, as secções foram incubadas à temperatura ambiente por 16 h em DNPH 0,02% em PBS 20 mM pH 5,9. As secções foram incubadas em PBS contendo 10% de soro de cabra, por 10 min, em anticorpo primário policlonal de coelho anti-DNP (Sigma Chemical Co., St Louis) diluído em PBS na proporção de 1:100, e em anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado à peroxidase (Upstate Cell Signaling, 7074, UK) (diluído em PBS na proporção de 1:100 em PBS, por 1 h, a 25°C). Finalmente, a reação com peroxidase foi revelada por 5 min em temperatura ambiente em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6, contendo DAB 0,025% e H₂O₂ 0,003%. Após a secagem, os cortes histológicos foram contracolorados com hematoxilina de Mayer ou solução de verde de metila (a 0,5% em tampão acetato de sódio 0,1M), e as lâminas foram montadas em glicerol e cobertas com a lamínula de vidro.

3.2. Mecanismos de danos neurológicos induzidos a ratos por SAME e/ou ALA

– Tratamento crônico por 30 dias

3.2.1. Protocolo de estudo

Participaram deste estudo, 40 ratos machos da linhagem Wistar (Charles River, Boston, MA, USA), com 30 dias pós-natal. Durante o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas, em condições controladas de temperatura (25°C) e luz (ciclos de claro-escuro de 12 h, com início da luz às 7 h). Os animais foram administrados intraperitonealmente, a cada 48h, durante 30 dias, com 10 mg SAME/kg peso corporal (grupo CII), 40 mg SAME/kg peso corporal (grupo CIII), 40 mg ALA/kg peso corporal (grupo CIV) ou 30 mg ALA + 10 mg SAME/kg peso

corporal (grupo CV) em solução salina (pH 7,0-7,4). Os ratos controles foram administrados com 0,67 mL de solução salina/kg peso corporal (grupo CI). O volume de cada injeção não excedeu 0,2 mL. Todos os procedimentos animais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Uso e Trato dos Animais da Dartmouth Medical School e estavam em concordância com o guia e com as recomendações dos Institutos Nacionais de Saúde e da Associação Médica Veterinária Americana.

Durante o tratamento os animais receberam água e ração *ad libitum*.

3.2.2. Análises pelo sistema SDS

Os animais foram anestesiados com isoflurano 2% (Webster Veterinary, Patterson Company), e as traqueostomias foram realizadas para conferir ventilação artificial. Um catéter foi introduzido na artéria femoral para que medidas contínuas da pressão sanguínea e da taxa de batimento cardíaco fossem realizadas, permitindo ainda a obtenção de amostras de sangue para as análises dos níveis plasmáticos de O_2 , CO_2 e da saturação de hemoglobina durante o estudo. Um segundo catéter foi colocado na veia femoral para a infusão de relaxante muscular (brometo de pancurônio, Hospira Inc.).

Preparação do córtex cerebral: com uma broca em baixa rotação, o escalpo foi removido e o crânio sobre o córtex parietal foi afinado até a transparência, para permitir o acesso óptico. O córtex foi selado com um adesivo (cola) à base de cianocrilato (Loctite®460™, Henkel), sendo preservada uma área de aproximadamente 1 mm^2 na extremidade da área afinada do crânio sem o adesivo, delimitando a área para a aplicação de KCl concentrado à duramáter, o qual induziria a DDC.

Duas DDCs foram induzidas em cada grupo de animais. Foi testada a hipótese de que o aumento no $CMRO_2$ na onda frontal seria menor em animais tratados quando comparado ao controle, o que indicaria que a hiperoxidação seria maior nos animais tratados quando comparado ao controle.

O estudo foi conduzido como descrito: *a)* os valores basais para CBF, $CMRO_2$, $SmcO_2$ e a concentração absoluta de cit c foram registrados, *b)* uma anoxia de 45 s foi induzida e os valores para CBF, $SmcO_2$ e cit c foram registrados; após, aguardou-se até que os níveis dos parâmetros avaliados fossem restabelecidos aos níveis basais, *c)* a primeira DDC foi induzida através da aplicação de KCl e os dados foram registrados, *d)* após 10 min, uma segunda DDC foi realizada, os resultados foram registrados, e novamente aguardou-se até que os níveis dos parâmetros avaliados fossem restabelecidos, *e)* o ensaio foi finalizado após a realização de uma nova anoxia, por 45 s. Previamente ao início de cada subetapa, amostras de sangue eram coletadas e os parâmetros bioquímicos para $SmcO_2$ e concentração de CO_2 eram avaliados para garantir a normalidade do estado fisiológico dos animais. A primeira anoxia foi conduzida para oferecer informações relativas à capacidade máxima de redução do cit c e ao perfil da fase hiperoxidativa (estado redox do cit c) antes das DDCs serem induzidas pela aplicação do KCl. Ela também provisionou dados que permitiram a determinação da concentração total de cit c. A anóxia final ofereceu informações relativas à capacidade máxima de redução do cit c e ao perfil da fase hiperoxidativa após o tecido cerebral ter sido desafiado pelas DDCs.

Os ensaios foram conduzidos sob anestesia com isoflurano.

Estes experimentos foram conduzidos na Dartmouth Medical School, sob supervisão do Professor Roger Springett.

3.2.3. Ensaios de reatividade vascular da aorta

Para este estudo, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com peso entre 250 e 300 g. Duas horas antes do experimento, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de ALA, na dose de 40 mg/kg peso corporal.

Duas horas após a injeção, os animais foram anestesiados e foram realizadas toractomia e dissecação, e a aorta torácica foi removida, limpa e seccionada em fragmentos de 4-5 mm. Os anéis de aorta foram colocados em cubas para órgão isolado aquecidas a 37°C e aeradas com carbogênio (95% de O₂, 5% de CO₂). As cubas estavam preenchidas com 10 mL de solução de Krebs-Henseleit (contendo CaCl₂ 1,6 mM, MgSO₄ 1,17 mM, EDTA 0,026 mM, NaCl 130 mM, NaHCO₃ 14,9 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,18 mM e glicose 11 mM). Estes segmentos permaneceram suspensos por duas hastes de aço inoxidável, com uma tensão de 1,5 g, por um período de estabilização de 60 min. Aos 20 e 40 min, a solução de Krebs foi trocada e a tensão reajustada. A haste inferior foi fixada na própria cuba de órgão isolado e a superior permaneceu conectada a um transdutor de tensão (BIOPAC System TSD 105A) (Barbeiro, 2005), onde, após o período de estabilização, os anéis da aorta foram incubados com 2 mM de ALA (4 doses consecutivas de 0,25 mM de ALA, a cada 5 min, e 1 dose final de 1 mM de ALA), por 50 min, e foram realizadas curvas de dose resposta (CDR) a acetilcolina (1×10^{-8} – 3×10^{-6} M). Como controle, foram obtidas curvas de CDR a acetilcolina, na ausência de ALA.

Esta parte do estudo foi realizada em colaboração com o Dr. Hermes Vieira Barbeiro, da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP).

3.2.4. Quantificação de superóxido

Após anestesia, toracotomia e dissecação dos animais, a aorta torácica foi removida, limpa e seccionada em fragmentos de 8-10 mm. Os anéis de aorta foram colocados em cubas para órgão isolado com solução de Krebs-Henseleit, aquecidas a 37°C e aeradas com carbogênio por 20 min (período de estabilização). Após este período, os anéis foram transferidos para as cubas do luminômetro Berthold 9505 (EG&G Instruments GmbH, Munique, Alemanha), e incubados com 5×10^{-4} M de lucigenina, um reagente quiluminescente quando exposto a peróxidos e outros oxidantes, a 37°C, por 5 min (Barbeiro, 2005). Os anéis foram então incubados com ALA 2mM, por 10 min, e a contagem foi realizada por 20 min. Os resultados são expressos em função do peso seco das artérias (cpm/mg de tecido).

Nestes experimentos, as artérias foram dissecadas em duas para que uma das metades servisse como controle. Assim, uma das metades foi incubada com lucigenina, e a outra, com lucigenina e ALA (2 mM).

Estes experimentos também foram conduzidos em colaboração com o Dr. Hermes Vieira Barbeiro, da FMUSP.

3.3. Análise estatística

Os dados experimentais foram testados para diferenças estatisticamente significantes por ANOVA de medidas repetidas; análises *pos hoc* para comparações individuais foram conduzidas pelos testes de Tukey (análise paramétrica), Kruskal-Wallis ou Dunn (análises não paramétricas) ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad InStat. O nível de significância foi de 5%.

Para facilitar a identificação dos grupos experimentais desta tese de doutoramento, o **Quadro 1** descreve os grupos de acordo com a sua condição de tratamento.

Quadro 1. Grupos experimentais conforme sua condição de tratamento.

Estudo		Grupos	Número de injeções	Intervalo entre as injeções
Modelo de estudo de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA	Tratamento agudo por 36 h	AI: 0,67 mL NaCl/kg peso	3	18 h
		AII: 10 mg SAME/kg peso		
		AIII: 40 mg SAME/kg peso		
		AIV: 80 mg SAME/kg peso		
		AV: 40 mg SA/kg peso		
		AVI: 40 mg ALAME/kg peso		
		AVII: 40 mg ALA/kg peso		
	Tratamento agudo por 18 h	BI: 0,67 mL NaCl/kg peso	3	8 e 10 h, respectivamente
		BII: 40 mg SAME/kg peso		
		BIII: 40 mg ALA/kg peso		
		BIV: 40 mg ALAME/kg peso		
		BV: 30 mg ALA + 10 mg SAME/kg peso		
		BVI: 10 mg SAME/kg peso		
Mecanismos de danos neurológicos induzidos a ratos	Tratamento crônico por 30 dias	CI: 0,67 mL NaCl/kg peso	15	48 h
		CII: 10 mg SAME/kg peso		
		CIII: 40 mg SAME/kg peso		
		CIV: 40 mg ALA/kg peso		
		CV: 30 mg ALA + 10 mg SAME/kg peso		

4. RESULTADOS

4.1. Modelo de estudo de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, baseado na administração de SAME – Tratamento agudo por 36 h

4.1.1. Mensuração dos precursores do heme e da atividade da ALA-D

Para validar um modelo de estudo para porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, via inibição da enzima ALA-D, os níveis de ALA e COPRO, bem como a atividade da ALA-D em resposta a dose de SAME administrada nos animais, foram avaliados. Em resposta à inibição de ALA-D por SAME, os níveis de ALA aumentaram significativamente no plasma (7-9 vezes), no fígado (16-24 vezes), no cérebro (5-6 vezes), e na urina (12-13 vezes) de todos os grupos tratados (AII a AIV) quando comparado ao grupo controle (AI) (**Tabela 3**). Uma tendência geral pode ser observada, embora independente de uma relação dose-resposta para o SAME, para maiores níveis de ALA com as doses maiores de SAME (inibidor da ALA-D). Como esperado, tanto as concentrações urinárias de COPRO (**Tabela 4**), uma das porfirinas *downstream* na via do heme, quanto a atividade da ALA-D hepática e cerebral (**Tabela 5**) estavam significativamente reduzidas nos animais tratados com SAME. Um aumento significativo do *clearance* do ALA foi encontrado para o grupo AII em relação ao controle ($p<0,05$) e ao grupo AIII ($p<0,001$), e para o grupo AIV quando comparado ao grupo AIII ($p<0,01$) (**Tabela 4**).

O SAME mostrou-se, assim, constituir uma droga adequada para o estabelecimento de estados porfíricos em animais experimentais.

Um aumento significativo do nível médio de ALA no plasma foi observado para os animais dos grupos AIII e AVII ($p<0,001$) em relação ao controle (grupo AI).

Os dados para os níveis de ALA no fígado confirmam que tanto SAME quanto SA apresentam um efeito inibidor sobre ALA-D, promovendo o acúmulo intracelular de ALA de maneira mais efetiva do que quando ALA exógeno é administrado (**Tabela 6**). Interessantemente, os efeitos de SAME e SA em tecido hepático parecem ser similares entre si, e ainda, superiores aos do ALA exógeno. Provavelmente, a estratégia de enriquecer os tecidos metabolicamente com ALA através da injeção de SAME é mais eficaz que através de injeção direta de ALA, em que não se pode garantir incorporação total deste metabólito. Um aumento significativo do nível médio de ALA no fígado foi observado para os animais dos grupos AIII, AV ($p < 0,001$) e AVII ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (AI), para os animais dos grupos AIII e AV em relação aos dos grupos AVI e AVII ($p < 0,001$).

Tabela 3. Níveis médios de ALA no plasma, fígado, cérebro e urina para todos os grupos estudados. Os animais do grupo AI foram tratados com solução salina (0,67 mL/kg peso corporal), enquanto os animais dos grupos AII, AIII e AIV foram tratados com 10, 40 e 80 mg SAME/kg peso corporal, respectivamente. Dados mostrados como média ($\pm$ DP).

Níveis de ALA (unidade; n)	Grupos (mg SAME/kg peso corporal)			
	AI (controle)	AII (10 mg)	AIII (40 mg)	AIV (80 mg)
Plasma (μ mol/mL; n=8)	0,48 ($\pm$ 0,04)	3,30 ($\pm$ 0,80)*	3,99 ($\pm$ 0,45)*	4,39 ($\pm$ 0,93)*, #
Fígado (nmol/mg proteína; n=8)	1,92 ($\pm$ 0,35)	30,83 ($\pm$ 7,36)*	42,73 ($\pm$ 4,38) [#]	45,80 ($\pm$ 11,74) ^{#, δ}
Cérebro (nmol/mg proteína; n=5)	2,53 ($\pm$ 1,25)	11,59 ($\pm$ 2,24)*	14,23 ($\pm$ 2,45)*, #	11,74 ($\pm$ 1,83)*
Urina (entre a 2 ^a . e a 3 ^a . injeção (μ mol/mL; n=8)	4,15 ($\pm$ 1,69)	49,93 ($\pm$ 5,3)*	52,26 ($\pm$ 9,58)*	54,26 ($\pm$ 8,44)*, #

Plasma: * $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do controle (grupo AI). # $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do grupo AII (10 mg SAME/kg peso corporal). Comparações múltiplas entre os grupos foram realizadas usando-se o teste de Tukey-Kramer.

Fígado: * $p < 0,05$ é estatisticamente diferente do controle (grupo AI). # $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do grupo AI. $\delta p < 0,05$ é estatisticamente diferente do grupo AII (10 mg SAME/kg peso corporal). Comparações múltiplas entre os grupos foram realizadas usando-se o teste de Kruskal-Wallis.

Cérebro: * $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do controle (grupo AI). # $p < 0,05$ é estatisticamente diferente dos grupos AII (10 mg SAME/kg peso corporal) e AIV (80 mg SAME/kg peso corporal). Comparações múltiplas entre os grupos foram realizadas usando-se o teste de Tukey-Kramer.

Urina: * $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do controle (grupo AI). # $p < 0,05$ é estatisticamente diferente do grupo AII (10 mg SAME/kg peso corporal). Comparações múltiplas entre os grupos foram realizadas usando-se o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 4. Porcentagem média da redução dos níveis de COPRO urinária para todos os grupos tratados. Valores médios ($\pm$ DP) do *clearance* renal de ALA (Cl_{ALA}) para todos os grupos tratados. Os animais do grupo AI foram tratados com solução salina (0,67 mL/kg peso corporal), enquanto os animais dos grupos AII, AIII e AIV foram tratados com 10, 40 e 80 mg SAME/kg peso corporal, respectivamente. n=5.

Grupo	Redução dos níveis de COPRO na urina (%)	Cl_{ALA} (mL/min) (média $\pm$ DP)
AI		0,24 ($\pm$ 0,14)
AII	90 (variando de 72 a 104) ^{*,#,δ}	0,39 ($\pm$ 0,18) ^{a,b}
AIII	65 (variando de 51 a 80) ^{*,#}	0,25 ($\pm$ 0,08)
AIV	79 (variando de 50 a 118) ^{*,#}	0,33 ($\pm$ 0,13) ^c

COPRO urinária: *Os dados foram normalizados subtraindo-se os valores encontrados para o grupo controle. # $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do controle (grupo AI). $\delta p < 0,05$ é estatisticamente diferente do grupo AIII e AIV (40 e 80 mg SAME/kg peso corporal, respectivamente). Comparações múltiplas entre os grupos de tratamento foram realizadas usando-se o teste de Tukey-Kramer.

Clearance do ALA: ap $<0,05$ é estatisticamente diferente do controle (grupo AI). bp $<0,01$ é estatisticamente diferente do grupo AIII (40 mg SAME/kg peso corporal). cp $<0,01$ é estatisticamente diferente do grupo AIII. Comparações múltiplas entre os grupos de tratamento foram realizadas usando-se o teste de Kruskal Wallis.

Tabela 5. Análise da atividade da ALA-D no fígado e no cérebro dos animais dos grupos AI, AII, AIII e AIV. Os animais do grupo AI foram tratados com solução salina (0,67 mL/kg peso corporal), enquanto os animais dos grupos AII, AIII e AIV foram tratados com 10, 40 e 80 mg SAME/kg peso corporal, respectivamente. n=6.

Grupo	% de atividade da ALA-D	
	Fígado	Cérebro
AI	100	100
AII	5,63 ^{a,d}	ND ^{*A}
AIII	4,18 ^{b,d}	ND ^{*A}
AIV	0,98 ^c	ND ^{*-18%} ^A

ap<0,05 é estatisticamente diferente do controle (grupo AI). *bp*<0,01 é estatisticamente diferente do grupo AI. *cp*<0,001 é estatisticamente diferente do grupo AI. *dp*<0,001 é estatisticamente diferente do grupo AIV (80 mg SAME/kg peso corporal). *Ap*<0,001 é estatisticamente diferente do controle (grupo AI). Comparações múltiplas entre os grupos de tratamento foram realizadas usando-se o teste de Kruskal Wallis. *ND = não detectável.

Tabela 6. Níveis médios de ALA no plasma e fígado dos animais tratados com SA, ALAME e ALA. Os animais do grupo AI foram tratados com solução salina (0,67 mL/kg peso corporal), enquanto os animais dos grupos AIII, AV, AVI e AVII foram tratados com 40 mg/kg peso corporal de SAME, SA, ALAME e ALA, respectivamente. Os dados estão representados pela média ($\pm$ DP).

Níveis de ALA (unidade; n)	Controle	Tratamento (40 mg/kg peso corporal)			
		SAME	SA	ALAME	ALA
Plasma (μ mol/mL; n=5)	1,23 ($\pm$ 0,12)	9,49 ($\pm$ 1,43) ^{*,#,δ}	3,20 ($\pm$ 0,44)	2,06 ($\pm$ 0,75)	10,50 ($\pm$ 2,38) ^{*,#,δ}
Fígado (nmol/mg proteína; n=5)	1,81 ($\pm$ 0,50)	42,82 ($\pm$ 8,05) ^{*,#}	45,78 ($\pm$ 8,43) ^{*,#}	2,15 ($\pm$ 0,95)	9,93 ($\pm$ 2,31) _{ω,δ}

Plasma: * $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do controle (grupo AI). $\delta p < 0,05$ é estatisticamente diferente do grupo AV (40 mg SA/kg peso corporal).

#, $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do grupo AVI (40 mg ALAME/kg peso corporal). Comparações múltiplas entre os grupos de tratamento foram realizadas usando-se o teste de Kruskal-Wallis.

Fígado: * $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do controle (grupo AI). $\omega p < 0,05$ é estatisticamente diferente do grupo AI. # $p < 0,001$ é estatisticamente diferente dos grupos AVI e AVII (40 mg ALAME e 40 mg ALA/kg peso corporal, respectivamente). $\delta p < 0,01$ é estatisticamente diferente do grupo AVI. Comparações múltiplas entre os grupos de tratamento foram realizadas usando-se o teste de Tukey-Kramer.

4.1.2. Mensuração dos parâmetros de desbalanço redox

Análises em tecido hepático

Os níveis de proteínas carboniladas nos tecidos hepáticos de ratos foram amplamente distribuídos entre cada grupo tratado com SAME. Um aumento significativo da concentração de proteínas oxidadas (2 vezes) foi encontrado apenas para o grupo AII ($p < 0,001$) (**Tabela 7**).

O MDA produzido pela peroxidação lipídica foi significativamente maior apenas no tecido hepático dos animais do grupo AIII quando comparado ao controle ($p < 0,001$) (**Tabela 7**).

Por outro lado, a taxa de GSH/GSH+GSSG, considerado por muitos autores como um parâmetro confiável de avaliação do balanço redox celular (Sies, 1999), não foi diferente para os animais tratados (**Tabela 7**).

Os níveis hepáticos de ferro total não hemínico aumentaram aproximadamente 50% diante do tratamento com 40 mg SAME/kg peso corpóreo quando comparado ao controle e ao grupo AI (**Tabela 7**).

Nenhuma diferença foi observada para atividade de SOD no fígado (**Tabela 7**). Por outro lado, houve um aumento da atividade de GPx para o grupo AIII quando comparado ao controle (**Tabela 7**).

Análises em tecido cerebral

Para os grupos tratados, nenhuma diferença foi encontrada para os níveis de peroxidação lipídica ($p = 0,9412$) (**Tabela 8**).

A taxa de GSH/GSH+GSSG foi amplamente distribuída entre cada grupo tratado com SAME. Um aumento significativo da concentração da razão

GSH/GSH+GSSG foi encontrado apenas para o grupo AIV quando comparado ao controle (grupo AI) ($p < 0,05$) (**Tabela 8**).

Para o conteúdo de ferro total não hemínico, nenhuma diferença foi observada entre os grupos (**Tabela 8**).

Nenhuma diferença foi observada para a atividade de SOD e GPx (**Tabela 8**). Os dados para GPx oferecem suporte aos achados para as taxas de GSH/GSH+GSSG descritas para o cérebro (exceto para o grupo AIV).

Tabela 7. Níveis médios de proteínas carboniladas, peroxidação lipídica, taxa GSH/(GSH+GSSG), quantidade de ferro total não hemínico, atividade de SOD e GPx, para o tecido hepático de todos os grupos estudados. Os animais do grupo AI foram tratados com solução salina (0,67 mL/kg peso corporal), enquanto os animais dos grupos AII, AIII e AIV foram tratados com 10, 40 e 80 mg SAME/kg peso corporal, respectivamente. Os dados são mostrados como média ($\pm$ DP).

Biomarcadores de desbalanço oxidativo	Grupos (mg SAME/kg peso corporal)			
	Fígado			
	AI (controle)	AII (10 mg)	AIII (40 mg)	AIV (80 mg)
Proteínas carboniladas (nmol/mg proteína; n=6)	6,04 ($\pm$ 2,10)	13,78 ($\pm$ 3,99)*	5,34 ($\pm$ 1,18)	4,99 ($\pm$ 0,68)
Peroxidação lipídica (MDA) nmol/mg proteína; n=6)	2,63 ($\pm$ 0,40)	2,92 ($\pm$ 0,60)	3,41 ($\pm$ 0,42)*.#	2,83 ($\pm$ 0,24)
Taxa GSH/(GSH+GSSG) (n=5)	0,22 ($\pm$ 0,04)	0,23 ($\pm$ 0,10)	0,23 ($\pm$ 0,05)	0,25 ($\pm$ 0,08)
Ferro total não hemínico (μ g Fe/mg tecido; n=8)	0,50 ($\pm$ 0,15)	0,48 ($\pm$ 0,10)	0,75 ($\pm$ 0,24)**	0,59 ($\pm$ 0,15)
Atividade de SOD (U/mg proteína; n=8)	54,11 ($\pm$ 8,27)	52,74 ($\pm$ 12,28)	48,80 ($\pm$ 10,04)	56,31 ($\pm$ 5,40)
Atividade de GPx (nmols NADPH/min.mg proteína; n=7)	2,19 ($\pm$ 1,19)	3,35 ($\pm$ 1,36)	4,82 ($\pm$ 1,24)*	3,48 ($\pm$ 1,29)

Proteínas carboniladas no fígado: * $p < 0,001$ é estatisticamente diferente dos grupos controle (AI), AIII e AIV (40 e 80 mg SAME/kg peso corporal, respectivamente). Comparações múltiplas entre os grupos de tratamento foram realizadas usando-se o teste de Tukey-Kramer.

MDA hepático: * $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do grupo controle (AI). # $p < 0,05$ é estatisticamente diferente do grupo AIV (80 mg SAME/kg peso corporal). Comparações múltiplas entre os grupos de tratamento foram realizadas usando-se o teste de Tukey-Kramer.

Ferro total não hemínico no fígado: ** $p < 0,05$ é estatisticamente diferente do grupo controle (AI) e AII (10 mg SAME/kg peso corporal). Comparações múltiplas entre os grupos de tratamento foram realizadas usando-se o teste de Tukey-Kramer.

Atividade de GPx: * $p < 0,01$ é estatisticamente diferente do grupo controle (AI). Comparações múltiplas entre os grupos de tratamento foram realizadas usando-se o teste de Tukey-Kramer.

Tabela 8. Níveis médios de proteínas carboniladas, peroxidação lipídica, taxa GSH/(GSH+GSSG), quantidade de ferro total não hemínico, atividade de SOD e GPx, para o tecido cerebral de todos os grupos estudados. Os animais do grupo AI foram tratados com solução salina (0,67 mL/kg peso corporal), enquanto os animais dos grupos AII, AIII e AIV foram tratados com 10, 40 e 80 mg SAME/kg peso corporal, respectivamente. Os dados são mostrados como média ($\pm$ DP).

Biomarcadores de desbalanço oxidativo	Grupos (mg SAME/kg peso corporal)			
	Cérebro			
	AI (controle)	AII (10 mg)	AIII (40 mg)	AIV (80 mg)
Peroxidação lipídica (MDA) nmol/mg proteína; n=6)	6,15 ($\pm$ 1,67)	6,51 ($\pm$ 1,85)	6,44 ($\pm$ 1,56)	6,59 ($\pm$ 1,03)
Taxa GSH/(GSH+GSSG) (n=5)	0,25 ($\pm$ 0,11)	0,33 ($\pm$ 0,14)	0,40 ($\pm$ 0,13)	0,55 ($\pm$ 0,16)*
Ferro total não hemínico (μ g Fe/mg tecido; n=8)	0,07 ($\pm$ 0,02)	0,07 ($\pm$ 0,04)	0,06 ($\pm$ 0,01)	0,06 ($\pm$ 0,02)
Atividade de SOD (U/mg proteína; n=8)	2,69 ($\pm$ 0,75)	2,44 ($\pm$ 0,56)	3,08 ($\pm$ 0,64)	3,21 ($\pm$ 0,48)
Atividade de GPx (nmols NADPH/min.mg proteína; n=8)	14,48 ($\pm$ 5,62)	14,32 ($\pm$ 2,71)	17,35 ($\pm$ 4,92)	11,65 ($\pm$ 3,77)

Taxa GSH/(GSH+GSSG) no cérebro: * $p < 0,05$ é estatisticamente diferente do controle (grupo AI). Comparações múltiplas entre os grupos de tratamento foram realizadas usando-se o teste de Tukey-Kramer.

4.1.3. Ensaios histoquímicos e imunohistoquímicos

Análises em tecido hepático

As análises histológicas do fígado confirmaram a presença de depósitos de ferro nos hepatócitos através da reação do ferrocianeto de potássio intensificado pelo tetróxido de ósmio nos animais submetidos ao tratamento com SAME e nos animais do grupo controle. A presença de ferro, identificada por depósitos escuros, foi notavelmente maior no grupo All quando comparado ao controle e aos outros grupos experimentais (**Figura 1 A, E, I**). Esta informação conflui para o aumento de depósitos de ferro em biópsias de fígado de pacientes de PAI, relatado há muitas décadas por Biempica e colab. (1974). Em todos os grupos, a distribuição foi mais intensa na periferia do lóbulo hepático clássico, circundando a área periportal.

O DNP foi igualmente localizado no parênquima hepático em todos os grupos, embora a imunoreação tenha sido mais intensa no grupo All (**Figura 1 C, G, K**).

Como observado para as análises de detecção de ferro, o perfil de marcação da imunolocalização de ferritina foi fraca e uniformemente distribuído no parênquima hepático dos grupos controle, AIII e AIV, e particularmente intenso no grupo All (**Figura 1 B, F, J**).

Análises em tecido cerebral

Assim, como para o fígado, as análises histológicas do tecido cerebral confirmaram a presença de depósitos de ferro nos ratos submetidos ao tratamento com SAME e nos ratos do grupo controle. Os níveis de ferro também foram consideravelmente maiores nos animais do grupo All quando comparado ao controle e aos outros grupos experimentais (**Figura 2 A, E, I**).

Como no caso anterior, o DNP também foi localizado no tecido cerebral dos animais dos grupos All e AIII, embora a imunoreação tenha sido mais intensa no grupo All (**Figure 2F, J**), e o perfil da imunomarcção de ferritina foi fraco e uniformemente distribuído nos grupos controle, AIII e AIV, e particularmente intenso no grupo All (**Figura 2C, G, K, O**).

4.1.4. Análise ultraestrutural

Análises em tecido hepático

A análise ultraestrutural mostrou a preservação da arquitetura hepática e de características padrões dos hepatócitos em todos os espécimens. No grupo de animais controle o parênquima hepático mostrou-se formado por placas anastomosadas de hepatócitos limitando capilares sinusóides, ambos em disposição radial a partir de vênulas centrais (**Figura 3 A-B**). Em conjunto, estas estruturas assumem uma forma hexagonal e formam o lóbulo hepático clássico, que é limitado em suas extremidades distais por tecido conjuntivo, por onde correm ramos da artéria hepática, da veia porta e dutos biliares. No grupo controle (**Figura 3 A e B**), os hepatócitos contendo um ou dois núcleos são ricos em retículo endoplasmático granular e liso, e mitocôndrias. Peculiarmente, estas mitocôndrias exibem cristas em prateleira de formas e densidade variadas. Depósitos de glicogênio são comumente encontrados no citoplasma destas células, assim como algumas gotículas lipídicas (**Figura 3B**). Peroxisomas com nucleóide cristalino, cisternas do aparelho de Golgi e lisosomas não são abundantes, mas são sempre observados nas secções ultrafinas. Os núcleos exibem predomínio de eucromatina e nucléolos proeminentes são freqüentes. Canálculos biliares, espaços localizados entre as superfícies de contato de hepatócitos adjacentes, são estreitos e exibem projeções celulares de variadas

dimensões (**Figura 3A**). A estreita área entre hepatócitos e sinusóides, o espaço de Disse, encontra-se preenchido por tecido conjuntivo onde fibrilas colágenas são observadas. No espaço de Disse ainda encontramos células de forma estrelada, as células de Ito, com depósitos lipídicos em seu interior. Entremeando as células endoteliais dos sinusóides hepáticos observam-se macrófagos, aqui denominados de células de Kupffer.

Nenhuma alteração foi observada nas amostras de tecido hepático dos animais do grupo AII. A estrutura e a organização hepática estavam mantidas assim como a morfologia celular em seus vários aspectos (**Figura 3 C-D**). Ultra-estruturalmente, os hepatócitos não apresentaram alterações, o espaço de Disse estava preservado e as células endoteliais apresentavam aspecto normal (**Figura 3 C-E**). Ocasionais figuras de mielina foram observadas (**Figura 3 D-E**).

Embora a microscopia de luz não tenha mostrado alterações significativas nas amostras dos grupos AIII e AIV (**Figura 6 E-F**), modificações foram observadas em relação ao grupo controle na análise ultraestrutural, tal como observado anteriormente por Biempica e colab. (1974), em biópsia de fígado de pacientes de PAI. Após o tratamento com SAME, os achados mais importantes revelados pela análise em microscopia eletrônica foram as alterações no compartimento mitocondrial. Nos grupos AII and AIV (10 and 80 mg SAME/kg peso corporal, **Figuras 4B-D** e **5A-D**, respectivamente), a ultraestrutura hepática mostrou características similares àsquelas do grupo controle, com exceção para parte das mitocôndrias, que se apresentou ocasionalmente menor, de forma oval ou semi-oval, e com a eletrondensidade da matriz mitocondrial aumentada (**Figura 4C** e **5A, B** e **D**). Após o tratamento com 40 mg SAME/kg (grupo AIII, **Figura 4E-H**), as

mitocôndrias dos hepatócitos exibiram uma maior eletrondensidade da matriz mitocondrial, sugestiva de inclusões eletrondensas, predominantes sobre as mitocôndrias morfológicamente normais. Mitocôndrias com matrix eletronlucentes, porém com cristas rarefeitas (além das típicas mitocôndrias de matriz eletrondensa e cristas abundantes em prateleira ou tubulares) também foram observadas (**Figuras 4G e 5A e B**). Basicamente, os espécimens dos grupos AII, AIII e AIV também mostraram, ocasionalmente, um aumento discreto de inclusões lipídicas (**Figuras 4F e 5C**) e organelas do tipo heterofagosomas (**Figura 4D**), figuras de mielinas e dilatações atípicas e vacuolização das cisternas do retículo endoplasmático (**Figura 4G**). Não houve alterações significantes na estrutura nuclear dos grupos experimentais. Todos os espécimens mostraram núcleos eucromáticos com um nucléolo proeminente. As demais estruturas e organelas hepáticas não se mostraram alteradas.

Análises em tecido cerebral

A análise ultraestrutural mostrou a preservação da arquitetura e das características padrões do tecido cerebral em todos os espécimens (**Figura 7A-E**). Todos os grupos apresentaram morfologia normal nas células nervosas (inclusive nas regiões de sinapses), gliais e capilares (**Figura 7D e E**). No grupo controle (**Figura 7A**), as células apresentaram núcleo com nucléolo, cromatina e heterocromatina de distribuição normal, rica em mitocôndria. Após o tratamento com SAME, apenas alterações discretas foram observadas, e os achados mais importantes revelados pela análise em microscopia eletrônica foram as alterações no compartimento mitocondrial. Para os grupos AI (controle) (**Figura 7A**) e AII (**Figura**

7B e C), grânulos citoplasmáticos pequenos e eletrondensos foram observados, os quais eventualmente apresentam conteúdo heterogêneo sugestivo de inclusões citoplasmáticas. Após o tratamento com 40 e 80 mg SAME/kg (grupos AIII e AIV, respectivamente), eventuais mitocôndrias com perda de cristas e material eletrondenso em seu interior, podem ser observadas, especialmente para o grupo AIII (**Figura 7D**).

Figura 1. Localização de ferro (A, E, I), ferritina (B, F, J) e DNP (C, G, K) no fígado de ratos normais (controle) (A-C) ou tratados com SAME (10 mg, E-G; 40 mg I-K; 80 mg, inserção das figuras I-K). As marcações de ferro foram observadas como grânulos escuros e irregulares no citoplasma dos hepatócitos (setas). A densidade dos grânulos no parênquima hepático variou com o tratamento dos animais (A, E, I e inserções). Por outro lado, a imunoreatividade para DNP mostrou diferenças (C, G, K e inserções) na intensidade, porém foi uniformemente distribuída nas células hepáticas. Em geral, a imunoreação para ferritina foi fraca nos hepatócitos, exceto para o grupo tratado com 10 mg SAME (B, F, J). (v) veia porta; (s) sinusóide; (h) lóbulo hepático; (p) área portal. As figuras D, H e L são representativas dos controles das imunoreações nas quais o anticorpo primário foi substituído por soro de coelho não-imuno, respectivamente, para anti-ferritina no grupo controle, anti-DNP no grupo tratado com 10 mg SAME, e reação anti-DNP no grupo tratado com 40 mg SAME.

Figura 2. Localização de ferro (A, E, I, M), DNP (B, F, J, N) e ferritina (C, G, K, O) no cérebro de ratos normais (controle) (A-C) ou tratados com SAME (10 mg, E-G; 40 mg I-K; 80 mg M-O). As marcações de ferro foram observadas como grânulos escuros e irregulares no citoplasma das células cerebrais (setas). A densidade dos grânulos nas células cerebrais variou com o tratamento dos animais (A, E, I, M e inserções). Em geral, a imunoreatividade para DNP mostrou diferenças (B, F, J, N) na intensidade, porém foi uniformemente distribuída entre as células cerebrais. Por outro lado, a imunoreação para ferritina foi fraca, exceto para o grupo tratado com 10 mg SAME (C, G, K, O). As figuras D, H, L e P são representativas dos controles das imunoreações nas quais o anticorpo primário foi substituído por soro de coelho não-imuno, respectivamente, para anti-ferritina no grupo controle, anti-ferritina no grupo tratado com 10 mg SAME, anti-DNP no grupo tratado com 10 mg SAME, e reação anti-DNP no grupo tratado com 40 mg SAME.

Figura 3. Parênquima hepático. As eletromicrografias mostram características normais dos hepatócitos tanto no grupo controle (**A-B**) quanto no grupo de animais que recebeu 10 mg de SAME (**C-E**). Notar que estas células apresentam núcleos eucromáticos e citoplasma com predomínio de mitocôndrias (setas) e cisternas do retículo endoplasmático (cabeça de seta). Entre células adjacentes observam-se canaliculos biliares, caracterizados pela presença de prolongamentos interdigitados (asteriscos). (L) gotículas lipídicas; (m) figuras de mielina; (d) espaço de Disse; (e) célula endotelial. **A, C**, 2.700 X; **B**, 5.000 X; **D**, 8.000 X; **E**, 27.000 X.

Figura 4. Análise de microscopia eletrônica do parênquima hepático: **(A)** grupo controle. **(B-D)** 10 mg SAME/kg peso corporal. **(E-H)** 40 mg SAME/kg peso corporal. Os hepatócitos (**h**) mostraram núcleo eucromático (**n**), nucléolo proeminente (**nc**) e citoplasma rico em mitocôndria. **C** e **D**, respectivamente, evidenciam mitocôndria com matriz eletrondensa (asterisco branco) e mitocôndria com morfologia normal (asterisco preto), bem como organelas do tipo heterofagosoma, que são achados ultraestruturais típicos em hepatócitos de animais tratados. **(E, H)** Mitocôndria com matriz eletrondensa atípica (asterisco branco) e com inclusões eletrondensas (setas) prevalecem sobre mitocôndrias com aspecto normal (asterisco preto) nos hepatócitos dos animais tratados com 40 mg SAME. **(F)** Gotas de lipídios estão particularmente aumentadas neste grupo (**L**), e ainda, ocasionalmente **(G)** rodeadas por mitocôndriaa com cristas rarefeitas (**m**) adjacentes às cisternas dilatadas do retículo endoplasmático (cabeça das setas). (**d**) Espaço de Disse. A barra em **E** indica 7 μm (**A, B, F**), 2 μm (**C, G**), 0,25 μm (**D**), 20 μm (**E**), ou 5 μm (**H**). **A, B, E**, 2.700 X; **H**, 6.700 X; **C, D, F, G**, 8.000 X.

Figura 5. Eletromicrografias do parênquima hepático de animais que receberam 40 (detalhe em **C**) e 80 mg de SAME. Em **A** e **B**, notar a presença de mitocôndrias com cristas rarefeitas, e em **A**, **B** e **D**, notar a presença de material bastante eletrondenso no interior das mitocôndrias (setas), lembrando a formação de inclusões. Em **C**, notar o discreto acúmulo de gotículas lipídicas (setas vermelhas). (p) peroxissomos. Em **D**, 13.000 X, detalhe, 18.000 X.

Figura 6. As fotomicrografias mostram secções do parênquima hepático corado pelo azul de toluidina. Notar que independentemente do tratamento (**A-B**, controle; **C-D**, 10 mg; **E**, 40mg e **F**, 80mg) não se observam modificações na estrutura e organização do órgão. Hepatócitos (h) radialmente dispostos a partir da veia central (v) e entre sinusóides (asteriscos) formam o lóbulo hepático. As setas indicam gotículas lipídicas e as cabeças de seta, células endoteliais. B, duto biliar, vp, ramo da veia porta e L, capilar linfático na interface entre os lóbulos, a veia central. **A, F**, barra = 50 µm; **B, D, E**, barra = 100 µm.

Figura 7. Análise por microscopia eletrônica do tecido cerebral: **(A)** grupo controle. **(B-C)** 10 mg SAME/kg. **(D)** 40 mg SAME/kg. **(E)** 80 mg SAME/kg. Notar que independentemente do tratamento, não se observam modificações na estrutura e organização do órgão. As células cerebrais mostram núcleo eucromático **(A)**. **A, B e C** mostram o discreto acúmulo de grânulos citoplasmáticos pequenos e eletrondensos. **B, C e E** evidenciam a presença de mitocôndrias com matriz eletrondensa atípica, cristas rarefeitas e inclusões eletrondensas (setas).

4.2. Modelo de estudo de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, baseado na administração de SAME – Tratamento agudo por 18 h

4.2.1. Mensuração de ALA e da atividade da ALA-D

Para validar o modelo experimental de porfirias associadas à deficiência de ALA-D e TH1, foram estudados os níveis de ALA e a atividade de ALA-D em resposta às doses de SAME, ALA e ALAME administradas aos animais. Como esperado, os níveis de ALA aumentaram significativamente no plasma dos grupos tratados (BII, BIII, BV e BVI), com exceção do grupo administrado com ALAME (BIV), quando comparado ao grupo controle (BI) (**Tabela 9**). Especificamente para o tratamento com SAME, uma relação dose-resposta pode ser observada para os maiores níveis de ALA, tanto em plasma quanto em fígado. Surpreendentemente, não houve uma relação entre a administração de SAME aos ratos e a inibição da ALA-D (**Tabela 9**).

Tabela 9. Níveis médios de ALA no plasma e no fígado, e análise da atividade de ALA-D no fígado, para os animais dos grupos BI a BVI. Os animais do grupo BI foram tratados com solução salina (0,67 mL/kg peso corporal); os animais dos grupos BII, BIII e BIV foram tratados com 40 mg/kg peso corporal de SAME, ALA e ALAME, respectivamente; os animais do grupo BV foram tratados com 30 mg ALA + 10 mg SAME/kg peso corporal; e os animais do grupo BVI foram tratados com 10 mg SAME/kg peso corporal. Dados mostrados como média ($\pm$ DP).

Concentração de ALA e atividade de ALA-D	Grupos (mg composto/kg peso corporal)					
	BI (controle)	BII (40 mg SAME)	BIII (40 mg ALA)	BIV (40 mg ALAME)	BV (30 mg ALA + 10 mg SAME)	BVI (10 mg SAME)
ALA no plasma (μ mol/mL; n=8)	0,18 ($\pm$ 0,16)	8,95 ($\pm$ 2,19)*, #	6,97 ($\pm$ 2,15)*, φ	0,48 ($\pm$ 0,11)	10,33 ($\pm$ 3,36)*, φ , ϵ	4,74 ($\pm$ 1,60) $^{\delta, \epsilon}$
ALA no fígado (μ mol/mg proteína; n=8)	0,02 ($\pm$ 0,01)	0,65 ($\pm$ 0,34)*	0,12 ($\pm$ 0,03)	0,02 ($\pm$ 0,02)	0,23 ($\pm$ 0,08)	0,25 ($\pm$ 0,08)
Atividade de ALA-D (nmol PBG/mg proteína; n=6)	0,13 ($\pm$ 0,04)	0,09 ($\pm$ 0,07)	0,19 ($\pm$ 0,09)	0,15 ($\pm$ 0,08)	0,11 ($\pm$ 0,15)	0,08 ($\pm$ 0,07)

ALA no plasma: * $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do controle (grupo BI). # $p < 0,001$ é estatisticamente diferente dos grupos BIV e BVI (40 mg ALAME e 10 mg SAME/kg peso corporal, respectivamente). φ , ϵ $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do grupo BIV (40 mg ALAME/kg peso corporal). Comparações múltiplas entre os grupos foram realizadas usando-se o teste de Tukey-Kramer.

ALA no fígado: * $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do controle (grupo BI) e dos grupos BIII a BVI (40 mg ALA, 40 mg ALAME, 30 mg ALA + 10 mg SAME e 10 mg SAME/kg peso corporal, respectivamente). Comparações múltiplas entre os grupos foram realizadas usando-se o teste de Tukey-Kramer.

4.2.2. Mensuração dos parâmetros de desbalanço redox

Os níveis plasmáticos e hepáticos de ferro total não hemínico não foram diferentes para os animais tratados (**Tabela 10**). Nenhuma diferença foi observada para atividade de SOD no fígado (**Tabela 10**).

Para a GPx, houve um aumento da atividade da enzima para o grupo tratado com 10 mg SAME/kg peso corporal quando comparado ao controle e aos outros grupos (**Tabela 10**).

Tabela 10. Níveis médios de ferro total não hemínico no plasma e no fígado, e da atividade de SOD e GPx para o tecido hepático dos grupos BI a BVI. Os animais do grupo BI foram tratados com solução salina (0,67 mL/kg peso corporal); os animais dos grupos BII, BIII e BIV foram tratados com 40 mg/kg peso corporal de SAME, ALA e ALAME, respectivamente; os animais do grupo BV foram tratados com 30 mg ALA + 10 mg SAME/kg peso corporal; e os animais do grupo BVI foram tratados com 10 mg SAME/kg peso corporal. Dados mostrados como média ($\pm$ DP).

Biomarcadores de desbalanço oxidativo	Grupos (mg droga/kg peso corporal)					
	BI (controle)	BII (40 mg SAME)	BIII (40 mg ALA)	BIV (40 mg ALAME)	BV (30 mg ALA + 10 mg SAME)	BVI (10 mg SAME)
Ferro no plasma (mmol/mL)	1,34 ($\pm$ 0,67) n=6	2,03 ($\pm$ 1,37) n=4	1,37 ($\pm$ 0,62) n=5	—	—	—
Ferro total não hemínico no fígado (μ g Fe/mg tecido; n=8)	1,53 ($\pm$ 0,33)	1,75 ($\pm$ 0,36)	1,48 ($\pm$ 0,42)	1,40 ($\pm$ 0,36)	1,92 ($\pm$ 0,44)	1,52 ($\pm$ 0,39)
Atividade de SOD no fígado (U/mg proteína; n=8)	100,33 ($\pm$ 22,46)	101,92 ($\pm$ 28,69)	85,21 ($\pm$ 12,93)	105,21 ($\pm$ 19,01)	91,79 ($\pm$ 18,54)	102,33 ($\pm$ 27,53)
Atividade de GPx no fígado (nmols NADPH/min.mg proteína; n=6)	14,66 ($\pm$ 12,38)	15,84 ($\pm$ 13,20)	25,43 ($\pm$ 11,63)	19,80 ($\pm$ 6,88)	19,17 ($\pm$ 8,86)	74,70 ($\pm$ 22,74)*

Atividade de GPx: * $p < 0,001$ é estatisticamente diferente do controle (grupo BI) e dos grupos BII a BV (40 mg SAME, 40 mg ALA, 40 mg ALAME e 30 mg ALA + 10 mg SAME/kg peso corporal, respectivamente). Comparações múltiplas entre os grupos foram realizadas usando-se o teste de Tukey-Kramer.

4.3. Mecanismos de danos neurológicos induzidos a ratos por SAME e/ou ALA

– Tratamento crônico por 30 dias

O peso dos animais não foi influenciado pelo tipo de tratamento aplicado. Os valores médios ($\pm$ DP) para os pesos dos animais ao final do tratamento foram 331 ± 27 , 351 ± 36 , 323 ± 31 , 327 ± 28 e 341 ± 22 g ($p=0,3396$), respectivamente, para os grupos CI a CV.

4.3.1. Alterações nos parâmetros sistêmicos e vasculares no córtex parietal durante a anoxia e a reoxidação

A **Figura 8** descreve as alterações nos parâmetros sistêmicos e vasculares do córtex parietal dos ratos controles durante a anoxia de 45 s e a reoxidação. Os parâmetros analisados foram a concentração de hemoglobina, a taxa de SmcO_2 , a taxa do CBF e o estado redox do cit c. O sinal do cit c (ferricitocromo) está impresso na Figura, em que uma inflexão para baixo indica redução a ferrocitocromo. Como esperado, durante a anoxia, a pressão arterial cai, e esta resposta é acompanhada por uma associação de eventos mitocondriais e vasculares. Como consequência da queda da pressão arterial, o CBF é reduzido e altera-se a velocidade do *turnover* do oxigênio molecular. Como o oxigênio é direcionado (removido) do sistema vascular para os tecidos, a SmcO_2 diminui e o cit c é então reduzido. Simultaneamente, a concentração de hemoglobina aumenta, possivelmente na tentativa de prover mais oxigênio aos tecidos e contornar este desafio metabólico. À medida que a anoxia é suprimida, a pressão arterial aumenta e promove um aumento brusco do CBF, que libera mais oxigênio para a vasculatura. Em conjunto, estes eventos aumentam a SmcO_2 e fornecem o oxigênio necessário para a reoxidação do cit c (inflexão para

cima) (fase hiperoxidativa). Após o restabelecimento da SmcO_2 e a completa reoxidação do cit c, o CBF reduz até que seus níveis basais sejam recuperados. A redução do CBF é acompanhada pela redução da concentração de hemoglobina, que também restabelece seus níveis iniciais.

A **Figura 9** compara as alterações dos parâmetros vasculares e sistêmicos do córtex parietal de ratos tratados durante a anoxia e a reoxidação. Em relação à concentração basal de hemoglobina, uma concentração mais alta foi encontrada para o grupo tratado com 40 mg SAME/kg (CIII) quando comparado ao controle e ao grupo tratado com 10 mg SAME/kg (CII) ($p < 0,05$). Após anóxia, a concentração de hemoglobina foi restabelecida para os níveis basais embora mais lentamente para os grupos CIII e CV (30 mg ALA + 10 mg SAME/kg): aos 340 e 420 s, respectivamente. Embora não se tenha notado diferença significativa no tempo de pico da concentração de hemoglobina ($p = 0,7268$), ele parece ter ocorrido mais cedo para o grupo tratado com 40 mg ALA/kg (grupo CIV).

Para a SmcO_2 , a queda máxima ocorreu mais cedo nos grupos CIII ($p < 0,01$) e CIV ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo CV (aos $34,8 \pm 0,02$, $37,2 \pm 0,03$ e $41,4 \pm 0,01$ s, respectivamente). A média ($\pm \text{DP}$) da queda máxima na taxa de SmcO_2 também foi maior para os grupos CI (controle) e CIV quando comparados ao grupo CV ($6,86 \pm 1,73$, $7,50 \pm 1,70$ e $13,73 \pm 6,92$ $\mu\text{mol/L}$, respectivamente) ($p < 0,05$). Estes resultados sugerem que o grupo CIV recupera mais rápido sua SmcO_2 aos níveis basais, enquanto o grupo CIII demora mais para recuperá-la (**Figura 9**).

Quando o estado redox do cit c é considerado, exceto para o momento em que o pico de reoxidação ocorreu, nenhuma diferença foi encontrada para os parâmetros analisados (tempo de redução, pico de redução, tempo de indução)

entre todos os grupos tratados. Os grupos CIII e CIV começaram a reoxidar-se mais cedo quando comparados ao grupo CV (aos $46,80 \pm 0,05$, $45,60 \pm 0,08$ e $52,80 \pm 0,05$ s, respectivamente) ($p < 0,05$). O grupo CIV também começou a reoxidar mais cedo quando comparado ao controle (aos $45,60 \pm 0,08$ e $52,20 \pm 0,05$ s, respectivamente) ($p < 0,05$) (**Figura 9**).

Quanto ao CBF, nenhuma diferença foi encontrada para os parâmetros analisados (tempo, pico, tempo de indução) entre os grupos tratados (**Figura 9**).

4.3.2. Alterações nos parâmetros sistêmicos e vasculares no córtex parietal durante a DDC.

Na **Figura 10**, estão apresentados os espectros da SmcO_2 , do estado redox do cit c, do CBF e do CMRO_2 , para todos os grupos tratados, durante a primeira DDC. Após a aplicação de KCl ao córtex, uma onda de despolarização neuronal se propaga através do córtex. Considerando-se que a repolarização é um processo dependente de energia, a DDC é acompanhada por uma associação de eventos mitocondriais e vasculares, como redução redox do cit c (inflexão para baixo), grande aumento na CMRO_2 e redução na SmcO_2 , previamente a uma hiperemia forte, e que estas alterações são consistentes com um aumento no consumo de oxigênio mitocondrial, removendo o oxigênio da vasculatura e direcionando a tensão de oxigênio mitocondrial a níveis que são hipóxicos à mitocôndria. Estes eventos são seguidos pelo aumento do CBF, que libera mais oxigênio para a vasculatura e aumenta, assim, a SmcO_2 (e a concentração de hemoglobina), reoxidando o cit c (inflexão para cima). Contudo, durante o pico do CBF, há hiperoxidação do cit c

temporariamente a um mínimo no CMRO_2 . Como os níveis basais de cit c já se encontravam saturados com o oxigênio, os dados descrevem que esta hiperoxidação é resultado de uma perturbação no estado metabólico da mitocôndria, e não de um aumento na oxigenação.

Considerando-se a primeira DDC, os valores de CBF do grupo CIV foram significativamente menores quando comparados aos grupos CII ($p < 0,01$) e CIII ($p < 0,05$) (**Figuras 10 e 12**). Em adição, o CMRO_2 também foi reduzido nos animais tratados com ALA. Interessantemente, quando o tratamento com ALA foi associado ao de SAME (grupo CV), CBF e CMRO_2 foram restaurados aos níveis normais (**Figura 10**).

Para os outros parâmetros analisados durante a primeira DDC, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos. Entretanto, o pico para o CMRO_2 pareceu começar antes no grupo CIV, sugerindo uma recuperação mais rápida após o desafio metabólico cerebral induzido pela aplicação de KCl ao córtex (**Figuras 10 e 12**).

Níveis mais altos de hemoglobina, foram observados para o grupo CIII quando comparado aos demais. Em relação ao pico de hemoglobina, diferenças foram encontradas entre os grupos CII e CIII ($p < 0,05$) (**Figura 12**).

Nenhuma diferença entre os grupos foi encontrada nos parâmetros analisados relacionados ao estado redox do cit c (tempo de redução e oxidação, pico de redução e oxidação, tempo de indução).

As **Figuras 11 e 12** mostram que, durante a segunda DDC, as taxas do CBF e do CMRO_2 foram menores para o grupo CIV quando comparado ao grupo CIII ($p < 0,05$). No mais, para a taxa do CBF, os dados dos grupos CIII e CIV parecem

mostrar uma fase secundária mais longa. Quanto aos outros parâmetros analisados durante a segunda DDC para os grupos tratados, nenhuma diferença foi encontrada.

4.3.3. Alterações nos parâmetros sistêmicos e vasculares no córtex parietal durante a anoxia final

Finalmente, para a segunda anoxia, quanto à taxa do CBF, o pico para o grupo CIV parece estar antecipado quando comparado ao controle ($p < 0,05$). Nenhuma diferença foi encontrada para os outros parâmetros analisados durante esta parte do experimento para os grupos tratados (**Figura 13**).

Interessantemente, apesar da ausência de diferenças nos valores da pressão arterial durante o experimento para os grupos tratados (exceto para a primeira anoxia) (dados não mostrados), eles parecem ser menores no grupo CIV. De fato, durante a primeira anoxia, os valores da pressão arterial descritos foram menores para o grupo CIV quando comparados ao controle ($p < 0,05$).

Figura 8. Alterações nos parâmetros sistêmicos e vasculares em córtex parietal de ratos do grupo controle (CI) submetidos à primeira anoxia (durante 45 s) e posterior reoxidação. Nesta Figura está descrita a concentração de hemoglobina, a saturação da hemoglobina (SmcO_2), a concentração absoluta de cit c, e o fluxo sanguíneo cerebral (CBF). Os dados estão expressos como a média ($\pm\text{DP}$). $n=6$.

Figura 9. Concentração de hemoglobina, saturação da hemoglobina (SmcO_2), concentração absoluta de cit c, e fluxo sanguíneo cerebral (CBF) durante a primeira anoxia (por 45 s) para todos os grupos experimentais. Grupo controle (CI) em preto. Grupo tratado com 10 mg SAME/kg peso corporal (CII) em azul. Grupo tratado com 40 mg SAME/kg peso corporal (CIII) em roxo. Grupo tratado com 40 mg ALA/kg peso corporal (CIV) em vermelho. Grupo tratado com 30 mg ALA + 10 mg SAME/kg peso corporal (CV) em verde. Os dados estão expressos como a média. $n=6$.

Figura 10. Saturação da hemoglobina (SmcO₂), concentração absoluta de cit c, fluxo sanguíneo cerebral (CBF) e consumo de oxigênio (CMRO₂) durante a primeira difusão da depressão cortical (DDC) para todos os grupos experimentais, individualmente. A DDC foi induzida pela aplicação de KCl. Os dados estão expressos como a média (±DP). n=7.

Figura 11. Saturação da hemoglobina (SmcO_2), concentração absoluta de cit c, fluxo sanguíneo cerebral (CBF) e consumo de oxigênio (CMRO_2) durante a segunda difusão da depressão cortical (DDC) para todos os grupos experimentais, individualmente. A DDC foi induzida pela aplicação de KCl. Os dados estão expressos como a média ($\pm$ DP). $n=7$.

Figura 12. Fluxo sanguíneo cerebral (CBF), consumo de oxigênio (CMRO₂) e concentração de hemoglobina durante a primeira e a segunda difusão da depressão cortical (DDC) para todos os grupos experimentais. A DDC foi induzida pela aplicação de KCl. Grupo controle (CI) em preto. Grupo tratado com 10 mg SAME/kg peso corporal (CII) em azul. Grupo tratado com 40 mg SAME/kg peso corporal (CIII) em roxo. Grupo tratado com 40 mg ALA/kg peso corporal (CIV) em vermelho. Grupo tratado com 30 mg ALA + 10 mg SAME/kg peso corporal (CV) em verde. Os dados estão expressos como a média. n=7.

Figura 13. Concentração de hemoglobina, saturação da hemoglobina (SmcO_2), concentração absoluta de cit c, e fluxo sanguíneo cerebral (CBF) durante a segunda anoxia (por 45 s) para todos os grupos experimentais. Grupo controle (CI) em preto. Grupo tratado com 10 mg SAME/kg peso corporal (CII) em azul. Grupo tratado com 40 mg SAME/kg peso corporal (CIII) em roxo. Grupo tratado com 40 mg ALA/kg peso corporal (CIV) em vermelho. Grupo tratado com 30 mg ALA + 10 mg SAME/kg peso corporal (CV) em verde. Os dados estão expressos como a média. $n=7$.

4.3.4. Ensaios de reatividade vascular da aorta e quantificação de superóxido

Os dados da **Figura 14** mostram que o tratamento com ALA interferiu na capacidade de vasodilatação dos anéis da aorta. A concentração de superóxido também foi reduzida em 61,23% na presença de ALA (**Figura 15**).

Figura 14. Reatividade vascular de anéis da aorta de ratos na presença de ALA 2mM.

Figura 15. Concentração de superóxido em anéis da aorta de ratos na presença de ALA 2 mM.

5. DISCUSSÃO

5.1. Modelo de estudo de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, baseado na administração de SAME – Tratamento agudo por 36 h

Nos últimos anos, buscamos compreender os mecanismos das respostas fisiopatológicas à atividade pró-oxidante do ALA observada *in vitro* em sistemas biológicos e biomoléculas. Foram testados modelos experimentais de porfirias baseados na administração direta do ALA (Bechara et al., 2007). No entanto, estes modelos não podem excluir os danos oxidativos e teciduais promovidos pelo oxigênio singlete e por radicais, fotossensibilizados pelas porfirinas produzidas em excesso e pelas reações redox das porfirinas no estado fundamental. Assim, um dos objetivos desta tese de doutoramento foi aprimorar um modelo confiável para estudar o desbalanço redox e os danos teciduais mediados pelo ALA descritos em porfirias hepáticas onde o ALA acumula, como em PAI, porfirias associadas com a deficiência da ALA-D, HT1, e também possivelmente, na intoxicação por chumbo. Nesta etapa do estudo, ratos foram tratados com diversas doses de SAME, cuja forma ácida é conhecida como uma forte inibidora da ALA-D, levando ao acúmulo de ALA.

Neste modelo de estudo, a decisão pela manutenção dos animais no estado de jejum durante todo o período de tratamento foi baseada nos estudos de Puy e colab. (1996), Rocha (1998) e Rocha e colab. (2000a). Já a indicação para o uso de SAME foi baseada nos estudos de Carvalho e colab. (1997), Rocha (1998) e Rocha e colab. (2000a). Na tentativa de desenvolver um modelo de estudo para a resposta noturna da produção de melatonina frente ao acúmulo de ALA por SA, Puy e colab.

(1996) observaram que a administração de SA em ratos só era efetiva quando os animais eram mantidos em jejum. Consistentemente, estudos preliminares conduzidos por Rocha (1998) mostraram que quando ratos alimentados eram injetados 2 vezes ao dia com SA (5 ou 40 mg SA/kg peso corporal), durante 4 dias, nenhum aumento nos níveis de ALA era observado. Neste contexto, é interessante notar que fatores endócrinos e jejum são descritos como variáveis importantes na precipitação dos ataques agudos em porfirias (Hindmarsh, 1986), uma vez que a indução de ALA-S é prevenida por carboidratos (Granick, 1966). Embora a incorporação de glicose pelas unidades teciduais mínimas (MTUs) do cerebelo de ratos aumente linearmente com o tempo de incubação até 4 h (Princ et al., 1994; Princ et al., 1998), o ALA promove um decréscimo desta incorporação, sendo este efeito consistente com o fato de que as crises de porfiria aguda são precipitadas por jejum e de que a administração de glicose parece ser um tratamento eficiente para pacientes de PAI (Juknat et al., 1995; Princ et al., 1994).

Outro fator que poderia estar associado à ausência de resposta dos animais ao tratamento no estado alimentado é a composição básica da ração. Geralmente, as rações fornecidas nos biotérios são enriquecidas com carboidratos, aminoácidos, vitaminas e antioxidantes. Assim, a adição de antioxidantes à dieta preveniria o consumo do grupo –SH da ALA-D por agentes pró-oxidantes, evitando a inibição da referida enzima por uma possível modificação estrutural induzida pelo ALA. Finalmente, o fato da SA ser um inibidor específico e potente da ALA-D *in vitro*, mas um inibidor marginal e transiente do heme *in vivo* (Tschudy et al., 1981), também poderia explicar a ineficiência do modelo no estado alimentado.

Outra possibilidade para a ineficiência dos modelos acima comentados seria que a SA tivesse encontrado uma barreira de permeabilidade para entrar na célula. Como a SA é um composto polar, sua permeabilidade à membrana plasmática deve ser bastante limitada. Sabendo-se que a ausência de carga nos ésteres facilita sua absorção pelas células (maior difusibilidade), o tratamento de ratos com o SAME poderia esclarecer se os tratamentos acima foram deficientes pela manutenção da condição alimentar ou pela baixa difusibilidade do SA. Assim, a menor polaridade do SAME comparada à da SA, resultaria em sua maior captação para o meio intracelular. Uma vez dentro da célula, o SAME sofreria ação de esterases inespecíficas, sendo hidrolizado ao composto inicial, SA. De fato, os dados descritos para os grupos AIII e AV, na **Tabela 6**, parecem confirmar esta maior difusibilidade para o SAME. Uma maior difusibilidade intracelular para o SAME também foi observada por Carvalho e colab. (1997) em uma linhagem de células de fibroblastos pulmonares de hamster chinês (células M8) incubadas na presença de SAME a 4 mM. Finalmente, nos estudos de Rocha (1998) e Rocha e colab. (2000a), quando os ratos foram tratados com SAME, em jejum, um aumento dos níveis plasmáticos de ALA pôde ser observado. Em conjunto, estes dados justificam a manutenção dos animais no estado de jejum durante todo o período de tratamento, bem como o uso do SAME.

Nesta tese de doutoramento, nós mostramos que a inibição de ALA-D pela administração de SAME a ratos em intervalos de 18 h (3 injeções), confirmado pelos resultados apresentados na **Tabela 5**, resultou no aumento dos níveis de ALA em plasma, fígado, cérebro e urina, quando comparado ao controle (**Tabela 3**). O aumento encontrado nos níveis de ALA no plasma para os animais tratados era

esperado, e confirma os dados encontrados por Rocha e colab. (2000a). Embora os valores encontrados para o grupo controle (AI) sejam muito inferiores em relação aos publicados por Rocha e colab. em 2000a ($0,48 \pm 0,04 \times 2,80 \pm 0,50 \mu\text{M/mL}$), talvez próximos ao limite de detecção do método, os valores encontrados para a dose de 40 mg SAME/kg peso corporal (grupo AIII) foram coincidentes ($3,99 \pm 0,45 \times 3,50 \pm 0,60 \mu\text{M/mL}$). A literatura não é consensual quanto à melhor metodologia para detecção de porfirinas e de ALA em diferentes amostras biológicas. Embora os métodos de análise de porfirinas sejam sensíveis e possam ser prontamente realizados em laboratório clínico, as determinações em urina podem ser afetadas por diversos fatores, como pH, temperatura, exposição à luz, diurese, e erros de amostragem (Floderus et al., 2006). No que toca ao ALA, aparentemente, não é uma detecção simples devido à alta reatividade das α -aminocetonas (no caso, ALA) e de seus produtos de oxidação (no caso, DOVA), os α -oxoaldeídos. Um dos métodos que se mostrou bastante reprodutível é aquele em que o ALA é pré-derivatizado com acetilacetona e formaldeído (Murata et al., 2003). Este foi o método usado no presente trabalho. No trabalho de Rocha e colab. (2000a), as amostras foram derivatizadas com o-ftaldialdeído (OPA).

A ausência de um efeito dose resposta para os animais do grupo AII quando comparados aos do grupo AIII (**Tabela 3**) indica uma contribuição semelhante das doses de 10 e 40 mg SAME/kg peso corporal à inibição da atividade da ALA-D hepática (**Tabela 5**). Neste sentido, podemos ainda dizer que a maior inibição da atividade da ALA-D hepática pelo tratamento dos animais com a dose de 80 mg SAME/kg peso corporal está implicada na dose-resposta observada para a

concentração de ALA no plasma entre os grupos AI (controle), AII e AIV (**Tabelas 3 e 5**).

Para os grupos AIII e AIV, uma possível explicação para a semelhança entre os níveis de ALA no plasma (**Tabela 3**) seria que parte do ALA acumulado no grupo AIV teria sido convertido ao DOVA, metabólito obtido a partir da oxidação aeróbica do ALA (Bechara, 1996). O perfil semelhante entre os dados plasmáticos e hepáticos para a concentração de ALA, bem como os resultados para a excreção de ALA pela urina (**Tabela 3**), oferecem suporte a esta suposição. Considerando-se a diferença entre os níveis de ALA no plasma para os animais dos grupos AII e AIV, bem como o fato de que o excesso de ALA deve ser deslocado para o meio extracelular (Sinclair; Granick, 1977, Carvalho, 1999), proporcionalmente, muito mais do ALA deveria ter sido excretado na urina do grupo de maior ingestão de SAME (AIV). Assim, é possível que esta diferença tenha sido compensada pela formação de DOVA, especialmente pelo grupo de maior concentração da droga.

Assim como para o plasma e o fígado, foi encontrado um aumento nos níveis de ALA no cérebro dos animais tratados com SAME quando comparados ao controle (grupo AI) (**Tabela 3**), confirmando os achados de Juknat e colab. (1995) em que o acúmulo de ALA é demonstrado em áreas do tecido cerebral. Embora haja uma correlação positiva entre este aumento cerebral para os níveis de ALA e a inibição da atividade da ALA-D cerebral (**Tabelas 3 e 5**), o perfil dose-resposta deste metabólito no cérebro difere do encontrado para o plasma e para o fígado, sugerindo que o cérebro tanto pode estar captando ALA extracerebral e armazenando-o, como pode estar transportando-o para fora do tecido cerebral. Apesar de a literatura não ser consensual quanto ao transporte de ALA para o SNC, diversos estudos

concluíram que o acúmulo de ALA no cérebro pode ocorrer através de difusão passiva através da barreira hemato-encefálica (Ennis et al., 2003). No mais, nas porfirias, o ALA é ativamente produzido dentro do cérebro (Matteis; Ray, 1982; Kappas et al., 1995). Neste ponto devemos ressaltar que o desafio metabólico estabelecido no presente trabalho simula um distúrbio porfirínico em que há acúmulo de ALA. Por outro lado, no que se refere ao transporte de ALA para fora do cérebro, evidências recentes mostraram a existência de um transporte ativo específico de peptídeos (PEPT2) em sinaptossomos corticais (Fujitaa et al., 2004). Considerando-se que o ALA é um substrato para transportadores similares, torna-se bastante provável que ele seja translocado através deste sistema de transportadores peptídicos, especialmente o PEPT2, (Ocheltree et al., 2004), que representaria um mecanismo cerebral regular para manter ativamente baixos os níveis deste precursor do grupo heme no SNC, evitando o acúmulo de ALA (Adhikari et al., 2006). No plexo coróide, o transportador PEPT2 contribui para o *clearance* de ALA do FCS para o sangue, de maneira a manter as concentrações de ALA baixas no FCS (Ocheltree et al., 2004).

Considerando-se as duas hipóteses acima apresentadas, quando os dados para o *clearance* renal do ALA são analisados em conjunto com os dados para as concentrações de ALA no cérebro (**Tabelas 3 e 4**), parece que há um mecanismo para a remoção do ALA do tecido cerebral, cuja ação oxidativa comprometeria gravemente a estrutura e a funcionalidade cerebral. No presente trabalho, o *clearance* renal do ALA foi maior para os grupos AII e AIV quando comparados com o grupo AIII, enquanto uma relação inversa foi encontrada para os níveis cerebrais de ALA, em que os valores encontrados para o grupo AIII foram maiores aos

encontrados para os grupos AII e AIV. Ainda que não possamos estabelecer um mecanismo causal entre estes dois efeitos, parece bastante evidente que quanto maior o *clearance* renal de ALA, mais rápida é a remoção deste metabólito do organismo, e consequentemente mais rápida é a remoção do composto do cérebro, evitando seu acúmulo.

Suporte adicional a esta especulação pode ainda ser oferecido pelo efeito dose-resposta encontrado para a excreção de ALA na urina (**Tabela 3**). Nas células, o ALA é acumulado apenas em pequena quantidade, sendo que o excedente é jogado para o meio extracelular (Sinclair; Granick, 1977, Carvalho, 1999). Estudos desenvolvidos com culturas de células tratadas com 1,0 mM de ALA mostraram que fibroblastos acumulam 1,5 vezes mais ALA que o meio de cultura na primeira meia hora e apenas 20% aos 90 min, enquanto os hepatócitos se enriquecem com apenas 20% de ALA ao longo de 2 horas de incubação (Costa et al., 1997). No ambiente intracelular, experimentos realizados com mitocôndrias isoladas e ^{14}C -ALA revelaram que a distribuição intra- e extramitocondrial deste metabólito é de 1:1 (Medeiros et al., 1994). Estes dados sugerem a existência de um mecanismo celular para evitar o acúmulo intracelular de ALA, possivelmente um mecanismo de desintoxicação contra as propriedades pró-oxidantes do ALA.

Ainda quanto aos dados de ALA para o cérebro, um aspecto interessante é que além da inibição da ALA-D pela SA, pode ter ocorrido uma inibição adicional da referida enzima por uma modificação estrutural, talvez oxidativa, no seu sítio ativo, ou na sua vizinhança, induzidos pelo ALA. Wyss e colab. (1993) ainda sugerem que o SNC sequestra a SA, exacerbando seus efeitos (mediados pelo ALA) neste tecido, de forma que as medidas de SA no plasma e na urina de pacientes podem ter pouca

ou nenhuma relação com os efeitos observados sobre o SNC (Wyss et al., 1993). De fato, Rocha e colab. (2000a) descrevem que após o tratamento agudo de ratos com 40 mg SAME/kg de peso corporal, há um aumento da peroxidação lipídica no cérebro, não sendo observado o mesmo no fígado, mais protegido de agressão oxidativa pelos altos níveis relativos de GSH.

No presente estudo, outra conseqüência da inibição de ALA-D pela SA foi a redução nos níveis de porfirinas na urina, especialmente a COPRO (**Tabela 4**). Estes achados eram esperados, uma vez que a biossíntese de COPRO é negativamente regulada pelo acúmulo de ALA. Este achado reforça os dados de Wyss e colab. (1993), descritos para o fígado, rins e cérebro. Como a SA inibe a ALA-D *upstream* na via de biossíntese das porfirinas, o acúmulo de ALA deve ocorrer sem o acúmulo de porfirinas. Estes resultados, associados ao aumento nos níveis de ALA no plasma e na urina, oferecem suporte adicional à viabilidade deste modelo de estudo.

Em conjunto, os dados para a concentração de ALA no plasma, fígado, cérebro e urina dos animais, associados aos dados da atividade de ALA-D e aos níveis de COPRO na urina (**Tabelas 3, 4 e 5**), ressaltam o papel inibitório do SAME sobre a ALA-D, resultando no acúmulo de ALA e no aumento da excreção de ALA em níveis acima do normal. De fato, o acúmulo plasmático e a excreção urinária de ALA nas concentrações acima dos níveis normais têm sido descritos em portadores sintomáticos de PAI (Kang; Gerald, 1970; Schierbeek et al., 1993; Floderus et al., 2006) e TH1 (Berger et al., 1983; Sassa; Kappas, 1983; Bechara et al., 2007), e têm sido associados com as manifestações neurológicas e a ocorrência de hepatocarcinomas nestes pacientes. Estes dados parecem ainda sugerir que os

efeitos máximos da SA podem ser observados até uma dose limite entre 10 e 40 mg/kg peso corporal. É possível que na presença de altos níveis de ALA (como em decorrência da administração de SA em doses superiores a 10 mg/kg peso corporal) a competição entre ALA e SA pelo sítio ativo da ALA-D, minimize os efeitos inibitórios da SA (Tschudy et al., 1981; Venkataraman; Padmanaban, 1991). Os dados das análises por histoquímica e imunohistoquímica oferecem suporte adicional a esta especulação, uma vez que o grupo tratado com a dose de 10 mg SAME foi o mais afetado (**Figuras 1 e 2**).

Ainda em relação à redução dos efeitos inibitórios da SA sobre a atividade da ALA-D *in vivo*, a maior solubilidade apresentada pela forma enólica do ALA, um dos intermediários da via de oxidação deste metabólito, poderia estar contribuindo para uma maior interação entre o ALA e a membrana plasmática (Carvalho, 1999; Jaffe; Rajagopalan, 1990), reduzindo os níveis de ALA circulante e resultando em menor acúmulo aparente de ALA em decorrência da inibição de ALA-D por SA. Deve-se ainda considerar que a distribuição e o impacto da SA sobre o metabolismo do heme é diferente nos diversos tecidos, sendo 3 vezes menor no fígado em relação ao cérebro e ao rim (Wyss et al., 1993).

Há rica bibliografia atribuindo às ROS a carbonilação protéica e os danos de peroxidação à membrana. No presente trabalho, o tratamento com SAME resultou num aumento estatisticamente significativo de proteínas carboniladas no fígado dos animais do grupo AII quando comparado ao controle e aos outros grupos tratados (**Tabela 7**). Este achado também foi confirmado por imunohistoquímica (**Figura 1 C, G, K**). Um aumento dependente de dose também foi observado, por imunohistoquímica, para os grupos AIII e AIV (**Figura 1 I, J, K**). Estes achados

também foram confirmados para o cérebro de ratos tratados com SAME (**Figura 2 E, F, G, I, K, J, M, P**). Tais resultados são consistentes com a observação de que os efeitos pró-oxidantes máximos da SA em ratos podem ser mediados por uma dose limite na faixa entre 10 a 40 mg/kg peso corporal.

A independência entre o acúmulo de ALA e o aumento de proteínas carboniladas para o grupo tratado com 40 mg SAME/kg está de acordo com os resultados descritos por Rocha e colab. (2000a). No mais, a falta aparente de um aumento dose-dependente de ALA, ALA-D e proteína carbonilada para as diferentes doses de SAME encontra ainda relação com os estudos prévios de quimioluminescência espontânea de órgãos de ratos expostos após o tratamento com ALA (Demasi et al., 1997). O aumento da intensidade espontânea da quimioluminescência de fígados, músculo soleus e cérebro tratados com ALA, atribuído a um aumento da peroxidação lipídica, foi máximo com uma ou duas doses de ALA, mas foi consideravelmente reduzida em resposta à terceira dose. Esta observação foi interpretada como se os danos oxidativos possam ser parcialmente suprimidos nas horas subseqüentes em resposta a um estímulo adaptivo (Demasi et al., 1997).

Em relação aos dados aos níveis de peroxidação lipídica (medidos como MDA) para o fígado, apenas os animais do grupo AIII apresentaram resposta em relação ao controle (**Tabela 7**). Para o cérebro, não houve influência da administração de SAME nos níveis de MDA. Estes resultados se opõem aos encontrados por Rocha e colab. (2000a), em que após o tratamento agudo de ratos com 40 mg SAME/kg, nenhum aumento dos níveis de peroxidação lipídica foi observado para o fígado, enquanto uma elevação deste parâmetro foi observada no

cérebro. O cérebro é conhecido como o órgão que mostra os maiores níveis de peroxidação lipídica, produzindo maiores quantidades de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em relação ao fígado e ao pulmão (Lopez-Torres, 1993).

Novamente, aqui, parece que os maiores níveis de *clearance* renal do ALA observados para os grupos AII e AIV, quando comparados com o grupo AIII (**Tabela 4**), são devidos a uma remoção mais rápida deste metabólito do organismo, prevenindo seu acúmulo e danos oxidativos teciduais. O fato de que os valores de *clearance* renal para o ALA nos grupos tratados estavam aproximadamente na mesma faixa que para o grupo controle, sugere ainda que o grupo tratado conservou sua função renal suficiente para controlar os níveis aumentados de ALA no plasma (Floderus et al., 2006). O efeito dose-resposta encontrado para a excreção de ALA na urina oferece suporte adicional a esta hipótese (**Tabela 3**).

A **Tabela 8** mostra que o aumento esperado da atividade de SOD e GPx à ação pró-oxidante do ALA, no cérebro de ratos tratados com SAME, não foi confirmado. Para a razão GSH/(GSH+GSSG), uma dose resposta foi descrita apenas para o grupo AIV (**Tabela 8**). Em conjunto, estes dados sugerem novamente um mecanismo adaptativo em resposta a um desafio oxidativo e/ou uma baixa captação e síntese cerebral de ALA (Demasi et al., 1997). Sabe-se que os mecanismos de defesa antioxidante no cérebro são relativamente deficientes. O cérebro é pobre na atividade de catalase, apresenta apenas quantidades moderadas de SOD e GPx, e, em relação ao fígado, apresenta concentrações reduzidas de glutatona e vitamina E (Halliwell, 1992; Olanow, 1993; Peres-Campo et al., 1993).

Para o fígado, nenhum aumento significativo foi confirmado para os níveis de GSH e para a atividade de SOD. Já para a GPx, um aumento da sua atividade foi encontrado no grupo AIII (**Tabela 7**). Os resultados encontrados para a GSH poderiam ser explicados pela alta concentração protetora deste metabólito no fígado, onde ele é sintetizado, armazenado e liberado preferencialmente em relação aos outros órgãos (Halliwell, 1992; Olanow, 1993; Lopez-Torres et al., 1993). Quanto aos resultados para SOD, eles estão de acordo com estudos prévios onde a tratamento agudo de SAME foi utilizado (Rocha et al., 2000a). Entretanto, um aumento significativo na atividade de SOD hepática foi descrito frente ao tratamento prolongado com ALA (Pereira et al., 1992).

Um aumento nos níveis de ferro total não hemínico foi mostrado no fígado de ratos tratados com 40 mg SAME (AIII) (**Tabela 7**). Um aumento dose-dependente para os níveis de ferro e ferritina também foi observado, por imunohistoquímica, especialmente para o grupo AII, tanto para o tecido hepático (**Figura 1**) quanto para o cerebral (**Figura 2**). Este aumento dos níveis de ferro total encontrado para os grupos AII e AIII, e de ferritina para o grupo AII, oferece suporte para a relação molecular entre a administração de SAME, o acúmulo de ALA, a liberação de ferro da ferritina, a deposição de ferro e o desbalanço oxidativo. A administração de SAME inibe fortemente a ALA-D, levando ao acúmulo de ALA, e é sabido que a oxidação do ALA é catalizada por complexos de ferro, gerando espécies reativas (Monteiro et al., 1989; Oteiza et al., 1995). Estudos citoquímicos e estruturais de biópsia de fígado obtidos de pacientes de PAI revelaram a presença de numerosos grânulos de ferritina (Biempica et al., 1974). A liberação de ferro da ferritina pelo ALA em condições aeróbicas *in vitro* também tem sido descrita (Oteiza et al., 1995),

provendo ferro para alimentar o “pool” livre. No mais, em cultura de células, o ALA ativa a IRE-1, a proteína da membrana plasmática responsiva a ferro (Carvalho et al., 1997), que associada ao ferro liberado, pode disparar a síntese de ferritina (Rocha et al., 2003). De fato, em ratos, o aumento de ALA causa a mobilização de ferro e a elevação da ferritina no fígado e cérebro (Demasi et al., 1996; Rocha et al., 2000a; Rocha et al., 2003). A SA também inibe a biossíntese do heme, levando ao acúmulo de ferro não hemínico na mitocôndria e no citosol de reticulócitos normais (Garrick et al., 1993). O aumento na incorporação de ferro pelo aumento do número dos receptores de superfície para transferrina e da taxa de reciclagem dos receptores, também é observado frente ao tratamento com SAME (Adams et al., 1989; Laftah et al., 2008).

Apesar dos resultados desta tese de doutoramento evidenciarem um efeito agudo do acúmulo de ALA induzido pela administração de SAME nos níveis de proteínas carboniladas, MDA, ferro total não hemínico e ferritina, um aumento dose-dependente nestes biomarcadores de desbalanço oxidativo não foi confirmado. Estes dados sugerem que diante de um tratamento de curta duração com SAME, os estágios de danos oxidativos agudos podem mimetizar um dano oxidativo crônico e desencadear o mecanismo envolvido na supressão dos danos oxidativos promovidos pelo ALA (um estímulo adaptivo).

Ainda em relação à ausência aparente de uma resposta dose-dependente do SAME nos níveis dos indicadores de desbalanço redox, ela poderia ser um reflexo dos efeitos do estresse nutricional. Por mais de 10 décadas, estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que os fígados de animais alimentados são mais resistentes aos danos isquêmicos normotérmicos do que os fígados de animais em

jejum (Dawkins et al., 1959; Bernelli-Zazzera et al., 1964; Bradford et al., 1986; Gasbarrini et al., 1993; Le Couteur et al., 1994; Caraceni et al., 1999; Tanigawa et al., 1999). O principal fator envolvido nesta proteção seria a reserva de glicogênio hepático disponível (Astarcioglu et al., 1991; Konno et al., 1992; Caraceni et al., 1999), pois na ausência de oxigênio, a presença de glicogênio é essencial à manutenção da integridade celular através da provisão de glicose para a geração de ATP (Niña et al., 1978). Quando o glicogênio é consumido, a depleção de ATP ocorre rapidamente, levando a uma série de eventos que eventualmente causam danos celulares irreversíveis e necrose (Filkins et al., 1974). Caraceni e colab. (1999) mostraram que após 18 h de jejum, o glicogênio hepático foi quase que completamente depletado. Caraceni e colab. (1999) mostraram que danos mitocondriais são exacerbados pelo jejum. Embora os mecanismos exatos permaneçam incertos, o jejum pode facilitar os danos mitocondriais por reduzir o conteúdo antioxidante hepático e assim sensibilizar a mitocôndria à ação nociva das ROS (Skulachev, 1998). Vendemiale e colab. (2001) mostraram que mitocôndrias isoladas de fígados normais em jejum apresentavam uma maior concentração de lipídios oxidados e um menor conteúdo de ATP sintase em relação ao grupo alimentado.

Os resultados de Stadler e colab. (2005), mostram que assim como a isquemia, o jejum por si promove alguns efeitos deletérios nos hepatócitos. Ele aumenta a peroxidação lipídica. Como demonstrado por Tanigawa e colab. (1999), o balanço entre as defesas antioxidantes e o sistema gerador de pró-oxidantes pode ser desafiado pelo jejum. Em condições de hipóxia no fígado de ratos, um jejum *overnight* acelera a conversão de xantina desidrogenase a xantina oxidase, um

sistema enzimático gerador de ROS (Brass et al., 1991). Neste sentido, para o presente estudo, a inclusão de um grupo controle em estado alimentado poderia esclarecer a participação do estresse nutricional na indução dos marcadores para estresse oxidativo, ainda que na ausência de um desafio de porfiria aguda. Ressaltamos que o modelo de administração de SAME não se mostrou efetivo na condição alimentada (Rocha, 1998; Rocha et al., 2000a).

As alterações ultraestruturais hepáticas e cerebrais encontradas nos ratos tratados com SAME ocorreram essencialmente no compartimento mitocondrial, confirmando os achados de Biempica e colab., 1974. As alterações nas mitocôndrias dos hepatócitos após o tratamento com 10, 40 e 80 mg SAME/kg peso corporal (**Figuras 4C-H, 5A-D**), e das células cerebrais após o tratamento com 10 e 40 mg SAME/kg peso corporal (**Figura 7B-D**), incluíram formas bizarras, condensação extrema da matriz, inclusões eletrondensas, inchamento e perda atípica da crista, também associadas com disfunção nos hepatócitos e danos em diversas outras condições como porfiria humana, porfiria experimental e o uso de agentes porfirinogênicos (Granick, 1963; Reynolds, 1965; Biempica et al., 1967; Biempica et al., 1991). Entre estas alterações, entretanto, as inclusões mitocondriais e o aumento da eletrondensidade da matriz, indicativas de danos mitocondriais, prevaleceram entre as outras. Danos semelhantes têm sido descritos em diversas doenças hepáticas, incluindo PAI (Perlroth et al., 1966), embora em apenas alguns casos (Biempica et al., 1974), bem como em hepatócitos de ratos intoxicados com tetracloreto de carbono. Formas mitocondriais anormais e aumento do número de mitocôndrias fantasmas também são alterações comuns relacionadas com as porfirias humanas, e também foram encontradas em culturas de hepatócitos

expostos a agentes porfirogênicos (Granick, 1963; Reynolds, 1965; Biempica et al., 1967; Biempica et al., 1991). Os efeitos morfológicos do SAME nas mitocôndrias podem ser causados pelo estresse oxidativo relacionado aqui com a oxidação de proteínas e com o acúmulo de ALA. Muito provavelmente, entretanto, este desbalanço não ultrapassa a capacidade antioxidante dos hepatócitos e das células cerebrais, uma vez que características apoptóticas nucleares não foram encontradas. Neste contexto, a adaptação celular em resposta aos efeitos pro-oxidativos do ALA parecem prover proteção contra a geração de ROS e a indução de apoptose naqueles tecidos (hepático e cerebral).

Um estudo conduzido por Biempica e colab. (1974) com pacientes porfíricos descreveu: *i)* alterações mitocondriais e aumento do número de mitocôndrias contendo vacúolos autofágicos, que estariam relacionados a um aumento do *turnover* mitocondrial, *ii)* aumento nos grânulos de lipofusцина contendo material denso e estruturas de mielina, *iii)* acúmulo de gotas de lipídios no citoplasma de hepatócitos como um efeito secundário da oxidação mitocondrial deficiente de ácidos graxos, e *iv)* grânulos positivos para ferro relacionados com os danos mitocondriais. Em relação à presença de grânulos positivos para ferro relacionados com os danos mitocondriais, este resultado também foi evidenciado para os animais tratados cronicamente com ALA (Tomáz-Zapico, 2002). Nesta tese de doutoramento (**Figuras 3, 4, 5 e 7**), *i)* a morfologia e o número de vacúolos autofágicos nos espécimens experimentais foram similares, *ii)* as estruturas de mielina também foram similares nos espécimens controle e experimentais, *iii)* as gotas de lipídios pareceram estar discretamente aumentadas, e *iv)* nenhum grânulo positivo para ferro foi relacionado com as alterações mitocondriais encontradas. Estas diferenças

nos achados ultraestruturais podem ser uma consequência do modelo de porfiria agudo usado no presente estudo, uma vez que períodos mais longos podem ser necessários para o sistema biológico traduzir os efeitos das drogas em danos teciduais.

5.2. Modelo de estudo de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, baseado na administração de SAME – Tratamento agudo por 18 h

Embora curiosamente uma inibição de ALA-D pela administração de SAME a ratos em intervalos de 9 h (3 injeções) não tenha sido evidenciada, o tratamento resultou no aumento dos níveis de ALA em plasma e fígado, de uma maneira concentração dependente (grupos BII e BVI), quando comparado ao controle (**Tabela 9**). Para a dose de SAME de 40 mg, o aumento da concentração plasmática de ALA foi similar ao dos grupos administrados com uma dose semelhante de ALA ou de ALA associado ao SAME (grupo BV). Houve, entretanto, uma tendência para que os níveis de ALA no plasma sejam menores para o grupo injetado com ALA apenas, e maiores para o grupo tratado com a combinação dos compostos (ALA + SAME). Como a administração de SAME promove o acúmulo de ALA pela inibição da ALA-D, em conjunto, estes dados sugerem que o organismo depende muito mais do ALA endógeno do que do ALA exógeno para sinalizar eventos e alterações biológicas, e desta maneira, um modelo de estudo para porfiria hepática baseado na administração de SAME seria muito mais efetivo do que aquele baseado na administração de ALA, desconsiderando-se, ainda, que este último promove danos oxidativos e teciduais adicionais pela ação do oxigênio singlete e dos radicais fotossensibilizados pelas porfirinas acumuladas, mascarando os efeitos do ALA. Os

dados observados de ALA hepático oferecem suporte adicional a esta suposição, pois (i) o grupo tratado com 40 mg de SAME/kg (BII) foi o que apresentou os maiores níveis de ALA, e (ii) parece haver uma tendência para os grupos BV e BVI, injetados respectivamente, com 30 mg ALA + 10 mg SAME e 10 mg SAME, apresentarem concentrações aumentadas de ALA no fígado, e em níveis semelhantes entre si, quando comparados ao controle e ao grupo tratado com ALA apenas. Isto sugere que o acúmulo de ALA hepático é conseqüente da administração do SAME, e não da injeção do ALA. Esta hipótese pode ainda ser sustentada pelo padrão de acúmulo de ALA plasmático e em tecido hepático encontrado pelos grupos tratados agudamente, por 36 h (injeções a cada 18 h), com 40 mg de SAME ou ALA (grupos AIII e AVII, respectivamente – **Tabela 6**).

A presença de uma resposta dependente de concentração para os níveis de ALA no plasma de animais administrados com 10 e 40 mg SAME durante 18 h (**Tabela 9**), e a ausência desta relação quando o tratamento é estendido para 36 h (**Tabela 3**) parece sugerir que o sistema biológico requer uma concentração mínima de ALA, bem como um tempo mínimo de resposta, para potencializar os processos de oxidação deste metabólito acumulado. Neste sentido, a ausência do efeito dose-resposta para as concentrações plasmáticas de ALA nos animais tratados com 40 mg de SAME por 36h pode ser um reflexo da conversão de parte deste composto em DOVA.

O tratamento dos animais com ALAME, o éster metílico de ALA, foi incapaz de disponibilizar ALA para o sistema biológico (**Tabela 9**). Estes dados foram confirmados pelos resultados encontrados para o grupo AVII, que recebeu administração aguda de ALAME a cada 18 h, durante 36 h (**Tabela 6**). Este efeito

poderia, à primeira vista, ser explicado pelo fato de em pH fisiológico, o ALAME apresentar o grupamento amina (pKa 8,1) protonado e o carboxílico (pKa ~ 5) metilado, conferindo uma carga residual (polaridade) positiva à molécula e dificultando seu transporte através de membranas. Entretanto, sabe-se, dos estudos de aplicação de ALA em PDT, como precursor de porfirinas fotossensibilizantes, que ésteres alquílicos de ALA são mais incorporados em tumores e, portanto, mais efetivos do que o ácido ALA. Casas e colab. (2001) relataram que cerca de 50 ng de PP-IX/ 10^5 células tumorais são formados sob tratamento com 0,6 mM de ALA, 1,2 mM de metil ALA (ALAME) e apenas 10 μ M de *n*-hexil ALA. Assim, a ineficácia aparente do ALAME em nossos experimentos deve ter outras explicações, provavelmente relacionadas com a existência de permeases ativas para ALA. De fato, Berger e colab. (2000) revelaram que etilenoglicol e ALA conjugada e aminoácidos levam à maior produção de PP-IX em linhagens de carcinoma de rato e humanas do que ALA livre.

Quando analisamos a resposta biológica para a atividade da GPx em tecido hepático de ratos tratados com SAME durante 18 h ou 36 h (**Tabelas 7 e 10**), verificamos que (i) os efeitos máximos pró-oxidantes da SA em ratos podem ser mediados por uma dose limite na faixa entre 10 a 40 mg/kg; e (ii) há uma resposta adaptativa do organismo aos níveis de drogas administrados, em que cada dose aplicada atuaria como um agente preconditionante, preparando o organismo para responder positivamente aos desafios (oxidativos ou não) subsequentes. Neste sentido, quanto maior a dose tóxica inicial administrada, mais eficaz seria a resposta biológica de defesa do organismo submetido a uma nova dose da droga. Os resultados descritos para os grupos BII e BVI parecem confirmar esta hipótese

(**Tabela 10**). No entanto, haveria um momento em que o estímulo à defesa do organismo frente ao estabelecimento de um estado redox atingiria um platô, e a partir deste momento, o organismo estaria predisposto a sofrer os danos oxidativos de uma maneira dependente de dose. Os resultados para a atividade de GPx do fígado do grupo AIII, tratados por 36 h, parecem confirmar esta hipótese (**Tabela 7**). É possível que em tratamentos onde o intervalo entre as injeções seja aumentado, o condicionamento do organismo em responder aos danos oxidativos, embora presente, seja menos intenso, como se a memória do organismo ao dano fosse decodificada. Demasi e colab. (1997), estudando a correlação entre a capacidade antioxidante do plasma e os danos oxidativos teciduais (fígado, cérebro e músculo vermelho) após a administração de ALA em ratos, encontraram que embora os tecidos sofram os danos oxidativos do ALA, o sistema antioxidante do plasma é capaz de responder ao tratamento com ALA. No plasma, o ALA não foi capaz de oxidar constituintes plasmáticos e de ligar-se às suas proteínas (Demasi et al., 1997). Ainda, de acordo com Demasi (1995), o sistema antioxidante plasmático responde à sobrecarga de ALA durante o tratamento, refletindo os danos oxidativos produzidos nos tecidos de acordo com o padrão de resposta adaptativa. Para Demasi (1995), nos tecidos, esses danos oxidativos também seriam parcialmente suprimidos ao longo do tratamento em resposta ao estímulo adaptativo. Ressaltamos que nesta tese de doutoramento, cada animal recebeu 3 injeções da droga selecionada.

Baseados nas atividades encontradas de SOD e GPx, e na quantidade de ferro total não hemínico em tecido hepático, descritos nas **Tabelas 7 e 10** para os grupos tratados com 10 e 40 mg de SAME, poderíamos sugerir que o modelo de

estudo para porfiria hepática baseado na administração aguda de SAME durante 36 h é mais efetivo do que aquele estabelecido durante 18 h, pois os valores absolutos médios para estes parâmetros de desbalanço redox (SOD, GPx e ferro total não hemínico) avaliados foram reduzidos. A redução dos níveis de ferro poderia ser explicada pelos seguintes eventos: nos estágios iniciais do estresse, uma maior quantidade deste íon seria mobilizada para os tecidos (daí os maiores valores apresentados para os grupos tratados durante 18 h), no entanto, nas horas subsequentes de resposta ao estresse, este acúmulo de ferro estimularia a síntese de ferritina (Rocha et al., 2003), e novamente, parte deste metal voltaria a ser incorporado e armazenado na ferritina (por isso os valores menores para ferro apresentados para os grupos tratados durante 36 h). O aumento da expressão de ferritina, evidenciado por imunohistoquímica para os animais tratados com SAME durante 36 h, oferece suporte adicional a esta hipótese (**Figura 1**).

Quando comparamos a atividade de SOD dos animais controle deste estudo (**Tabela 10**) com a dos animais controle do grupo tratados por 36 h (grupo AI) (**Tabela 7**), ela parece sugerir que a composição da dieta pode exercer um efeito protetor (compensatório) ao estresse nutricional nas horas iniciais de jejum. A ração administrada em nosso biotério é enriquecida com carboidratos, aminoácidos, vitaminas e antioxidantes. De acordo com informações do fornecedor, a composição básica do produto inclui: carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcio, cloreto de sódio, Premix vitamínico mineral e de aminoácidos, e aditivos antioxidantes para evitar deterioração da ração. Os níveis de garantia do produto incluem, entre outros fatores, suplementação vitamínica por quilo não menos que 12.000 UI de vitamina A, 1.800 UI de vitamina D3, 30 mg de

vitamina E, cerca de 100 mg de complexo B, 60 mg de ácido pantotênico, 1 mg de ácido fólico e microelementos minerais (como Fe, Zn, Cu, Mn, Se, Co) e, como aditivo antioxidante, 100 mg de Sinox (contendo 15 mg de β -hidroxietiltolueno - BHT).

5.3. Mecanismos de danos neurológicos induzidos a ratos por SAME e/ou ALA

– Tratamento crônico por 30 dias

Neste capítulo da tese, buscou-se caracterizar efeitos bioquímicos e fisiológicos nas mitocôndrias do córtex cerebral resultantes do tratamento crônico de ratos com SAME e ALA. Para isso, aplicou-se uma tecnologia óptica desenvolvida recentemente pelo professor Roger Springett da Dartmouth Medical School, capaz de monitorar *in vivo* a oxigenação cerebral e o consumo de oxigênio (CMRO₂).

Possivelmente, os achados mais importantes desta parte do estudo são as reduções nos níveis de CBF e CMRO₂ induzidos pelo tratamento com ALA (grupo CIV), descritas durante a hiperemia reativa na primeira e na segunda DDC (**Figuras 10, 11 e 12**). A relação causal entre as reduções nos níveis de CBF e CMRO₂ pode envolver uma vasoconstrição dependente do endotélio promovida pelo ALA, a qual reduziria o CBF, e consequentemente, níveis mais baixos de oxigênio seriam disponibilizados aos tecidos e as taxas de CMRO₂ também seriam reduzidas (num processo adaptativo). Este efeito vasoconstritor, mediado pelo ALA, está de acordo com os dados descritos por Johnson e Johnson (2003), os quais mostraram que, em arteríolas isoladas do músculo gracilis com endotélio intacto, ALA e monóxido de carbono (CO) promovem uma vasoconstrição dependente do endotélio. Este efeito vasoconstritor foi convertido em vasodilatação pela remoção do endotélio ou pelo

pré-tratamento com um inibidor da óxido nítrico (NO) sintase (NOS), associado ou não a um doador de NO. No primeiro experimento, poder-se-ia perguntar se no sistema vascular, $O_2^{\bullet-}$ gerado e propagador da oxidação de ALA não estaria atuando como sequestrador de NO (constante de velocidade de segunda ordem, k_2 , da ordem de $10^{10} M^{-1}s^{-1}$, segundo Radi et al., 1991), resultando em vasoconstrição. De acordo com Johnson e Johnson (2003), o efeito de ALA poderia estar associado à atividade do CO formado exogenamente. O ALA poderia direcionar a formação de CO nestes microvasos isolados, com efeitos vasoconstritores decorrentes da geração subsequente de CO pela inibição dos efeitos vasodilatadores do sistema NO/NOS (Johnson; Johnson, 2003). Os tecidos vasculares normalmente expressam a heme oxigenase (HO), que metaboliza o heme para formar CO. O CO promove o relaxamento do músculo liso dos vasos, porém ele também inibe a formação de NOS e de NO, e, desta maneira, também poderia exercer uma influência vasoconstritora no tônus vascular (Johnson et al., 1999). Neste sentido, Andresen e colab. (2006) mostraram que o CO não é um dilatador fisiológico das artérias cerebrais de roedores adultos. Assim, parece que os níveis endógenos de CO são capazes de inibir a atividade da NOS endotelial em condições fisiológicas, mas este efeito inibitório torna-se mais severo durante certas condições patofisiológicas quando a formação de CO endógeno é aumentada (Johnson; Johnson, 2003), como durante a administração do ALA exógeno. Devido ao fato da atividade da HO parecer ser regulada pela disponibilidade de substrato (Johnson et al., 1999; Morimoto et al., 2001), o fornecimento de ALA exógeno direciona a biossíntese do heme (Landaw et al., 1987) e, conseqüentemente, aumenta a atividade da HO e a formação endógena de CO (Leffler et al., 2002; Wilson et al., 2002) de uma maneira

concentração dependente (Leffler et al., 2002). Johnson e Johnson (2008) mostraram que o ALA aumenta os níveis de CO gerado pela HO em 29%, o que interfere/atenua a dilatação induzida pelo fluxo na vasculatura e, conseqüentemente, pode contribuir para uma disfunção vascular após o dano.

Os dados obtidos nesta tese para os ensaios de reatividade vascular oferecem suporte adicional ao fato do tratamento com ALA prejudicar a vasodilatação quando comparado ao controle (**Tabela 11**). Um achado curioso foi a redução encontrada para a produção de superóxido para os anéis de aorta de ratos incubados com ALA. É possível que, como proposto acima, $O_2^{\bullet-}$ produzido em excesso pela oxidação de ALA esteja consumindo NO, prejudicando a vasodilatação e diminuindo a concentração detectável de superóxido. Como a vasoconstrição é direcionada pelo aumento nos níveis de cálcio, e o acúmulo de quantidades excessivas de cálcio pode levar à MTP, poder-se-ia especular que, assim como as porfirinas, o ALA possa comprometer as atividades mitocondriais, como já foi demonstrado por Hermes-Lima e colab. (1991), Hermes-Lima e colab. (1992), Hermes-Lima (1995). Bechara (1996) relatou que sobrecarga experimental (e possivelmente clínica em pacientes porfíricos) de ALA pode aumentar os níveis de ROS no cérebro, disparando estresse oxidativo. Utilizando sinaptosomas isolados de ratos e posterior tratamento com ALA ou sinaptosomas de ratos injetados com ALA, também se verificou alterações da função mitocondrial, redução do $CRMO_2$ e aumento da liberação de cálcio intramitocondrial (Penatti et al., 1996).

Ainda em relação à redução encontrada para a produção de superóxido nos anéis de aorta de ratos incubados com ALA, este evento poderia estar associado ao fato de que com o consumo do $O_2^{\bullet-}$ produzido em excesso pela oxidação de ALA

pelo NO, menos do $O_2^{\bullet-}$ estaria disponível para oxidar o ALA e propagar a reação radicalar, e conseqüentemente, menos do $O_2^{\bullet-}$ também passaria a ser formado.

Outra explicação para a relação causal entre as reduções nos níveis de CBF e $CMRO_2$ com o tratamento com ALA envolveria alterações no metabolismo cerebral, talvez como uma conseqüência dos efeitos pró-oxidativos do ALA. Para o cérebro, diante da redução da função celular mediada pela geração de ROS, via ALA ou intermediários do ALA (como PP-IX), a atividade neuronal seria deprimida e o metabolismo cerebral seria reduzido. Assim, o $CMRO_2$ seria reduzido devido ao dano celular, o que poderia levar a reduções nos níveis do CBF. Por outro lado, as taxas do CBF também poderiam ser reduzidas a níveis mais baixos do que os do $CMRO_2$, tanto global quanto localmente, e uma condição de hipoxia poderia ser instalada. Como conseqüência adaptativa, os níveis de $CMRO_2$ seriam reduzidos.

De acordo com Atamna e colab. (2002), altos níveis de heme induzem a HO, e se as altas taxas de heme persistirem, elas podem ainda contribuir para um dano oxidativo. Como a síntese de heme pode ser direcionada pela provisão de ALA exógeno, isto oferece suporte adicional para a correlação entre os efeitos pró-oxidativos do ALA (ou do PP-IX gerado pelo ALA) e as modificações no metabolismo cerebral (traduzidos como as reduções nos níveis de CBF e $CMRO_2$) observados neste estudo com o tratamento crônico com ALA.

Um terceiro fator que pode estar implicado nas alterações do metabolismo cerebral induzidos pelo tratamento com ALA é que este metabólito pode interferir com o transporte de glicose nas células (Juknat et al., 1995; Princ et al., 1994) e gerar uma redução na atividade funcional das células cerebrais. Interferências na função da ATPase Na^+/K^+ e a repolarização defeituosa das membranas sinápticas

produzirão especialmente a entrada de íons Na^+ e Ca^{2+} , levando a uma depleção da energia e a um aumento dramático da concentração de cálcio intracelular, causando danos mitocondriais irreversíveis. Níveis elevados de cálcio intracelular ativam enzimas dependentes de cálcio, como proteases, lipases e endonucleases, as quais mediam processos autodestrutivos. Hermes-Lima e colab. (1991) mostraram que o ALA promove uma permeabilização das mitocôndrias de fígado de ratos (indução de MTP), mediada por íons cálcio.

No que toca à relação entre CBF e pressão arterial média, verificamos uma tendência para a pressão arterial ser discretamente reduzida após o tratamento com ALA (dados não mostrados).

Interessantemente, quando o tratamento com ALA foi associado ao de SAME (grupo CV), os níveis de CBF, CMRO_2 e pressão arterial foram reestabelecidos (**Figuras 10, 11 e 12**). Como o tratamento concomitante de ratos com ALA e SAME compromete a formação de porfirinas, estes dados poderiam sugerir que os efeitos no sistema vascular do ALA exógeno ou endógeno também dependem da biossíntese de porfirinas. O ALA é a precursor chave na síntese de PP-IX, o cromóforo do heme nas mitocôndrias. Como o SA inibe a via biossintética do heme na etapa catalisada pela ALA-D, o aumento da síntese de PP-IX pelo ALA deve ser suprimido na presença de SA ou SAME. Por outro lado, o acúmulo celular de PP-IX, um reconhecido fotosensibilizador, pode ser aumentado pela administração exógena de ALA. Assim, os efeitos pró-oxidativos e os danos celulares mediados pelo PP-IX gerado pelo ALA seriam minimizados diante da administração de ALA + SA quando comparados com a administração de ALA apenas. Como o PP-IX sintetizado localiza-se predominantemente nas mitocôndrias, o acúmulo de PP-IX mediado pela

administração de ALA é regulado pela incorporação celular de ALA e sua conversão a PP-IX, e pela degradação do heme.

É também possível que durante o tratamento com SAME, as reduções nos níveis do CBF tenham sido prevenidas pela vasodilatação mediada pelo NO em resposta a um aumento nos níveis de serotonina. A TP participa do metabolismo do triptofano. Na deficiência do heme, os níveis de TP são reduzidos e as concentrações de triptofano aumentam. Como o triptofano é um precursor da serotonina, as concentrações deste hormônio devem ser aumentadas na deficiência do heme. A serotonina atua como um indutor solúvel dos receptores de membrana das células endoteliais, levando à ativação da e-NOS e a produção de NO (Busconi; Michel, 1993). O NO endotelial estimula a guanilato ciclase solúvel e promove o relaxamento da musculatura lisa vascular. De fato, uma depleção da biossíntese do heme é esperada com o tratamento dos animais com SAME devido à inibição da ALA-D pelo SA. Em adição, aumentos nas concentrações de serotonina são descritos durante crises porfíricas (PAI) (Badawy; Evans, 1972; Puy et al., 1996).

Outro fator a ser considerado é que neste estudo, as DDCs foram induzidas pela aplicação de KCl concentrado à dura, e alterações no CBF podem ser causadas pelo potássio, que é um vasodilatador (Regulação metabólica de fluxo sanguíneo cerebral, *on line*). Assim, alterações locais nos vasos sanguíneos podem ter ocorrido, especialmente para o grupo tratado com SAME, o que também pode estar associado à influência da vasodilatação mediada pelo NO.

Neste estudo, a ausência de uma forte alteração no metabolismo cerebral mediado pelo desbalanço redox induzido pelo ALA também poderia estar associada aos efeitos repressoriais do heme nos níveis do mRNA da ALAS mitocondrial. Como

a administração exógena de ALA direciona a biosíntese do heme (Landaw et al., 1987), diante do tratamento crônico com ALA conduzido neste estudo, o heme produzido em excesso pode ter desenvolvido uma regulação diferencial nos níveis do mRNA da ALAS, inibindo a produção endógena de ALA e conseqüentemente, minimizando os efeitos pró-oxidativos do ALA. Zheng e colab., 2008, descreveram que com o tratamento de heme, os níveis do mRNA da ALAS foram negativamente regulados, com redução significativa de aproximadamente 50% ou mais devido a decréscimos na meia-vida dos mRNA. No mais, os níveis mitocondrias de proteínas maduras precursoras de ALAS foram negativamente regulados entre 60 a 70%, mas aquelas dos precursores protéicos citosólicos foram positivamente reguladas entre 2 a 5 vezes.

Além disso, uma adaptação celular em resposta aos efeitos pró-oxidativos do ALA pode ter conferido uma proteção contra a geração de ROS nos tecidos cerebrais. Como sabemos, um mecanismo celular para prevenir o acúmulo intracelular de ALA, possivelmente um mecanismo detoxificante contra as propriedades pró-oxidantes do ALA, pode operar (Demasi et al., 1997).

Em relação à ausência de um comprometimento mitocondrial significativo em resposta ao desbalanco redox induzido pelo tratamento com SAME e/ou ALA (**Figuras 10, 11 e 12**), este resultado poderia ser uma conseqüência da composição da dieta administrada aos animais durante o estudo. Os animais foram alimentados com uma dieta enriquecida em anti-oxidantes, que poderiam ter prevenido o estresse oxidativo induzido pela administração de SAME ou ALA. Neste estudo, os ratos foram alimentados com a ração esterilizada para camundongos/ratos Harlan Teklad LM-485 (código do produto 7012), desenvolvida para preservar a composição

e o balanço nutricional. Este produto é suplementado com quantidades adicionais de diversas vitaminas (vitamina A, tiamina, ácido pantotênico, e vitamina K – complexo menadiona bissulfito de sódio) e desprovido de proteínas animais para eliminar virtualmente as nitrosaminas.

Nenhuma redução na concentração de hemoglobina foi observada com o tratamento de SAME (**Figuras 9-13**). Como a SA é um inibidor da ALA-D, seria esperado uma depleção da biosíntese do heme com o tratamento com SAME, e consequentemente, a síntese de hemoglobina seria reduzida. As consequências dos níveis reduzidos de heme nas células não eritróides representam perda do complexo IV mitocondrial, estresse oxidativo, acúmulo de ferro, e morte celular sempre que o estímulo por fatores de crescimento ocorrer (Amuro et al., 1984; Atamna et al., 2001, 2002; Killilea et al., 2003). A atividade do complexo IV está fortemente acoplada à atividade metabólica neuronal (Nakao et al., 1998), e por esta razão, o cérebro pode ser o órgão mais susceptível ao decréscimo no complexo IV e ao estresse oxidativo.

Atamna e colab. (2002) mostraram que baixos níveis de heme não apresentam resultados imediatos na redução da viabilidade celular, mas antes interferem na resposta celular ao estresse ou inibem a finalização da diferenciação. Neste contexto, a redução dos níveis do CBF observados com o tratamento com ALA poderia ainda ser uma consequência das alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas hemáceas. A membrana das hemáceas poderia ser danificada pelo estresse oxidativo induzido pelo ALA (Oteiza; Bechara, 1993) ou porfirinas, o que poderia aumentar a permeabilidade da membrana celular e promover o inchamento da célula. O aumento do volume das hemáceas reduziria a velocidade destas células

e então seu fluxo através dos vasos sanguíneos, o que seria traduzido em níveis mais baixos do CBF.

Boogert e colab., 2001, descreveram que os danos do ALA são mediados por danos celulares, e não vasculares. O autor observou que 48 h após o tratamento de ratos com ALA e PDT, uma inflamação severa da área tratada com infiltração de células inflamatórias e hiperemia (fluxo sanguíneo aumentado e vasodilatação em resposta à reação inflamatória) foi estabelecida, e nenhum sinal de vasoconstrição foi descrito. Entretanto, van der Veen e colab. (1999) descreveram uma vasoconstrição na pele de camundongos sem pêlo após o tratamento tópico com ALA e PDT. De fato, o efeito do ALA nos vasos foi inconclusivo. Tanto vasoconstrição quanto vasodilatação foram encontradas (Leveckis et al., 1995; Svanberg et al., 1996; Wang et al., 1997).

Neste sentido, dados preliminares de um estudo realizado na Dartmouth Medical School, com cultura de células de linfoma humano (dados não mostrados) mostraram que, após a incubação das células com 1 mM de SAME, por 48 h, as células tratadas apresentavam uma menor taxa de crescimento quando comparado ao grupo controle, o que poderia ser indicativo de um déficit energético em decorrência de alterações nas mitocôndrias. Estas células também pareciam apresentar um menor diâmetro. Interessantemente, para as células tratadas, uma maior velocidade para o consumo de oxigênio (maior $CRMO_2$) foi observada, bem como um aumento da razão entre o $CRMO_2$ e a concentração total de cit c. Este achado poderia ser indicativo de que as mitocôndrias estivessem trabalhando em sua taxa máxima de atividade. Embora não tenha sido confirmado pelos experimentos, este aumento da razão entre o $CRMO_2$ e a concentração total de cit c

também poderia ser sugestivo de um maior vazamento de elétrons na cadeia respiratória, até mesmo na tentativa de controlar/regular um aumento na geração de ROS associadas ao maior CRMO_2 (mecanismo adaptativo). Interessantemente, quando as células foram tratadas com 0,5 mM de SAME (incubação por 48 h), foi observada redução da velocidade de consumo de oxigênio, bem como redução da concentração total de cit c. Estas células pareciam ainda apresentar uma maior taxa de *turnover*, o que faz o potencial de membrana reduzir e prevenir modificações no padrão de oxidação do cit c.

Quanto ao comportamento dos animais (dados qualitativos não mostrados) nas gaiolas, observamos diferenças entre os animais tratados e controle. Um aumento na agressividade dos animais tratados foi observado durante o manuseio, especialmente para o grupo CIV e mais severamente aos 15 dias do início do tratamento. É interessante notar que uma das manifestações neurológicas de porfrias hereditária ou adquirida, caracterizadas por acúmulo de ALA, como são os casos de PAI e saturnismo, respectivamente, é de natureza comportamental. Indivíduos portadores destas desordens desenvolvem atitudes agressivas e mesmo delinquentes, como relatados por diversos autores (Bechara, 2006; Olympio et al., 2009).

Após 15 dias de tratamento com ALA, os ratos retornaram ao comportamento normal. Esta maior agressividade poderia ser uma consequência tanto de lesão oxidativa a receptores gabaérgicos por ALA e SAME (Adhikari et al., 2007), quanto da redução da oxigenação cerebral, pois condições de hipóxia levam as células neuronais ao estresse. Como as manifestações neurológicas das porfrias são associadas com um aumento nos níveis plasmáticos de ALA, poderíamos sugerir

que a indução máxima dos níveis de ALA é alcançada dentro de duas semanas, e após este período, uma adaptação metabólica ocorre, o que pode restaurar os níveis de ALA. Outra observação qualitativa é que os animais tratados pareciam estar doloridos ao manuseio, o que nos remete à dor abdominal vivenciada pelos pacientes com porfirias (Sassa; Kappas, 1983; Kappas et al., 1983; Kappas et al., 1995; Klaassen, 1996).

Nosso estudo não foi capaz de caracterizar os efeitos do ALA nas mitocôndrias do córtex cerebral, numa tentativa de avaliar-se se os sintomas neurológicos nas porfirias são uma consequência da disfunção mitocondrial ou devido ao estresse oxidativo associados a estas desordens. Entretanto, em conjunto, estes dados sugerem que os animais tratados com ALA se encontram num estado máximo de hipóxia, talvez como uma consequência dos efeitos do ALA nos níveis do CBF e do CMRO₂. No tratamento com ALA, os níveis do CBF e do CMRO₂ poderiam ser reduzidos como uma consequência do(a) (1) efeito vasoconstritor do CO formado em resposta ao ALA e do CO gerado pela HO, (2) efeito vasoconstritor em resposta à depleção do NO, que estaria sendo consumido pelo O₂^{•-} produzido em excesso pela oxidação do ALA, (3) comprometimento da função celular mediada pela geração de ROS via ALA ou intermediários do ALA, (4) interferência do ALA com o transporte de glicose, a qual depletaria a atividade funcional das células cerebrais, ou (5) a combinação destes fatores. Ao longo do tempo, a conjunção destes fatores induziria e manteria os animais tratados com ALA em um estado de hipóxia. Em adição, como a associação dos tratamentos com ALA e SAME restaurou todas as alterações induzidas pelo ALA (mostrados aqui com níveis de CBF e CMRO₂ reduzidos), pode-se concluir que as alterações mediadas pelo ALA exógeno

poderiam levar à vasoconstrição, enquanto as alterações induzidas pelo ALA acumulado metabolicamente, via administração de SAME, promovem vasodilatação.

6. CONCLUSÕES

6.1. Modelo de estudo de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, baseado na administração de SAME- Tratamento agudo por 36 e 18 h

Os resultados obtidos sugerem que:

- ✓ o modelo de estudo de porfirinas associadas ao acúmulo de ALA, via inibição da enzima ALA-D, baseado no tratamento agudo com SAME por 36 h é mais efetivo em promover danos oxidativos induzidos pelo ALA quando comparado ao modelo conduzido por 16 h.
- ✓ o ALA pode, de fato, estar envolvido com os distúrbios metabólicos das porfirias associadas ao acúmulo de ALA por deficiência da ALA-D, como a TH1.
- ✓ SAME parece ser mais efetivo que ALA no estabelecimento de um modelo de porfiria hepática via desbalanço redox.
- ✓ o organismo parece depender mais do ALA endógeno do que de ALA exógeno para sinalizar eventos e alterações biológicas associadas ao acúmulo deste metabólito.
- ✓ este protocolo deveria prevenir os efeitos indesejáveis resultantes dos danos fotoquímicos dos tecidos pelo oxigênio singlete e radicais gerados pelas porfirinas reduzidas, hiperproduzidas nos modelos de porfirias baseadas na administração direta do ALA.

O modelo de porfiria hepática aguda baseado no tratamento agudo com SAME por 36 h mostrou-se confiável pelo fato de nos permitir observar, juntamente

com outros parâmetros indicativos de porfiria, um aumento significativo de ALA (plasmático, hepático, cerebral e urinário), bem como um decréscimo de COPRO na urina, em consequência à inibição da ALA-D por SA, mimetizando o estado metabólico observado nos portadores de porfirias associadas à deficiência de ALA-D e tirosinemias. Embora o modelo animal apresentado neste trabalho não reproduza exatamente uma porfiria hepática humana no que se refere às manifestações clínicas neuroviscerais (possivelmente em decorrência do curto período de tratamento), do ponto de vista bioquímico, ele se assemelha com bastante precisão às porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA, como a TH1 e a PAI. De fato, publicações prévias desta doença em humanos relatam uma inibição da ALA-D. Ainda que discretos, os aumentos observados dos marcadores de desbalanço redox – conteúdos de carbonil proteínas, MDA, GSH/(GSH+GSSG), ferro, ferritina e atividade de GPx – são esperados da atividade hiperoxidativa associada ao acúmulo de ALA. Neste sentido, estes achados estão de acordo com os relatos de Bechara (1996), em que tanto na PAI como no satunismo, o estresse oxidativo pode ser desencadeado pelo ALA. Consistentemente com estes resultados indicando um desbalanço oxidativo induzido pelo SAME, estudos ultraestruturais e histológicos revelaram alterações citosólicas e mitocondriais, em tecido hepático e cerebral, sendo contudo, mais evidentes no fígado, similares ao relatado para biópsias de fígado de pacientes de porfirias. Juntos, estes dados validam o modelo apresentado neste trabalho para o estudo bioquímico, histoquímico, imunohistoquímico e histológico de porfirias relacionadas ao acúmulo de ALA pela inibição da ALA-D.

6.2. Mecanismos de danos neurológicos induzidos a ratos por SAME e/ou ALA

– Tratamento crônico por 30 dias

Os resultados obtidos nesta tese sugerem que:

- ✓ não se verificou comprometimento mitocondrial em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo tratamento com SAME e/ou ALA, quando se analisou o estado redox do cit c do córtex cerebral de ratos.
- ✓ ALA exógeno pode levar à vasoconstrição e redução do CMRO₂ do tecido vascular cerebral de ratos, enquanto que as alterações induzidas pelo ALA acumulado metabolicamente, via administração de SAME, promovem vasodilatação.

O presente estudo não foi capaz de caracterizar se os sintomas neurológicos nas porfírias associadas ao acúmulo de ALA são uma consequência da disfunção mitocondrial ou devido ao desbalanço redox associado a estas desordens.

7. REFERÊNCIAS

1. Adams ML, Ostapiuk I, Grasso JA. The effects of inhibition of heme synthesis on the intracellular localization of iron in rat reticulocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1989; 1012:243-253.
2. Adhikari A, Penatti CA, Resende RR, Ulrich H, Britto LR, Bechara EJ. 5-Aminolevulinate and 4, 5-dioxovalerate ions decrease GABA(A) receptor density in neuronal cells, synaptosomes and rat brain. *Brain Res*. 2006; 1093:95-104.

Afonso SG, Polo CF, Salamanca RE, Batlle A. Mechanistic studies on uroporphyrin I-induced photoinactivation of some heme-enzymes. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996; 28:415-420.
3. Almeida AM, Bechara EJH, Vercesi AE, Nantes IL. Dephenylacetaldehyde-generated excited states promote damage to isolated rat liver mitochondrial DNA, phospholipids and proteins. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27:744-751.
4. Alves ANL, Burattini MN, Sumita NM, Rosa HVD. Validação de metodologia para dosagem de porfirinas urinárias por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Bras Cienc Farm*. 2007; 43:581-588.
5. Amuro N, Okada S, Goto Y, Shukuya R. Synthesis of cytochrome c oxidase in the liver of *Rana catesbeiana* tadpole treated with griseofulvin. *Biochim Biophys Acta*. 1984; 781:14-17.
6. Anderson KE. LHRH analogues for hormonal manipulation in acute intermittent porphyria. *Semin Hematol*. v.26, p.10-15, 1989.
7. Anderson KE. Doenças das porfirias ou metais. In: *Tratado de Medicina Interna*, 19ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1993. 1146-1151p.
8. Anderson KE, Sassa S, Bishop DF, Desnick RJ. Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. In: *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2001. *apud* Sassa S. Modern diagnosis and management of the porphyrias. *Br J Haematol*. 2006; 135:281-292.

9. Andersson C, Bjersing L, Lithner F. The epidemiology of hepatocellular carcinoma in patients with acute intermittent porphyria. *J Intern Med.* 1996; 240:195-201.
Andresen JJ, Shafi NI, Durante W, Bryan RM. Effects of carbon monoxide and heme oxygenase inhibitors in cerebral vessels of rats and mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291:223-230.
10. Aponte JL, Sega GA, Hauser LJ, Dhar MS, Withrow CM, Carpenter DA et al. Point mutations in the murine fumarylacetoacetate hydrolase gene: Animal models for the human genetic disorder hereditary tyrosinemia type 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:641-645.
11. Astarcioglu I, Adam R, Gigou M, Isaac J, Bismuth H. High levels of glycogen in the donor liver improve survival after liver transplantation in rats. *Transplant Proc.* 1991; 23:2465-2466.
12. Astruc T, Marinova P, Labas R, Gatellier P, Santé-Lhoutellier V. Detection and localization of oxidized proteins in muscle cells by fluorescence microscopy. *J Agric Food Chem.* 2007; 55:9554-9558.
13. Atamna H, Killilea DW, Killilea AN, Ames BN. Heme deficiency maybe a factor in the mitochondrial and neuronal decay of ageing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99:14807–14812.
14. Atamna H, Liu J, Ames BN. Heme deficiency selectively interrupts assembly of mitochondrial complex IV in human fibroblasts: relevance to ageing. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:48410–48416.
15. Badawy AA, Evans M. Alcohol addiction, porphyria and metal disorder. *Lancet.* 1972; 2:374-375.
16. Balu N, Gamcsik MP, Colvin ME, Colvin OM, Dolan ME, Ludeman SM. Modified guanines representing O(6)-alkylation by the cyclophosphamide metabolites acrolein and chloroacetaldehyde: synthesis, stability, and ab initio studies. *Chem Res Toxicol.* 2002; 15:380-387.
17. Barbeiro HM. Avaliação temporal da regulação do tônus vascular e da produção de superóxido induzido por purinas em aorta isolada de ratos Wistar endotoxêmicos [Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2005.

- Barbin G, Pollard H, Gaýarsa JL, Ben-Ari Y. Involvement of GABA_A receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett*. 1993; 152:150–154.
- Barbosa NBV, Rocha JBT, Zeni G, Emanuelli T, Beque MC, Braga AL. Effect of organic forms of selenium on δ -aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998; 149:243–253.
- Batlle AM. Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy - a model for carcinogenesis. *J Photochem Photobiol B*. 1993; 20:5-22.
- Bechara EJ. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Braz J Medic Biol Res*. 1996; 29:841-851.
- Bechara EJ, Dutra F, Cardoso VE, Sartori A, Olympio KP, Penatti CA et al. The dual face of endogenous alpha-aminoketones: Pro-oxidizing metabolic weapons. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2007; 146:88-110.
- Becker D, Viljoen D, Kramer S. The inhibition of red cell and brain ATPase by delta-aminolaevulinic acid. *Biochim Biophys Acta*. 1971; 225:26–34.
- Berger R, van Faassen H, Smith GP. Biochemical studies on the enzymatic deficiencies in hereditary tyrosinemia. *Clin Chim Acta*. 1983; 134:129-141.
- Berger Y, Greppi A, Siri O, Neier R, Juillerat-Jeanneret L. Ethylene glycol and amino acid derivatives of 5-aminolevulinic acid as new photosensitizing precursors of protoporphyrin IX in cells. *J Med Chem*. 2000; 43:4738-46.
- Bermúdez Moretti M, Correa García S, Chianelli M, Mattoon J, Ramos E, Batlle A. Evidence that 4-aminobutyric acid and 5-aminolevulinic acid share a common transport system into *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Biochem Cell Biol*. 1995; 27:169–173.
- Bernelli-Zazzera A, Gaja G. Some aspects of glycogen metabolism following reversible or irreversible liver ischemia. *Exp Mol Pathol*. 1964; 17:351-368.
- Biempica L, Kosower N, Ma MH, GoldFisher S. Hepatic porphyrias. Cytochemical and ultrastructural studies of liver in acute intermittent porphyrias and porphyria tarda. *Arch Pathol*. 1974; 98:336-343.
- Biempica L, Kosower NS, Nivikoff AB. Cytochemical and ultrastructural changes in rat liver in experimental porphyria. I. Effects of a single injection of allylisopropylacetamide. *Lab Invest*. 1967; 17:171-189.

18. Biempica L, Kosower NS, Roheim PS. Cytochemical and ultrastructural changes in rat liver in experimental porphyria. II. Effects of repeated injections of allylisopropylacetamide. *Lab Invest.* 1971; 24:110-117.
19. Boogert J van den, Staveren HJ van, Bruin RWF, Siersema PD, Hillegersberg R van. Fractionated Illumination for esophageal ALA-PDT: Effect on Blood Flow and PpIX Formation. *Lasers Med Sci.* 2001; 16:16-25.
20. Bradford BU, Marotto M, Lemasters JJ, Thurman RG. New simple models to evaluate zone-specific damage due to hypoxia in the perfused rat liver: Time course and effect of nutritional state. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986; 236:263-268.
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
22. Bralet J, Schreiber L, Bouvier C. Effects of acidosis and anoxia on iron delocalization from brain homogenates. *Biochem Pharmacol.* 1992; 43:979-983.
23. Brass CA, Narciso J, Gollan JL. Enhanced activity of the free radical producing enzyme xanthine oxidase in hypoxic rat liver: Regulation and pathophysiologic significance. *J Clin Invest.* 1991; 87:424-431.
24. Brennan MJ, Cantrill RC. Delta-Aminolaevulinic acid and amino acid neurotransmitters. *Mol Cell Biochem.* 1981; 38 Spec No(Pt 1):49-58.
25. Brennan MJW, Cantrill RC. δ -Aminolevulinic acid is a potent agonist for GABA receptors. *Nature.* 1979a; 280:514-515.
26. Brennan MJW, Cantrill RC. The effect of delta-aminolaevulinic acid on the uptake and efflux of amino acid neurotransmitters in rat brain synaptosomes. *J Neurochem.* 1979b; 33:721-725.
27. Brennan MJW, Cantrill RC. The effect of delta-aminolaevulinic acid on the uptake and efflux of [3H]GABA in rat brain synaptosomes. *J Neurochem.* 1979c; 32:1781-1786.
28. Brodie MJ, Moore MR, Goldberg A. Enzyme abnormalities in the porphyries. *Lancet.* 1977; 2:699-708.
29. Busch E, Gyngell ML, Eis M, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA. Potassium-induced cortical spreading depressions during focal cerebral ischemia in rats: contribution to

- lesion growth assessed by diffusion-weighted NMR and biochemical imaging. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16:1090-1099.
30. Busconi L, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1993; 268: 8410-8413.
31. Bylesjo I, Forsgren L, Lithner F, Boman K. Epidemiology and clinical characteristics of seizures in patients with acute intermittent inporphyria. *Epilepsia.* 1996; 37:230-235.
32. Cadet J, Carvalho VM, Onuki J, Douki T, Medeiros MH, Di Mascio P. Purine DNA adducts of 4,5-dioxovaleric acid and 2,4-decadienal. *IARC Sci Publ.* 1999; 150:103-113.
33. Caraceni P, Nardo B, Domenicali M, Turi P, Vici M, Simoncini M et al. Ischemia-reperfusion injury in rat fatty liver: Role of nutritional status. *Hepatology.* 1999; 29:1139-1146.
34. Carvalho H. Ativação da proteína reguladora da homeostase intracelular de ferro (IRP1) pelo pró-oxidante endógeno ácido δ -aminolevulínico [Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Química; 1999.
35. Carvalho H, Bechara EJ, Meneghini R, Demasi M. Haem precursor delta-aminolaevulinic acid induces activation of the cytosolic iron regulatory protein 1. *Biochem J.* 1997; 328:827-832.
36. Casas A, Fukuda H, Di Venosa G, Batlle A. Photosensitization and mechanism of cytotoxicity induced by the use of ALA derivatives in photodynamic therapy. *Br J Cancer.* 2001; 85:279-284.
37. Chisolm JJ Jr. Lead poisoning. *Sci Am.* 1971; 224:15-23.
- Cilento G, Adam W. From free radicals to electronically excited species. *Free Radic Biol Med.* 1995; 19:103-114.
38. Costa CA, Trivelato GC, Demasi M, Bechara EJH. Determination of 5-aminolevulinic acid in blood plasma, tissues and cell cultures by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromat B;* 1997; 695:245-225.
39. Cutler MG, Moore MR, Ewart FG. Effects of delta-amino levulinic acid administration on social behavior in the laboratory mouse. *Psychopharmacology.* 1979; 61:131-135.

40. Daniell WE, Stockbridge HL, Labbe RF, Woods JS, Anderson KE, Bissell DM et al. Environmental chemical exposures and disturbances of heme synthesis. *Environ Health Perspect.* 1997; 105:37-53.
41. Dawkins MJ, Judah JD, Rees KR. Factors influencing the survival of liver cells during autolysis. *J Pathol Bacteriol.* 1959; 77:257-275.
42. De Brackeleer M. Hereditary disorders in Saguenay-Lac-St-Jean (Quebec, Canada). *Hum Hered.* 1991; 41:141-146.
43. De Visscher G, Springett R, Delpy DT, Van Reempts J, Borgers M, van Rossem K. Nitric oxide does not inhibit cerebral cytochrome oxidase in vivo or in the reactive hyperemic phase after brief anoxia in the adult rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22:515-519.
44. Dean RT, Hunt JV, Grant AJ, Yamamoto Y, Niki E. Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11:161-168.
45. Dehner LP, Snover DC, Sharp HL, Ascher N, Nakhleh R, Day DL. Hereditary tyrosinemia type I (chronic form): pathological findings in the liver. *Human Pathol.* 1989; 20:149-158.
46. Demasi M. Estresse oxidativo cerebral em ratos induzido pelo ácido 5-aminolevulinico, um pró-oxidante endógeno: conexões com porfirias agudas hereditárias e saturnismo [Doutorado]. São Paulo. Universidade de São Paulo, Instituto de Química; 1995.
47. Demasi M, Costa CA, Pascual C, Llesuy S, Bechara EJ. Oxidative tissue response promoted by 5-aminolevulinic acid promptly induces the increase of plasma antioxidant capacity. *Free Radic Res.* 1997; 26: 235-243.
48. Demasi M, Penatti CAA, DeLucia R, Bechara EJH. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20:291-299.
49. Di Mascio P, Teixeira PC, Onuki J, Medeiros MH, Dornemann D, Douki T, Cadet J. DNA damage by 5-aminolevulinic and 4,5-dioxovaleric acids in the presence of ferritin. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 373: 368-374.

50. Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med.* 1991; 10: 225-242.
51. Doss MO, Kuhnel A, Gross U. Alcohol and porphyrin metabolism. *Alcohol Alcohol.* 2000; 35:109-125.
52. Douki T, Onuki J, Medeiros MHG, Bechara EJ, Cadet J, Di Mascio P. Hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by 5-aminolevulinic acid. *FEBS Lett.* 1998; 428:93-96.
53. Douki T, Onuki J, Medeiros MHG, Bechara EJH, Cadet J, Di Mascio P. DNA alkylation by 4-5-dioxovaleric acid, the final oxidation product of 5-aminolevulinic acid. *Chem Res Toxicol.* 1998; 11:150-157.
54. Dutra F, Knudsen FS, Curi D, Bechara EJH. Aerobic oxidation of aminoacetone, a threonine catabolite: iron catalysis and coupled iron release from ferritin. *Chem Res Toxicol.* 2001; 14:1323-1329.
55. Elder GH, Urquhart AJ. Biochemical indices of liver toxicity: porphyrin metabolism. In: *Occupational and environmental chemical hazards: cellular and biochemical indices for monitoring toxicity.* Chichester: Ellis Horwood, 1987. 232-290p.
56. Emanuelli T, Pagel FW, Porciuncula LO, Souza DO. Effects of 5-aminolevulinic acid on the glutamatergic neurotransmission. *Neurochem Int.* 2003; 42:115-121.
57. Emanuelli T, Prauchner CA, Dacanal J, Zeni A, Reis EC, de Mello CF et al. Intrastratial administration of 5-aminolevulinic acid induces convulsions and body asymmetry through glutamatergic mechanisms. *Brain Res.* 2000; 868:88-94.
58. Ennis SR, Novotny A, Xiang J, Shakui P, Masada T, Stummer W et al. Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain. *Brain Res.* 2003; 959:226-234.
59. Esterbauer H, Lang J, Zdravcevic S, Slater TF. Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* 1984; 105:319-328.
60. Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem.* 1995; 232:243-248.
61. Falk JE. Porphyrins and Metalloporphyrins. New York: Elsevier; 1964. *apud* Sassa S. Modern diagnosis and management of the porphyrias. *Br J Haematol.* 2006; 135:281-292.

62. Farina M, Folmer V, Bolzan RC, Andrade LH, Zeni G, Braga AL et al. Selenoxides inhibit δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicol Lett*. 2001; 119: 27–37.
63. Filkins JP, Cornell RP. Depression of hepatic gluconeogenesis and the hypoglycemia of endotoxin shock. *Am J Physiol*. 1974; 227:778-781.
64. Floderus Y, Sardh E, Moeller C, Andersson C, Rejkaer L, Andersson DEH et al. Variations in porphobilinogen and 5-aminolevulinic acid concentrations in plasma and urine from asymptomatic carriers of the acute intermittent porphyria gene with increased porphyrin precursor excretion. *Clinical Chemistry*. 2006; 52:701-707.
65. Fraga CG, Onuki J, Lusesoli F, Bechara EJH, DiMascio P. 5-aminolevulinic acid mediates in vivo and in vitro formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Carcinogenesis*. 1994; 15:2241-2244.
66. Fujita H, Ishida N, Akagi R. Delta-Aminolevulinate dehydratase deficiency. *Nippon Rinsho*. 1995; 53:1408-1417 [citado em: 15 jan 2006]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=7616655&query_hl=3&itool=pubmed_docsum.
67. Fujita H, Nishitani C, Ogawa K. Lead, chemical porphyria, and heme as a biological mediator. *Tohoku J Exp Med*. 2002; 196:53-64.
68. Fujitaa TK, Wadaa M, Okadab NI, Yamamotob A, Leibachc FH, Ganapathyc V. Functional characterization of brain peptide transporter in rat cerebral cortex: identification of the high-affinity type H⁺/peptide transporter PEPT2. *Brain Res*. 2004; 997:52–61.
69. Ganini D, Kadiiska M, Mason RP, Bechara EJH. Mechanism of myoglobin/H₂O₂-catalyzed oxidation of acetoacetate and 3-methyl acetoacetate. Apresentado no 16th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine. 2009; San Francisco, CA, USA.
70. Garrick LM, Gniecko K, Liu Y, Cohan DS, Grasso JA, Garrick MD. Iron distribution in Belgrade rat reticulocytes after inhibition of heme synthesis with succinylacetone. *Blood*. 1993; 81:3414-3421.
71. Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, Caraceni P, Van Thiel D. Fasting enhances the effects of anoxia on ATP, Ca_i⁺⁺, and cell injury in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1178:9-1119.

72. Gederaas OA, Lagerberg JW, Brekke O, Berg K, Dubbelman TM. 5-aminolevulinic acid induced lipid peroxidation after light exposure on human colon carcinoma cells and effects of alpha-tocopherol treatment. *Cancer Lett.* 2000; 159:23-32.
73. Gerscher S, Connelly JP, Beijersbergen Van Henegouwen GM, MacRobert AJ, Watt P et al. A quantitative assessment of protoporphyrin IX metabolism and phototoxicity in human skin following dose-controlled delivery of the prodrugs 5-aminolaevulinic acid and 5-aminolaevulinic acid-n-pentylester. *Br J Dermatol.* 2001; 144:983-990.
74. Gluber JG, Bargatzi MJ, Meyer UA. Primary liver carcinoma in two sisters with acute intermittent porphyria. *Amer J Med.* 1990; 89:540-541.
75. Goldberg A. Acute intermittent porphyria: a study of 50 cases. *Q J Med.* 1959; 28:183-209.
76. Goodwin JF, Murphy B, Guillemette M. Direct measurement of serum iron and binding capacity. *Clin Chem.* 1966; 12:47-57.
77. Gorchein A. Determination of delta-aminolaevulinic acid in biological fluids by gas-liquid chromatography with electron-capture detection. *Biochem J.* 1984; 219:883-889.
78. Gordon N. The acute porphyrias. *Brain Dev.* 1999; 21:373-377.
79. Gordon RD, Shaw BW, Iwatsuki K. Indications for liver transplantation in the cyclosporine era. *Surg Clin North Am.* 1986; 66:541-556.
80. Granick S. The induction in vitro of the synthesis of delta-aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria: a response to certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals. *J Biol Chem.* 1966; 241:1359-1375.
81. Granick S. Induction of the synthesis of delta-aminolevulinic acid synthetase in liver parenchyma cells in culture by chemical that induce acute porphyria. *J Biol Chem.* 1963; 238:2247-2249.
82. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998; 281:1309-1312.
83. Grompe MD. The pathophysiology and treatment of hereditary tyrosinemia type 1. *Sem in Liver Disease.* 2001; 21:563-571.
84. Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2000; 29:927-945.
85. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 1992; 59:1609-23.

86. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed. England: London Oxford University Press; 2007.
87. Handschin C, Lin J, Rhee J, Peyer AK, Chin S, Wu PH et al. Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha. *Cell*. 2005; 122:505–515.
88. Heinemann IU, Jahn M, Jahn D. The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 474:238-51.
89. Hermes-Lima M. How do Ca^{2+} and 5-aminolevulinic acid-derived oxyradicals promote injury to isolated mitochondria? *Free Radic Biol Med*. 1995; 19:381-390.
90. Hermes-Lima M, Castilho RF, Valle VGR, Bechara EJH, Vercesi AE. Calcium-dependent mitochondrial oxidative promoted by 5-aminolevulinic acid. *Bioch Biophys Acta*. 1992; 1180:201-206.
91. Hermes-Lima M, Valle VGR, Vercesi AE, Bechara EJH. Damage to rat liver mitochondria promoted by δ -aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connection with acute intermitent porphyria and lead-poisoning. *Biochem. Biophys Acta*. 1991; 1056:57-63.
92. Hindmarsh JT. The porphyrias: recent advances. *Clin Chem*. 1986; 32:1255-1263.
Hollis VS, Palacios-Callender M, Springett RJ, Delpy DT, Moncada S. Monitoring cytochrome redox changes in the mitochondria of intact cells using multi-wavelength visible light spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1607:191-202.
93. Indig GL, Campa A, Bechara EJH, Cilento G. Conjugated diene formation promoted by triplet acetone acting upon arachidonic acid. *Photochem Photobiol*. 1988; 48:719-723.
94. Jaffe EK, Rajagopalan JS. Nuclear magnetic resonance studies of 5-aminolevulinate demonstrate multiple forms in aqueous solutions. *Bioorg Chem*. 1990; 18:381-394.
95. Jaques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EMM, Rocha JBT. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in brain of mice. *Pharmacol Toxicol*. 2001; 44:119–125.
96. Jing JP, Aitken PG, Somjen GG. Role of calcium channels in spreading depression in rat hippocampal slices. *Brain Res*. 1993; 604:251-259.

97. Johnson FK, Johnson RA. Carbon monoxide promotes endothelium-dependent constriction of isolated gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 285:536–541.
98. Johnson RA, Johnson FK. Heme oxygenase-derived endogenous carbon monoxide impairs flow-induced dilation in resistance vessels. *Shock.* 2008; 29:526-530.
99. Johnson RA, Kozma F, Colombari E. Carbon monoxide: from toxin to endogenous modulator of cardiovascular functions. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32:1–14.
100. Johnston MV. Clinical disorders of brain plasticity. *Brain Dev.* 2004; 26:73-80.
101. Juknat AA, Kotler ML, Battle AMC. High d-aminolevulinic acid uptake in rat cerebral cortex: effect on pophyrin biosynthesis. *Comp Biochem Physiol.* 1995; 111C:143–150.
102. Kalapos MP. Mechanisms leading to complications in diabetes mellitus: pathologiacd role of α -oxoaldehydes. *Biochem Educ.* 1992; 20:27-29.
103. Kang ES, Gerald PS. Hereditary tyrosinemia and abnormal pyrrole metabolism. *J Pediat.* 1970; 77:397-406.
104. Kang JH, Kim KS, Choy SY, Kwon HY, Won MH. Oxidative modification of human ceruloplasmin by peroxy radicals. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1568:30-36.
105. Kappas A, Sassa S, Anderson KE. The porphyrias. In: *The metabolic basis of inherited diseases.* New York: McGraw-Hill; 1983. 1301-1384p.
106. Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y. The porphyrias. In: *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.* New York: McGraw-Hill; 1995. 2103–2159p
apud Onuki J, Teixeira PC, Medeiros MH, Dornemann D, Douki T, Cadet J, Di Mascio P. Is 5-aminolevulinic acid involved in the hepatocellular carcinogenesis of acute intermittent porphyria? *Cell Mol Biol.* 2002; 48:17-26.
107. Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y. *The metabolic basis of inherited disease.* New York: McGraw-Hill; 1989. 1305-1365p.
108. Karnik D, Thomas N, Eapen CE, Jana AK, Oommen A. Tyrosinemia type I: a clinico-laboratory case report. *Indian J Pediatr.* 2004; 71:929-932.
109. Kauppinen R. Porphyrias. *Lancet.* 2005; 365:241-252.
110. Kauppinen R, Mustajoki P. 1988. Acute hepatic porphyria and hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer,* 57: 117–120.

111. Killilea DW, Atamna H, Liao C, Ames BN. Iron accumulation during cellular senescence in human fibroblasts in vitro. *Antioxid Redox Signal*. 2003; 5:507–516.
112. King MW, Marchesini S. Heme and porphyrin metabolism. [Internet]. 2002 [citado em 05 dez 2005]. Disponível em <http://www.med.unibs.it/~marchesi/heme.html>.
113. Klaassen CD. Heavy metals and heavy-metal antagonists. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw-Hill; 1996. 1649–1671p *apud* Emanuelli T, Prauchner CA, Dacanal J, Zeni A, Reis EC, Mello CF et al. Intrastriatal administration of 5-aminolevulinic acid induces convulsions and body asymmetry through glutamatergic mechanisms. *Brain Research*. 2000; 868:88–94.
114. Konno H, Lowe PJ, Hardison WG, Miyai K, Nakamura S, Baba S. Breakdown of hepatic tight junctions during reoxygenation injury. *Transplantation*. 1992; 53:1211-1214.
115. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Grijalba MT, Bechara EJ, Vercesi AE. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1996a; 271:2929-34.
116. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett*. 1996b; 378:150-2.
117. Kowaltowski AJ, Netto LE, Vercesi AE. The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. *J Biol Chem*. 1998; 273:12766-12769.
118. Kowaltowski AJ, Vercesi AE, Castilho RF. Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with N-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca^{2+} : correlation with mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1318:395-402.
119. Kowaltowski AJ, Vercesi AE, Fiskum G. Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. *Cell Death Differ*. 2000; 7:903-910.
120. Kvittingen E. Hereditary tyrosinemia type I - an overview. *Scand J Clin Lab Invest*. 1986; 46: 27-34.

121. Kvittingen EA. Tyrosinaemia type I--an update. *J Inherit Metab Dis.* 1991; 14:554-562.
122. Laftah AH, Simpson RJ, Peters TJ, Raja KB. The effect of haem biosynthesis inhibitors and inducers on intestinal iron absorption and liver haem biosynthetic enzyme activities. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 229:273-280.
123. Lamon JM, Frykholm BC, Herrera W, Tschudy DP. Danazol administration to females with menses-associated exacerbations of acute intermittent porphyria. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979; 48:123-126.
124. Landaw SA, Sassa S, Drummond GS, Kappas A. Proof that Sn-protoporphyrin inhibits the enzymatic catabolism of heme in vivo. Suppression of ¹⁴CO generation from radiolabeled endogenous and exogenous heme sources. *J Exp Med.* 1987; 165:1195–1200.
125. Le Couteur DG, Rivory LP, Pond SM. Glucose transport and hypoxia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *J Gastroenterol Hepatol.* 1994; 9:385-390.
126. Leao AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol.* 1944; 7:359–390,
127. Leffler CW, Balabanova L, Sullivan D, Wang X, Fedinec AL, Parfenova H. Regulation of CO production in cerebral microvessels of newborn pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285:H292-297.
128. Leveckis J, Brown NJ, Reed MWR. The effect of aminolaevulinic acid-induced, protoporphyrin IX mediated photodynamic therapy on the cremaster muscle circulation in vivo. *Br J Cancer.* 1995; 72:1113–1119.
129. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464-478.
130. Lindberg RL, Porcher C, Grandchamp B, Ledermann B, Burki A, Brandner S et al. Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria. *Nature Genetics.* 1996; 12:195–199.
131. Lip GY, McColl KE, Goldberg A, Moore MR. Smoking and recurrent attacks of acute intermittent porphyria. *BMJ.* 1991; 302:507.

132. Lithner F, Wetterberg L. Hepatocellular carcinoma in patients with acute intermittent porphyria. *Acta Med Scand*. 1984; 215:271–274.
133. Litman DA, Correia MA. Elevated brain tryptophan and enhanced 5-hydroxytryptamine turnover in acute hepatic heme deficiency: clinical implications. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985; 232:337–345.
134. López-Torres M, Pérez-Campo R, Cadenas S, Rojas C, Barja G. A comparative study of free radicals in vertebrates II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress. *Comp Biochem Physiol B*. 1993; 105:757-763.
135. Luksiene Z, Eggen I., Moan J, Nesland JM, Peng Q. Evaluation of protoporphyrin IX production, phototoxicity and cell death pathway induced by hexylester of 5-aminolevulinic acid in Reh and HPB-ALL cells. *Cancer Lett*. 2001; 169:33-99.
136. Maciel EN, Bolzan RC, Braga AL, Rocha JBT. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects δ -aminolevulinate dehydratase from liver kidney and brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol*. 2000; 14:310–319.
137. Manabe S, Sassa S, Kappas A. Hereditary tyrosinemia: formation of succinylacetone-amino acid adducts. *J Exp Med*. 1985; 162:1060-1074.
138. Mashino T, Fridovich I. Superoxide radical initiates the autoxidation of dihydroxyacetone. *Arch Biochem Biophys*. 1987; 254: 547-551.
139. Matteis F, Ray DE. Studies on cerebellar haem metabolism in the rat in vivo. *J Neurochem*. 1982; 39: 551–556.
140. McBride TJ, Preston BD, Loeb LA. Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry*. 1991; 30:207-213.
141. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969; 244:6049-6055.
142. McGillion FB, Moore MR, Goldberg A. The effect of delta aminolevulinic acid on the spontaneous activity of mice. *Scot Med J*. 1973; 18:133.
143. McGillion FB, Thompson GG, Goldberg A. Tissue uptake of o-aminolaevulinic acid. *Biochem Pharmacol*. 1975; 24:99-301.
144. Medeiros MGH, Marchiori PE, Bechara EJH. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in the erythrocytes of patients with intermittent acute porphyria. *Clin Chem*. 1982; 28:242-243.

144. Medeiros MH, Di Mascio P, Gründel S, Soboll S, Sies H, Bechara EJ. Catabolism of 5-aminolevulinic acid to CO₂ by rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 1994; 310:205-209
145. Meyer UA, Schuurmans MM, Lindberg RL. Acute porphyrias: pathogenesis of neurological manifestations. *Semin Liver Dis*. 1998; 18:43–52.
Minotti G. The role of an endogenous nonheme iron in microsomal redox reactions. *Arch Biochem Biophys*. 1992; 297:189-192.
146. Mitchell GA, Lambert M, Tanguay RM. *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*. New York: McGraw-Hill; 1995. 1077p.
147. Monteiro HP, Abdalla DSP, Arcuri ASA, Bechara EJH. Oxygen toxicity related to exposure to lead. *Clin Chem*. 1985; 31:1673-1676.
148. Monteiro HP, Abdalla DS, Augusto O, Bechara EJ. Free radical generation during delta-aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. *Arch Biochem Biophys*. 1989; 271:206-216.
149. Monteiro HP, Abdalla DSP, Faljoni-Alário A, Bechara EJH. Generation of active oxygen species during coupled autoxidation of oxyhemoglobin and δ -aminolevulinic acid. *Biochim Biophys Acta*. 1986; 881:100-106.
150. Morehouse KM, Moreno SNJ, Mason RP. The one-electron reduction of uroporphyrin I by rat hepatic microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1987; 257:276-284.
151. Morimoto Y, Durante W, Lancaster DG, Klattenhoff J, Tittel FK. Real-time measurements of endogenous CO production from vascular cells using an ultrasensitive laser sensor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 280:H483–H488.
152. Mueller WE, Snyder SH. δ -Aminolevulinic acid: influences on synergistic GABA receptor binding may explain CNS symptoms of porphyria. *Ann Neurol*. 1977; 2:340–342.
153. Murata K, Sakai T, Morita Y, Iwata T, Dakeishi M. Critical dose of lead affecting delta-aminolevulinic acid levels. *J Occup Health*. 2003; 45:209-214.
154. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell WW. *Harper's Bioquímica*. São Paulo: Atheneu; 1994. 337-345p *apud* Rocha MEM. Estudos in vivo e in vitro da indução da liberação de ferro de ferritina pela ácido 5-aminolevulínico [Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Química; 1998.

155. Nakao N, Nakai K, Itakura T. Changes in the mitochondrial enzyme activity in striatal projection areas after unilateral excitotoxic striatal lesions: partial restoration by embryonic striatal transplants. *Exp Neurol*. 1998; 153:268–276.
156. Nedergaard M, Hansen AJ. Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res*. 1988; 449:395-398.
157. Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev*. 2000; 80:315-360.
158. Nicholls DG, Chalmers S. The integration of mitochondrial calcium transport and storage. *J Bioenerg Biomembr*. 2004; 36:277-281.
159. Niña J, Hems R, Krebs HA. Maintenance of glutathione content in isolated hepatocytes. *Biochem J*. 1978; 170:627-630.
160. Obrenovitch TP, Urenjak J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high glutamate to excessive synaptic efficacy. *Prog Neurobiol*. 1997; 51:39-87.
161. O'Brien PJ, Kaul H, McGirr L, Drolet D, Silva JM. Molecular mechanisms for the involvement of the aldehydic metabolites of lipid peroxides in cytotoxicity and carcinogenesis. *Pharmacol Eff Lipids*. 1989; 3:266-280.
162. Ocheltree SM, Shen H, Hu Y, Xiang J, Keep RF, Smith DE. Role of PEPT2 in the choroid plexus uptake of glycylsarcosine and 5-aminolevulinic acid: studies in wild-type and null mice. *Pharm Res*. 2004; 21:1680–1685.
163. Olanow CW. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci*. 1993; 16:439-44.
164. Olympio KPK, Gonçalves C, Günther WMR, Bechara EJH. Neurotoxicity and aggressiveness triggered by low-level lead in children – a review. *Pan American Journal of Public Health*. 2009. /no prelo/
165. Onuki J, Chen Y, Teixeira PC, Schumacher RI, Medeiros MH, Van Houten B, Di Mascio P. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by 5-aminolevulinic acid. *Arch Biochem Biophys*. 2004; 432:178-187.
166. Onuki J, Medeiros MHG, Bechara EJH, Di Mascio P. 5-Aminolevulinic acid induces single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA in the presence of Fe²⁺ ions. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1225: 259-263.

162. Onuki J, Medeiros MHG, Di Mascio P. Genotoxicity of 5-aminolevulinic acid (ALA) in the absence of light. *Trends Photochem Photobiol.* 2003; 10:15-29.
168. Onuki J, Rech CM, Medeiros MH, de A Umbuzeiro G, Di Mascio P. Genotoxicity of 5-aminolevulinic and 4,5-dioxovaleric acids in the salmonella/microsuspension mutagenicity assay and SOS chromotest. *Environ Mol Mutagen.* 2002c; 40:63-70.
169. Onuki J, Teixeira PC, Medeiros MHG, Di Mascio P. Danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulínico: possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda intermitente. *Quim Nova.* 2002a; 25:594-608.
170. Onuki J, Teixeira PC, Medeiros MHG, Dornemann D, Douki T, Cadet J et al. Is 5-aminolevulinic acid involved in the hepatocellular carcinogenesis of acute intermittent porphyria? *Cell Mol Biol.* 2002; 48:17-26.
171. Oteiza P, Bechara EJ. 5-Aminolevulinic acid induces lipid peroxidation in cardiolipin-rich liposomes. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 305:282-287.
172. Oteiza PI, Kleinman CG, Demasi M, Bechara EJ. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 316:607-611.
173. Park JW, Floyd RA. Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. *Free Radic Biol Med.* 1992; 12:245-50.
174. Penatti CAA, Bechara EJH, Demasi M. δ -Aminolevulinic acid-induced synaptosomal Ca^{2+} uptake and mitochondrial permeabilization. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 335:53-60.
175. Percy VA, Shanley BC. Porphyrin precursors in blood, urine and cerebrospinal fluid in acute porphyria. *S Afr Med J.* 1977; 52:219-222.
176. Pereira B, Curi R, Kokubun E, Bechara EJH. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J Appl Physiol.* 1992; 72:226-230.
177. Perlroth MG, Tschudy DP, Marver HS, Berard CW, Zeigel RF, Rechcigl M et al. Acute intermittent porphyria. New morphologic and biochemical findings. *Am J Med.* 1966; 41:149-162.
178. Phaneuf D, Labelle Y, Berube D, Arden K, Cavenr W, Gagne R et al. Cloning and expression of the cDNA encoding human fumarylacetoacetate hydrolase, the enzyme

- deficient in hereditary tyrosinemia: assignment of the gene to chromosome 15. *Am J Hum Genet.* 1991; 48:525-535.
179. Pierach CA, Edwards PS. Neurotoxicity of d-aminolevulinic acid and porphobilinogen. *Exp Neurol.* 1978; 62:810-814.
 180. Pietro-Alamo MJ, Laval F. Deficient DNA-ligase activity in the metabolic disease tyrosinemia type I. *Proc Natl Acad Soc US.* 1998; 95:12614-12618.
 181. Poblete-Gutierrez P, Wiederholt T, Merk HF, Frank J. Laboratory tests and therapeutic strategies for the porphyrias. *Hautarzt.* 2006; 57:493-501.
 182. Prauchner CA, Agostini AN, Morimoto A, Augusti PR, Unfer TC, Zeni G et al. Dimethyl sulfoxide and ebselen prevent convulsions induced by 5-aminolevulinic acid. *Neurochem Res.* 2004; 29:1793-1800.
 183. Princ FG, Juknat AA, Amitrano AA, Batlle A. Effect of reactive oxygen species promoted by delta-aminolevulinic acid on porphyrin biosynthesis and glucose uptake in rat cerebellum. *Gen Pharmacol.* 1998; 31:143-148.
 184. Princ FG, Juknat AA, Batlle AM. Porphyrinogenesis in rat cerebellum. Effect of high delta-aminolevulinic acid concentration. *Gen Pharmacol.* 1994; 25:761-766.
 185. Puy H, Deybach JC, Bogdan A, Callebort J, Baumgartner M, Voisin P et al. Increased delta aminolevulinic acid and decreased pineal melatonin production. A common event in acute porphyria studies in the rat. *J Clin Invest.* 1996; 97:104-110.
 186. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. *J Biol Chem.* 1991; 266:4244-4250.
 187. Regulação metabólica de fluxo sanguíneo cerebral. [Internet]. [citado em 15 abr 2009]. Disponível em: <http://www.terravista.pt/bilene/6547/fluxocer.html>
 188. Reynolds ES. Liver parenchymal cell injury. 3. The nature of calcium-associated electron-opaque masses in rat liver mitochondria following poisoning with carbon tetrachloride. *J Cell Biol.* 1965; 25:53-75.
 189. Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K et al. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem.* 1989; 52: 515-20.
 190. Rocha MEM. Estudos *in vivo* e *in vitro* da indução da liberação de ferro de ferritina pela ácido 5-aminolevulínico [Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Química; 1998.

191. Rocha MEM, Bandy B, Costa CA, Barros MP, Pinto AMP, Bechara EJH. Iron mobilization by succinylacetone methyl ester in rats. A model study for hereditary tyrosinemia and porphyrias characterized by 5-aminolevulinic acid overload. *Free Rad Res.* 2000a; 32:343-353.
192. Rocha MEM, Dutra F, Bandy B, Baldini RL, Gomes SL, Faljoni-Alario A et al. Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 409:349-356.
193. Rocha MEM, Ferreira AMDC, Bechara EJH. Roles of phosphate and an enoyl radical in ferritin iron mobilization by 5-aminolevulinic acid. *Free Radic Biol Med.* 2000b; 29:1272-1279.
194. Rodgers PA, Stevenson DK. Developmental biology of heme oxygenase. *Clin Perinatol.* 1990; 17:275-291.
195. Roth KS, Medow MS, Moses LC, Spencer PD, Schawars SM. Renal Fanconi syndrome: developmental basis for a new animal model with relevance to human disease. *Biochem Biophys Acta.* 1989; 987:38-46.
196. Royer LO, Knudsen FS, de Oliveira MA, Tavares MF, Bechara EJ. Succinylacetone oxidation by oxygen/peroxynitrite: a possible source of reactive intermediates in hereditary tyrosinemia type I. *Chem Res Toxicol.* 2004; 17:598-604.
197. Sassa S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme.* 1982; 28:133-145.
Rud E, Gederaas O, Hogset A, Berg K. 5-aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters. *Photochem Photobiol.* 2000; 71:640-647.
198. Sakai T, Morita Y. delta-Aminolevulinic acid in plasma or whole blood as a sensitive indicator of lead effects, and its relation to the other heme-related parameters. *Int Arch Occup Environ Health* 1996; 68:126-132.
199. Sartori A, Garay-Malpartida HM, Forni MF, Schumacher RI, Dutra F, Sogayar MC, Bechara EJ. Aminoacetone, a putative endogenous source of methylglyoxal, causes oxidative stress and death to insulin-producing RINm5f cells. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21:1841-50.
200. Sassa S. Diagnosis and therapy of acute intermittent porphyria. *Blood Reviews.* 1996; 10:53-58.
201. Sassa S. ALAD Porphyria. *Semin Liver Dis.* 1998; 18: 95-101.

202. Sassa S. Modern diagnosis and management of the porphyrias. *Br J Haematol.* 2006; 135:281-292.
203. Sassa S. The hematologic aspects of porphyria. McGraw-Hill; 2006b. 803–822p *apud*
204. Sassa S. Modern diagnosis and management of the porphyrias. *Br J Haematol.* 2006; 135:281-292.
205. Sassa S. Porphyrias. *Clinical Hematology.* Mosby Elsevier; 2006c. 706–720p.
206. Sassa S, Fujita H, Kappas A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: Highlights of Modern Biochemistry. Utrecht; 1989. 329–338p. *apud* Folmer V, Soares JC, Rocha JB. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34:1279-1285.
207. Sassa S, Fujita H, Kappas A. Succinylacetone and aminolevulinic acid dehydratase in hereditary tyrosinemia: immunochemical study of the enzyme. *Pediatrics.* 1990; 86:84-86.
208. Sassa S, Kappas A. Hereditary tyrosinemia and the heme bio-synthetic pathway. *J Clin Invest.* 1983; 71: 625–634.
209. Sassa S, Kappas, A. Molecular aspects of the inherited porphyrias. *J Intern Med.* 2000; 247:169-178.
210. Schierbeek H, Beukeveld GJJ, Van Fassen H, Van Spronsen FJ, Bijsterveld H, Venekamp-Hoolsema EEA et al. Hereditary tyrosinemia type I: a long-term study of the relationship between the urinary excretions of succinylacetone and δ -aminolevulinic acid. *J Inher Metab Dis.* 1993;16:1034-1040.
211. Schroeter M, Saleh A, Wiedermann D, Hoehn M, Jander S. Histological detection of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) contrast medium uptake in experimental brain ischemia. *Magnetic resonance in Medicine.* 2004; 52:403-406.
212. Selman WR, Lust WD, Pundik S, Zhou Y, Ratcheson RA. Compromised metabolic recovery following spontaneous spreading depression in the penumbra. *Brain Res.* 2004; 999:167-174.
213. Shanley BC, Neathling AC, Percy VA, Carstens M. Neurochemical aspects of porphyria: studies on the possible neurotoxicity of d-aminolevulinic acid. *S Afr J Lab Clin Med.* 1975; 49:576–580.

214. Siegert SW, Holt RJ. Physicochemical properties, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of intravenous hematin: a literature review. *Adv Ther.* 2008; 25(9):842-57.
215. Sinclair P, Granick S. Two methods for determining the activity of delta-aminolevulinate synthetase within intact liver cells in culture. *Anal Biochem.* 1977; 79:380-393.
216. Skulachev VP. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* 1998; 423:275-280.
217. Smith NC, Dunnett M, Mills PC. Simultaneous quantitation of oxidized and reduced glutathione in equine biological fluids by reversed-phase high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1995; 673:35-41.
218. Soares AA. Desempenho da taxa de filtração glomerular estimada pelas fórmulas do estudo MDRD e equação quadrática Mayo em adultos saudáveis [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Ciências Médicas; 2008.
219. Soares CO, Bechara EHJ. 1,4-Diamino 2-butanone, a *Trypanosoma cruzi* cytotoxic agent, yields oxygen radicals by metal catalyzed oxidation. Apresentado no Free Radicals and Antioxidants, 27 a 30 september de 2009; Chile. Abstract (Free Radicals and Antioxidants. 2009; 133p.).
220. Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev.* 2001; 81:1065-1096.
221. Somjen GG, Aitken PG. The ionic and metabolic responses associated with neuronal depression of Leao's type in cerebral cortex and in hippocampal formation. *An Acad Bras Cienc.* 1984; 56:495-504.
222. Springett R, Newman J, Cope M, Delpy DT. Oxygen dependency and precision of cytochrome oxidase signal from full spectral NIRS of the piglet brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 279:H2202-2209.
223. Springett R, Wylezinska M, Cady EB, Cope M, Delpy DT. Oxygen dependency of cerebral oxidative phosphorylation in newborn piglets. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000; 20:280-289.
224. Stadler M, Nuyens V, Seidel L, Albert A, Boogaerts JG. Effect of nutritional status on oxidative stress in an ex vivo perfused rat liver. *Anesthesiology.* 2005; 103:978-986.

226. Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med.* 1991; 9:315-325. Erratum in: *Free Radic Biol Med.* 1991; 10:249.
227. Stein JA, Tschudy DP. Acute intermittent porphyria. A clinical and biochemical study of 46 patients. *Medicine* 49. 1970; 1-16.
228. St-Louis M, Tanguay RM. Mutations in the fumarylacetoacetate hydrolase gene causing hereditary tyrosinemia type I. Overview. *Hum Mutat.* 1997; 9:291-299.
229. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18:321-336.
230. Sun M, Hattori S, Kubo S, Awata H, Matsuda I, Endo F. A mouse model of renal tubular injury of tyrosinemia type 1: development of de Toni Fanconi Syndrome and apoptosis of renal tubular cells in Fah/Hpd double mutant mice. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11:291-300.
231. Svanberg K, Liu DL, Wang I, Andersson-Engels S, Stenram U, Svanberg S. Photodynamic therapy using intravenous delta-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX sensitisation in experimental hepatic tumours in rats. *Br J Cancer* 1996; 74:1526-33.
232. Tanigawa K, Kim YM, Lancaster Jr, JR Zar HA. Fasting augments lipid peroxidation during reperfusion after ischemia in the perfused rat liver. *Crit Care Med.* 1993; 27:401-406.
233. Teixeira PC, Onuki J, Medeiros MH, Dornemann D, Di Mascio P. DNA damage by 3,6-dihydropyrazine-2,5-dipropanoic acid, the cyclic dimerization product of 5-aminolevulinic acid. *Biol Chem.* 2001; 382:913-918.
234. Thornalley PJ. Monosaccharide autoxidation in health and disease. *Environ Health Perspect.* 1985; 64:297-307.
235. Thunell S, Andersson C, Carlmark B, Floderus Y, Gronqvist SO, Harper P et al. Markers for vulnerability in acute porphyria. A hypothesis paper. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1995; 33:179-194.
236. Thunell S, Floderus Y, Henrichson A, Moore MR, Meissner P, Sinclair J. Alcoholic beverages in acute porphyria. *J Stud Alcohol.* 1992; 53:272-276.

237. Thunell S. Porphyrins: porphyrin metabolism and porphyrias I. Update Scand J Clin Lab Invest. 2000; 60:509-540.
238. Thunnissen PL, Meyer J, de Koning RW. Acute intermittent porphyria and primary liver-cell carcinoma. J. Med. 1991; 38:171-174.
239. Timmins GS, Liu KJ, Bechara EJH, Kotake Y, Swartz HM. Trapping of free radicals with direct in vivo EPR detection: a comparison of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide and 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide as spin traps for HO[•] and SO₄^{•-}. Free Radic Biol Med. 1999; 27:329-333.
240. Tomás-Zápico C, Coto-Montes A, Martínez-Fraga J, Rodríguez-Colunga MJ, Hardeland R, Tolivia D. Effects of δ -aminolevulinic acid and melatonin in the harderian gland of female syrian hamsters. Free Radic Biol Med. 2002; 32:1197-1204.
241. Tschudy DP, Hess RA, Frykholm BC. Inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydrase by 4,6-dioxoheptanoic acid. J Biol Chem. 1981; 256:9915-9923.
242. Tuchman M, Freese DK, Sharp HL, Romnaraine MLR, Ascher N, Bloomer JR. Contribution of extrahepatic tissues to biochemical abnormalities in hereditary tyrosinemia tipe 1: study of three patients after liver transplantation. J Pediatr. 1987; 110:399-403.
243. van der Veen N, Hebeda KM, de Bruijn HS, Star WM. Photodynamic effectiveness and vasoconstriction in hairless mouse skin after topical 5-aminolevulinic acid and single- or two-fold illumination. Photochem Photobiol. 1999; 70:921-9.
244. Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M et al. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of nutritional status. Hepatology. 2001; 33:808-815.
245. Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. Biosci Rep. 1997; 17:43-52.
246. Verdon CP, Pollock TA, Alexander Bralley J. Testing for Toxic Metal- and Chemical-Induced Porphyrinuria. 2004 [acesso em: 21 mar 2006]. Disponível em: <http://www.metametrix.com/Publications/Toxic%20Metals/>.
247. Voegel AI. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry. 5 ed. New York: Longman; 1989. 430-433p.

248. Waldenstrom J. The porphyrias as inborn errors of metabolism. *American Journal of Medicine*. 1957; 22:758–773.
249. Wang I, Andersson-Engels S, Nilsson GE, Wardell K, Svanberg K. Superficial blood flow following photodynamic therapy of malignant non-melanoma skin tumours measured by laser Doppler perfusion imaging. *Br J Dermatol*. 1997; 136:184–9.
250. Weinberg AG, Mize CE, Worthen HG. The occurrence of hepatoma in the chronic form of hereditary tyrosinemia. *J. Pediatr*. 1976; 88:434–438.
251. Weiss TS, Pahernik S, Scheruebl I, Jauch KW, Thasler WE. Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid. *J Hepatol*. 2003; 38:476-482.
252. Welch KD, Davis TZ, Van Eden ME, Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med*. 2002; 32:577-583.
253. Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1981; 77:325-333.
254. Wilson AR, Johnson FK, Johnson RA. Heme and 5-aminolevulinic acid increase carboxyhemoglobin levels in the anesthetized rat. *FASEB J.*, 2002; 16: A851.
255. Wyss PA, Boynton S, Chu J, Roth KS. Tissue distribution of succinylacetone in the rat in vivo: a possible basis for neurotoxicity in hereditary infantile tyrosinemia. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1182:323-328.
256. Yeung Laiwah AC, Moore MR, Goldberg A. Pathogenesis of acute porphyria. *Q J Med N Ser*. 1987; 63:377–392.
257. Zheng J, Shan Y, Lambrecht RW, Donohue SE, Bonkovsky HL. Differential regulation of human ALAS1 mRNA and protein levels by heme and cobalt protoporphyrin. *Mol Cell Biochem*. 2008.
258. Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1241:139-176.

ANEXO 1

Redox imbalance triggered by succinylacetone in rats: an experimental model for hepatic porphyrias

Running title: Redox imbalance induced by succinylacetone

Vanessa E. S. Cardoso^a; Fernando Dutra^b; Atecla N. L. Alves^c; Estela Bevilacqua^d; & Etelvino J. H. Bechara^{a,e*}

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil, tel 55-11-30913869, fax 55-11-30912186, vecard@uol.com.br and ebechara@iq.usp.br

^bCentro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Cruzeiro do Sul, 03342-000 São Paulo, SP, Brazil, telefax 55-11-66726200, fernando.dutra@unicsul.br

^cLaboratório Central do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 03183-000 São Paulo, SP, Brazil, tel 55-11- 30696109, atecla@terra.com.br

^dDepartamento de Biologia Celular e Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil, tel 55-11-30917307, fax 55-11-30917402, bevilacq@usp.br

^eDepartamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Estado de São Paulo, 09972-270 Diadema, SP, Brazil, telfax 55-11-40493300, ebechara@unifesp.br

*Correspondence address: Etelvino JH Bechara, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil, tel 55-11-30913869, fax 55-11-30912186, ebechara@iq.usp.br

Abstract

To establish an experimental model for studying redox imbalance in hepatic porphyrias, rats were treated with methyl ester of succinylacetone (SAME), a tyrosine catabolite that strongly inhibits 5-aminolevulinic acid (ALA) dehydratase (ALA-D), resulting ALA accumulation. ALA levels in plasma, liver and urine and clearance of renal ALA increased in treated groups. ALA-D activities were inhibited concomitantly, decreasing urinary coproporphyrin. Liver proteins carbonyl, iron and ferritin were higher in treated groups, especially with a dose of 10 mg SAME/kg. Malondialdehyde was higher in the group treated with 40 mg SAME/kg. Consistent with these data indicating SAME-induced oxidative imbalance, ultrastructural and histological studies revealed hepatic cytosolic and mitochondrial changes. Altogether, these data validate our model for studying biochemical and possibly physiological effects induced by excess ALA. This protocol prevents undesirable outcomes resulting from photochemical damage of tissue by singlet oxygen and radicals generated by porphyrins overproduced in an ALA-based model of porphyria.

Keywords: 5-aminolevulinic acid, succinylacetone, intermittent acute porphyria, hereditary tyrosinemia type 1, redox imbalance, oxidative mitochondrial damage.

Introduction

The biochemical and clinical fluctuations in the chronic course of acute intermittent porphyria (AIP) [1,2], hereditary tyrosinemia type 1, HT1 (a recessive autosomal disorder) [3-4], and lead poisoning [5-7] have been associated with the accumulation of 5-aminolevulinic acid (ALA), the first heme precursor, in the plasma and urine during attacks, reaching its highest concentrations in blood and cerebrospinal fluid [4, 5, 8, 9]. Longstanding experiments with [^{14}C]ALA i.p. administered to rats mapped its distribution among and uptake by several organs ($\times 10^3$ in liver, 3×10^2 in heart, and $\times 10$ in brain 3 h after injection), showing that it gradually decays to normal levels within 2-3 days [10].

In vitro, ALA has been shown to undergo phosphate-catalyzed enolization in physiological pH, followed by metal-catalyzed oxidation by molecular oxygen to 4,5-dioxovaleric acid (DOVA), ammonium ion, and hydrogen peroxide during a chain reaction propagated by the superoxide anion radical [11]. In the case of ALA overload, experimentally imposed in rats and mice, its pro-oxidant activity was attested by chemical injury of proteins, DNA, and lipid membranes and of supramolecular structures such as mitochondria and synaptosomes. In this regard, it is tempting to connect the mitochondrial and DNA oxidation and GABA receptor lesion found in liver and brain areas of ALA-treated rats to the long-known high incidence of primary liver cancer [12-15] and neuropsychiatric [14, 16, 17] changes in AIP and HT1 patients who have suffered several attacks. Accordingly, the recent literature abounds with reports about an association of redox imbalance caused by accumulated metabolites and xenobiotics with impaired cell functions and an array of many other human disorders [18-20].

Succinylacetone (SA) is a tyrosine catabolite that accumulates in HT1 carriers as a result of fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) deficiency [4,21]. This is accompanied by accumulation of ALA due to strong inhibition of ALA-dehydratase (ALA-D) by SA ($K_i = 30$ nM) [22]. In fact, the treatment of experimental animals with SA leads to ALA-D inhibition, especially in kidneys and brain, organs that seem to preferentially trap and retain SA from extracellular fluids [23]. Not surprisingly, and presumably as a result of ALA accumulation, HT1 patients are known to develop a syndrome typical of AIP, which includes renal dysfunction, liver cirrhosis and cancer, and neuropsychiatric manifestations that include hallucinations during acute attacks [21]. Preliminary experiments with SA-treated rats confirmed hyperoxidative status that was suggested by outmatched putative chemical and enzymatic biomarkers of redox imbalance [11,24].

In an attempt to circumvent pitfalls caused by porphyrin-linked photodynamic action in the ALA-based experimental model, which was designed to study hepatic damage in AIP and HT1 porphyria, we revisited here the replacement of ALA by SA methyl ester (SAME), aiming to induce ALA accumulation indirectly via ALA-D inhibition without increasing the concentration of porphyrins. SAME diffuses faster than its counterpart, anionic SA, throughout membranes [24], making SAME more suitable for inducing porphyric-like states in experimental animals. In the present study, we characterized the inhibition of ALA-D by SAME, unveiled the resulting redox imbalance by putative chemical markers, and described ultrastructural cellular changes based on histological analyses.

Materials and Methods

SAME was prepared by methylation of calculated amounts of SA dissolved in ethyl ether with Diazald[®], as described by Rocha et al. (2000) [24].

Animal care and treatments

All the experiments were approved by the local Ethics and Animal Care Committee, which follows the American NIH guidelines for animal care and use. Male Wistar rats (250-300g), bred and lodged at the bioterium of the University of São Paulo Institute of Chemistry, were housed in metabolic cages under controlled temperature (22°C), humidity and light (12h light-dark cycles). The animals were fasted for 44 h during i.p. treatment with three doses of SAME or saline at 6, 24 and 42 h, and were sacrificed 2 h after the last injection. The treatment was conducted under fasting condition because previous studies showed that fed animals did not respond to SA treatment [24, 25]. Additionally, fasting is described as an important variable involved in the precipitation of acute porphyria attacks [1, 26-28]. Water was provided *ad libitum*. The animals were divided randomly into 4 groups. The control group (I) was treated with saline (0.67mL/body weight, pH 7.2), while groups II to IV were treated, respectively, with 10, 40 and 80 mg SAME/kg body weight, pH 7.2. Blood and liver samples were collected and stored at -80°C until analysis. Urine was collected for 6 h prior to the first SAME injection and during the 18-h intervals between injections.

Metabolite analyses

Isocratic liquid determinations of the ALA derivative with acetylacetone and formaldehyde were performed using an HPLC system with fluorescent detection, as described by Murata et al. (2003) [29]. Derivatization of the samples was done by mixing 100 µL of deproteinized sample plus 25 µL of water (or 125 µL of calibration

solution), 125 μ L of 200 mM sodium acetate buffer (pH 7.2), 625 μ L of acetylacetone (acetylacetone:ethanol:water in the proportions of 15:10:55 v/v/v), and 125 μ L of 8.5% formaldehyde (w/v). The analysis was conducted as described by Murata et al. (2003) [29]. The HPLC system consisted of a 515 HPLC Pump coupled to a Waters 464 pulsed fluorescent detector (Waters Corp.). All the analyses were performed at 40°C, using 15 cm x 4.6 mm (i.d.), 5.0 μ m C₁₈ Phenosphere reversed-phase columns (Waters Associates).

Liver ALA-D activities were determined spectrophotometrically with Ehrich's reagent, which forms a complex absorbing at 553 nm in the presence of porphobilinogen synthesized by the enzyme [30].

Solvent-gradient estimation of urinary coproporphyrin was performed on an HPLC system with fluorescent detection, as described by Alves et al. (2007) [31].

As a marker of lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA) was measured in liver samples by HPLC, according to Estebauer et al. (1984) [32].

Analyses for liver GSH/(GSH+GSSG) rates were performed by HPLC, as described by Smith et al. (1995) [33]. The samples (20 μ L) were introduced into the chromatograph with an automatic injector and eluted with the mobile phase, which circulated at 1.2 mL/min for 5.5 min, with retention time ranging from 3.4 to 3.8 min and from 4.5 to 4.7 min for GSH and GSSG, respectively. The HPLC system consisted of an LC-10AD Pump coupled to an ESA Coulochem III electrochemical detector (Shimadzu Corp.). The detector's working electrode was operated at +0.7 V for E1, 0.8 V for E2, and 0.98 V for the Guard Cell, and its signal was delivered to a digital computer. The current was 5 μ A.

Liver protein carbonyl levels were determined by the tritiated borohydrate method described by Levine et al. (1990) [34] and modified by Rocha et al. (2000) [24]. The radioactive solution containing 490 μL of 25 mCi NaB^3H_4 25 and 800 μL of 1.0 M NaBH_4 was prepared in 0.10 M NaOH . The assay was performed using homogenate at 4-5 mg protein/mL.

Total nonheme iron was assayed spectrophotometrically with 2,2'-bipyridine, as described by Bralet et al. (1992) [35]. Fresh tissue samples (50 mg) were homogenized in 2 mL of 0.10 M HCl containing pepsin (10 mg/mL), ascorbic acid (20 mg/mL), 5 mM 2,2'-bipyridine (final pH 2.5) and incubated at 37°C for 24h. After incubation, the samples were centrifuged at maximum rotation in an eppendorf microcentrifuge and the absorbance read at 520 nm in the supernatant. Iron concentration was calculated using a calibration curve prepared with $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.05-5 $\mu\text{g Fe}^{\text{II}}$ /mL).

Superoxide dismutase was assayed employing a nonenzymatic superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) generator. SOD microassay was based on spectrophotometric assessment of $\text{O}_2^{\cdot-}$ -mediated nitro blue tetrazolium reduction by an aerobic mixture of NADH and phenazine methosulfate, which produces superoxide chemically at nonacidic pH [36]. The assay was conducted in an automated 96-well microplate reader at 560 nm.

Glutathione peroxidase was assayed spectrophotometrically as described by Wendel (1981) [37]. Glutathione peroxidase microassay was based on spectrophotometric assessment of GSSG-mediated NADPH oxidation in the presence of GSSG reductase. The activity of glutathione peroxidase is attached to the stoichiometric consumption of NADPH. The assay was conducted in an automated 96-well microplate reader at 340 nm.

The protein concentration in liver samples was analyzed as described by Bradford (1976) [38], using bovine serum albumin as the standard.

Liver fragments were fixed in 3.7% buffered formalin or methacarn and processed for paraffin embedding for histochemical and immunohistochemical analyses. After deparaffinization and hydration, 5 μ m paraffin sections were mounted on poly-L-lysine-coated glass slides and incubated for 20 min in 1% hydrogen peroxide (H_2O_2) in 0.1 M PBS to quench endogenous peroxidase activity.

Iron II/III histochemical detection

The sections were incubated for 15 h at room temperature in 7% potassium ferrocyanide in 3% aqueous hydrochloric acid and subsequently in 0.015% H_2O_2 in 0.75 mg/mL 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) for 5 min.

Immunohistochemical analysis

Ferritin, the intracellular iron storage protein, was localized at the liver samples by means of routine immunohistochemical reactions. In brief, the liver sections were incubated at 37°C for 1 h with chicken polyclonal anti-human ferritin antibody (Geneway) diluted 1:200. Primary antibody was detected using rabbit polyclonal antibody against chicken IgY (Geneway, diluted 1:200) complexed to peroxidase. DAB was used as a chromogen. The sections were counterstained with either Mayer hematoxylin or methyl green solution (0.5% in 0.1M sodium acetate buffer), dried and embedded in glycerol.

As markers of oxidative stress, protein carbonyls (DNP) were also immunolocalized in the liver samples, as described by Astruc et al. (2007) [39] with modifications. As a derivative of carbonyl groups, we used 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), while the DNP-conjugate forms were detected using an anti-DNP antibody.

After hydration and quenching of the endogenous peroxidase, the sections were incubated at room temperature for 16 h in 0.02% DNPH in 20 mM phosphate-buffered saline pH 5.9. The sections were then incubated in PBS containing 10% goat serum (10min), in polyclonal rabbit anti-DNP primary antibody (Sigma Chemical Co., St Louis) diluted 1:100 in PBS, and in goat anti-rabbit peroxidase-conjugated secondary antibody (Upstate Cell Signaling, 7074, UK) (diluted 1:100 in PBS, 1 h at 25°C). Finally, the peroxidase was developed for 5 min at room temperature in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing 0.025% DAB and 0.003% H₂O₂. After drying, the slides were counterstained with either Mayer hematoxylin or methyl green solution (0.5% in 0.1M sodium acetate buffer, coated with glycerol and coverslipped.

For the histological analyses, specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4) with 0.50 M of sucrose, post-fixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 1 h, at 4°C, and embedded in SPURR resin (Spurr Embedding Kit, Lad Research Industries, Vermont). Ultrathin 60 nm-sections were stained with 2% uranyl acetate and 0.5% lead citrate, both in PBS, and observed under a JEOL-100 CX transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan).

Statistical Analysis

Data were analyzed based on statistically significant differences by one-way ANOVA; Tukey-Kramer and Kruskal-Wallis *pos hoc* tests were performed ($p < 0.05$).

Results

Measurement of heme precursors and ALA-D activity

To validate the SAME-based model for AIP and HT1, levels of ALA and coproporphyrin, as well as of ALA-D activity in response to the dose of SAME administered to the animals, were assessed. As expected, the levels of ALA significantly increased in the plasma (x 7-9), liver (x 6-24), and urine (x 12-13) of all SAME-treated groups as compared to the control (Group I) (Table I). A general trend can be observed, albeit not strictly SAME concentration-dependent, for higher ALA levels at higher doses of the ALA-D inhibitor. ALA levels measured in the urine samples collected between the 2nd and 3rd i.p. injection (from hour 24 to 42nd of the treatment protocol) were significantly elevated in SAME-treated groups when compared to the control ($p < 0.001$) and in group IV relative to group II ($p < 0.05$). Not surprisingly, both urinary coproporphyrin concentrations (Table II) and ALA-D activities in liver samples (Table III) were found to be significantly depressed in SAME-treated animals. A significant increase in the clearance of ALA was found for group II relative to control ($p < 0.05$) and group III ($p < 0.001$), and in group IV when compared to group III ($p < 0.01$) (Table III).

Measurement of oxidative stress indices

The level of protein carbonyl in rat tissues was widely distributed within each SAME-treated group; a significantly augmented (2-fold) concentration of oxidized protein was found only in group II ($p < 0.001$) (Table IV). MDA produced by lipid peroxidation was significantly higher only in the liver of group III when compared with the control ($p < 0.001$). In contrast, the GSH/GSH+GSSG (reduced glutathione/total glutathione) ratio, considered by most authors as a reliable parameter to evaluate the cell redox balance [40], showed no differences in the liver of treated animals.

The level of total non-heme iron in rat liver increased by ~50% upon 40 mg SAME/kg body weight when compared to control and group II (Table IV).

No differences were observed in liver SOD activity (Table IV). On the other hand, increases in GPx activity were observed for group AIII when compared to control (Table IV).

Histochemical and immunohistochemical assays

Histological analyses of the liver confirmed the presence of iron through potassium ferrocyanide reaction intensified by osmium tetroxide in the rats subjected to the SAME treatment and in those of the control group. The iron content, identified by dark deposits, was notably higher in group II than in the control and other experimental groups (Figure 1 A, E, I). In all the groups, the distribution was more intense in the periphery of the classical hepatic lobule, surrounding the periportal area.

DNP was evenly localized throughout the liver parenchyma in all the groups, although the immunoreaction was more intense in group II (Figure 1 C, G, K).

As observed for in the iron detection analysis, the staining pattern of ferritin immunolocalization was weakly and uniformly distributed in the liver parenchyma in control, groups III and IV, and particularly intense in group II (Figure 1 B, F, J).

Ultrastructural analysis

As expected, the ultrastructural analysis showed preservation of the liver architecture and distinctive features characteristic of hepatocytes in all the specimens. In the control group (Figure 2A), hepatocytes contained up to two nuclei and were rich in both smooth and rough endoplasmic reticulum, elongated

mitochondria, lysosomes, peroxisomes with crystalline nucleoid, cytosolic glycogen deposits, lipid droplets and a well-developed Golgi apparatus; adjacent hepatocytes lined the bile canaliculi, and sinusoids, Kupffer and Ito cells (with lipid droplets) shared the connective tissue in the Space of Disse. After SAME treatment, the most remarkable findings under electron microscopic examination were the changes in the mitochondrial compartment. In groups II and IV (10 and 80 mg/kg-SAME-treated group, Figures 2B-D and 2I-J, respectively), the hepatic ultrastructure showed characteristics similar to those of the control group, except for part of the mitochondria, which were unusually small, oval or quasi-oval in shape, with increased mitochondrial matrix electron-density (Figure 2C and 2J). After the 40 mg/kg-SAME treatment (group III, Figure 2 E-H), hepatocytic mitochondria exhibiting higher mitochondrial matrix electron-density, suggestive of electron-dense inclusions, predominated over morphologically normal mitochondria. Mitochondria with electron lucent matrix but with atypical loss of cristae were also observed (Figure 2G). Mainly the specimens of groups II and III also displayed occasional discrete augmentation of lipid inclusions (Figure 2F) and heterophagosome-like organelles (Figure 2D), myelin figures and atypical dilatations and vacuolization in the endoplasmic reticulum cisternae (Figure 2G). No significant alterations were found in the nuclear structure of the experimental groups. All the specimens showed euchromatic nuclei with a prominent nucleolus.

Discussion

The aim of this work is to establish a reliable experimental model to study the reported redox imbalance and tissue damage driven by ALA in hepatic porphyrias where ALA accumulates, such as AIP, HT1, and possibly also in lead poisoning. In

this study, rats were treated with several doses of SAME, whose acid form is known to strongly inhibit ALA-D, leading to ALA overload. We ourselves have used experimental porphyria based on direct administration of ALA in the past [11]. However, an ALA-based experimental model of porphyria cannot exclude oxidative injury to tissues attributable to singlet oxygen and radicals photosensitized by overproduced porphyrins.

We show here that administration of SAME to rats at 18 h intervals results in high amounts of ALA in plasma, liver and urine when compared with untreated animals (Table I). Another consequence of ALA-D inhibition by SAME-generated succinylacetone catalyzed by esterases, confirmed by the data given in Table II, is the downstream depression of coproporphyrinogen excreted by the rats in urine (Table IV). The fact that the values of the renal clearance of ALA by treated animals was similar to that of the control group (Table IV) indicates that the increased levels of plasma ALA did not suffice to alter an effective renal function [41]. Blood accumulation and urinary excretion of ALA at concentrations above the normal levels have long been reported in symptomatic AIP carriers [41-43] and have been associated with neurological manifestations and hepatoma occurrence in AIP patients.

Altogether, these data suggest that maximal effects of SA in rats can be reached at a limit dose ranging from 10 and 40 mg/kg body weight. It is possible that excessive accumulation of ALA attained at SA higher than 10-40 mg/body weight may underscore by competition of ALA-D and thereby mask the inhibitory effects of SA over ALA-D and minimize redox imbalance to the tissues [44-45]. Data from

histochemical and immunohistochemical assays offer additional support for this explanation, since the 10 mg SAME-treated group was the most affected (Figure 1).

The apparent lack of increasing concentration dependence of ALA, ALA-D, and protein carbonyl on the SAME dose encounters a parallel in the previously reported study of spontaneous chemiluminescence of exposed rat organs after ALA treatment [46]. The chemiluminescence intensity of ALA-treated liver, soleus and brain, which was attributed to augmented ALA-induced lipid peroxidation, was maximal with one or two doses of ALA, but substantially decreased in response to a third dose. This observation may be very important from the standpoint of physiological adaptation to chronic oxidative injury.

It is tempting to interpret the higher renal clearance of ALA observed in groups II and IV when compared with group III to a faster removal of this metabolite from the body, preventing its accumulation and oxidative consequences in this organ.

The dose-effect response found for urinary ALA excretion reinforces this hypothesis (Table I). In cells, only low quantities of ALA coexist with the heme precursors in the normal flow of heme biosynthesis, and any excess ALA produced by endogenous or exogenous factors is exported [47]. A cellular mechanism to avoid intracellular accumulation of ALA, possibly a detoxification mechanism against the pro-oxidant properties of ALA, must operate. According to Demasi et al. (1997) [46], in the longer term (chronic oxidative injury), liver, brain and soleus tissues are able to partially suppress the oxidative damage promoted by ALA in response to an adaptive physiological stimulus.

Table IV describes that we were unable to confirm a significant increase in GSH content and SOD activity in the current study with SAME. As for the GHS data, this

can perhaps be explained by the well-known high protective concentration of GSH in liver, where it is synthesized, stored and released in prevalence over other organs [48-50]. Regarding SOD data, this is in concordance with previous study using acute SAME treatment [24]. However, significant increases in SOD liver was described under prolonged ALA treatment [51].

Additionally, despite the current results substantiate an acute effect of SAME-induced ALA accumulation on protein carbonyls, MDA and total non-heme iron levels, a dose-effect increase in these biomarkers of oxidative imbalance was not confirmed. These data suggests that under a short-term SAME treatment, early stages of acute oxidative injury may mimics an chronic oxidative injury and trigger (switch on) the mechanism involved in the suppression of oxidative damage promoted by ALA (an adaptive stimulus).

The increase for the total non-heme iron levels found for group II provides support for the molecular link between the adminisitation of SAME, ALA accumulation, iron deposition and oxidative imbalance. SAME administration strongly inhibits ALA-D, resulting in ALA accumulation, and oxidation of ALA is known to be catalyzed by complexes of iron, generating reactive species [52, 53]. Iron release from ferritin can also be induced by ALA [54], providing iron to fuels the free pool. SA also inhibits heme synthesis, leading to nonheme iron accumulation in mitochondria and cytosol of normal reticulocytes [55]. Increases in iron uptake by increasing the number of surface transferrin receptors and the rate of receptor recycling are also observed under SAME treatment [56, 57].

In the present study, treatment of rats with SAME resulted in a statistically significant dose-effect increase of protein carbonyls in group II compared with the

control (Table IV). This finding was also confirmed by immunohistochemistry (Figure 1 C, G, K). A dose-dependent decrease of protein carbonyl was observed in groups III and IV. This reinforces not only the finding that maximal pro-oxidant effects of SA in rats can be triggered by a limit dose in the range of 10-40 mg/body weight, but also that the oxidative damage can be partially suppressed in subsequent hours in response to an adaptive stimulus [46]. Significantly higher lipid peroxidation was observed in the liver only upon treatment with 40 mg SAME/kg body weight (Table III).

The hepatic ultrastructural changes found in SAME-treated rats occurred primarily in the mitochondrial compartment. Hepatocyte mitochondrial abnormalities after 10 and 40 mg SAME/kg body weight treatment included bizarre shapes, extreme condensation of matrix, electron dense inclusions, swelling and atypical loss of cristae, also associated with hepatocyte dysfunction and damage in several other conditions such as human porphyria, experimental porphyria and in the use of porphyrogenic agents [58-61]. Among these alterations, however, mitochondrial inclusions and increase of matrix electron density, indicative of mitochondrial damage, prevailed over others. Similar damage has been reported in several hepatic diseases, including human acute intermittent porphyria [62], although not in all cases [63], as well as in rat hepatocytes intoxicated with carbon tetrachloride. Abnormal mitochondrial shapes and increased number of mitochondrial ghosts are also common morphological alterations related with human porphyria, also found in hepatocyte cultures exposed to porphyrogenic agents [58-61]. The morphological effects of SAME in the mitochondria may be caused by the oxidative imbalance correlated here with hepatic lipid peroxidation and ALA accumulation. Very likely,

however, this imbalance did not surpass the antioxidant capacity of hepatocytes, since nuclear apoptotic characteristics have not been found. In this context, cellular adaptation in response to the ALA pro-oxidative effect seems to provide protection against ROS generation and apoptosis induction in liver tissues.

A study conducted by Biempica et al. (1974) [63] with human porphyric subjects described: *i*) mitochondrial changes and an increased number of autophagic vacuoles containing mitochondria, which were related to a faster turnover of mitochondria, *ii*) increase in the granules of lipofuscin containing dense material and myelin figures, *iii*) accumulation of lipid droplets in the hepatocyte cytoplasm as a secondary effect of a deficient mitochondrial oxidation of fatty acids, and *iv*) iron-positive granules related with mitochondrial damage. The latter result was also obtained with chronically ALA-treated animals. In the present study, *i*) the morphology and number of autophagic vacuoles in experimental specimens were similar, *ii*) myelin figures were similar in control and experimental specimens, *iii*) lipid droplets seemed to be discretely augmented, and *iv*) no iron-positive granules related with mitochondrial damage were found. These differences in ultrastructural findings could be a consequence of the acute model of porphyria used in the present study, since a longer time may be needed for the body's system to translate the drug effects in tissual damage.

In summary, the SAME-based model described here to study redox imbalance triggered in rats overproducing ALA is largely consistent with a porphyric condition. This model allowed for the observation of a significant increase of ALA in plasma, liver and urine ALA, as well as elevation of urinary coproporphyrinogen as a consequence of ALA-D inhibition by SA. Although discrete, the increases observed in

the biomarkers of oxidative imbalance – protein carbonyl, MDA, iron, ferritin and GPx activity – are consistent with the oxidative damage promoted by ALA accumulation. Despite the absence of neurovisceral manifestations, possibly as a consequence of the short term treatment, it resembles HT1 and AIP from the biochemical point of view.

Acknowledgements

We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Instituto do Milênio Redoxoma (Brazil) for their financial support of this work.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- [1] Hindmarsh JT. The porphyrias: recent advances. *Clin Chem* 1986;32:1255-1263.
- [2] Sassa S. Modern diagnosis and management of the porphyrias. *Br J Haematol* 2006;135:281-292.
- [3] Berger R, van Faassen H, Smith GP. Biochemical studies on the enzymatic deficiencies in hereditary tyrosinemia. *Clin Chim Acta* 1983;134:129-141.
- [4] Sassa S, Kappas A. Hereditary tyrosinemia and the heme biosynthetic pathway. *J Clin Invest* 1983;71:625–634.
- [5] Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y. The porphyrias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Stanbury JB, Wibgaarden JB, Fredickson DS, editors. *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 1995. p 2103–2159.
- [6] Sakai T, Morita Y. delta-Aminolevulinic acid in plasma or whole blood as a sensitive indicator of lead effects, and its relation to the other heme-related parameters. *Int Arch Occup Environ Health* 1996;68:126-132.
- [7] Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med* 2000;29:927-945.
- [8] Bylesjo I, Forsgren L, Lithner F, Boman K. Epidemiology and clinical characteristics of seizures in patients with acute intermittent porphyria. *Epilepsia* 1996;37:230–235.
- [9] Emanuelli T, Prauchner CA, Dacanal J, Zeni A, Reis EC, de Mello CF, de Souza DO. Intrastriatal administration of 5-aminolevulinic acid induces convulsions and body asymmetry through glutamatergic mechanisms. *Brain Res* 2000;868:88-94.
- [10] McGillion FB, Thompson GG, Goldberg A. Tissue uptake of δ -aminolaevulinic acid. *Biochem Pharmacol* 1975;24:99-301.
- [11] Bechara EJ, Dutra F, Cardoso VE, Sartori A, Olympio KP, Penatti CA et al. The dual face of endogenous alpha-aminoketones: Pro-oxidizing metabolic weapons. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2007;146:88-110.

- [12] Dehner LP, Snover DC, Sharp HL, Ascher N, Nakhleh R, Day DL. Hereditary tyrosinemia type I (chronic form): pathological findings in the liver. *Human Pathol.* 1989; 20:149-158.
- [13] Gluber JG, Bargatzi MJ, Meyer UA. Primary liver carcinoma in two sisters with acute intermittent porphyria. *Amer J Med.* 1990; 89:540-541.
- [14] Onuki J, Teixeira PC, Medeiros MHG, Dornemann D, Douki T, Cadet J et al. Is 5-aminolevulinic acid involved in the hepatocellular carcinogenesis of acute intermittent porphyria? *Cell Mol Biol.* 2002; 48:17-26.
- [15] Onuki J, Almeida EA, Medeiros MH, Di Mascio P. Inhibition of 5-aminolevulinic acid-induced DNA damage by melatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, quercetin or resveratrol. *J Pineal Res.* 2005; 38:107-115.
- [16] Demasi M, Penatti CAA, DeLucia R, Bechara EJJ. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20:291-299.
- [17] Princ FG, Juknat AA, Amitrano AA, Battle A. Effect of reactive oxygen species promoted by delta-aminolevulinic acid on porphyrin biosynthesis and glucose uptake in rat cerebellum. *Gen Pharmacol.* 1998; 31:143-148.
- [18] Galli F, Piroddi M, Annetti C, Aisa C, Floridi E, Floridi A. Oxidative stress and reactive oxygen species. *Contrib Nephrol* 2005;149:240-260.
- [19] Kang D, Hamasaki N. Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes, and cancer. *Curr Med Chem* 2005;12:429-441.
- [20] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. England: London Oxford University Press; 2007.
- [21] Scott CR. The genetic tyrosinemias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006;142C:121-126.
- [22] Grompe MD. The pathophysiology and treatment of hereditary tyrosinemia type 1. *Semin Liver Dis* 2001;21:563-571.
- [23] Wyss PA, Boynton S, Chu J, Roth KS. Tissue distribution of succinylacetone in the rat in vivo: a possible basis for neurotoxicity in hereditary infantile tyrosinemia. *Biochim Biophys Acta* 1993;1182:323-328.

- [24] Rocha MEM, Bandy B, Costa CA, Barros MP, Pinto AMP, Bechara EJH. Iron mobilization by succinylacetone methyl ester in rats. A model study for hereditary tyrosinemia and porphyrias characterized by 5-aminolevulinic acid overload. *Free Rad Res* 2000;32:343-353.
- [25] Puy H, Deybach JC, Bogdan A, Callebort J, Baumgartner M, Voisin P et al. Increased delta aminolevulinic acid and decreased pineal melatonin production. A common event in acute porphyria studies in the rat. *J Clin Invest*. 1996; 97:104-110.
- [27] Kauppinen R, Mustajoki P. 1988. Acute hepatic porphyria and hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer*, 57: 117–120.
- [28] Yang CC, Kuo HC, You HL, Wang J, Huang CC, Liu CY, Lan MY, Stephenson DA, Lee MJ. HMBS mutations in Chinese patients with acute intermittent porphyria. *Ann Hum Genet*. 2008; 72:683-6.
- [29] Murata K, Sakai T, Morita Y, Iwata T, Dakeishi M. Critical dose of lead affecting delta-aminolevulinic acid levels. *J Occup Health* 2003;45:209-214.
- [30] Sassa S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 1982;28:133-145.
- [31] Alves ANL, Burattini MN, Sumita NM, Rosa HVD. Validação de metodologia para dosagem de porfirinas urinárias por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Bras Cienc Farm* 2007;43:581-588.
- [32] Esterbauer H, Lang J, Zadravec S, Slater TF. Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1984;105:319-328.
- [33] Smith NC, Dunnett M, Mills PC. Simultaneous quantitation of oxidized and reduced glutathione in equine biological fluids by reversed-phase high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995;673:35-41.
- [34] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-478.
- [35] Bralet J, Schreiber L, Bouvier C. Effects of acidosis and anoxia on iron delocalization from brain homogenates. *Biochem Pharmacol* 1992;43:979-983.

- [36] Rao UM. Source of superoxide anion radical in aerobic mixtures consisting of NAD(P)H, 5-methylphenazinium methyl sulfate and nitroblue tetrazolium chloride. *Free Radical Biol Med* 1989; 7:513-519.
- [37] Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981;77:325-333.
- [38] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- [39] Astruc T, Marinova P, Labas R, Gatellier P, Santé-Lhoutellier V. Detection and localization of oxidized proteins in muscle cells by fluorescence microscopy. *J Agric Food Chem* 2007;55:9554-9558.
- [40] Sies, H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Medicine* 1999;27:916-921.
- [41] Floderus Y, Sardh E, Moeller C, Andersson C, Rejkjaer L, Andersson DEH, Harper P. Variations in porphobilinogen and 5-aminolevulinic acid concentrations in plasma and urine from asymptomatic carriers of the acute intermittent porphyria gene with increased porphyrin precursor excretion. *Clin Chem* 2006;52:701–707.
- [42] Kang ES, Gerald PS. Hereditary tyrosinemia and abnormal pyrrole metabolism. *J Pediatr* 1970;77:397-406.
- [43] Schierbeek H, Beukeveld GJJ, Van Fassen H, Van Spronsen FJ, Bijsterveld H, Venekamp-Hoolsema EEA et al. Hereditary tyrosinemia type I: a long-term study of the relationship between the urinary excretions of succinylacetone and δ -aminolevulinic acid. *J Inher Metab Dis* 1993;16:1034-1040.
- [44] Tschudy DP, Hess RA, Frykholm BC. Inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydrase by 4,6-dioxoheptanoic acid. *J Biol Chem* 1981;256:9915-9923.
- [45] Venkateswar V, Padmanaban G. Involvement of heme in the transcriptional activation of CYP1B1/B2 gene by phenobarbitone in rat liver--studies with succinylacetone. *Arch Biochem Biophys* 1991;290:167-172.
- [46] Demasi M, Costa CA, Pascual C, Llesuy S, Bechara EJ. Oxidative tissue response promoted by 5-aminolevulinic acid promptly induced the increase of plasma antioxidant capacity. *Free Rad Res* 1997;26:235-243.

- [47] Sinclair P, Granick S. Two methods for determining the activity of delta-aminolevulinate synthetase within intact liver cells in culture. *Anal Biochem* 1977;79:380-393.
- [48] Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992;59:1609-23.
- [49] Olanow CW. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci* 1993;16:439-44.
- [50] López-Torres M, Pérez-Campo R, Cadenas S, Rojas C, Barja G. A comparative study of free radicals in vertebrates II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress. *Comp Biochem Physiol B* 1993;105:757-763.
- [51] Pereira B, Curi R, Kokubun E, Bechara EJ. 5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 1992;72:226-230.
- [52] Oteiza PI, Kleinman CG, Demasi M, Bechara EJ. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Arch Biochem Biophys* 1995;316:607-611.
- [53] Monteiro HP, Abdalla DS, Augusto O, Bechara EJ. Free radical generation during delta-aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. *Arch Biochem Biophys* 1989;271:206-216.
- [54] Oteiza PI, Kleinman CG, Demasi M, Bechara EJ. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Arch Biochem Biophys* 1995;316:607-611.
- [55] Garrick LM, Gniecko K, Liu Y, Cohan DS, Grasso JA, Garrick MD. Iron distribution in Belgrade rat reticulocytes after inhibition of heme synthesis with succinylacetone. *Blood* 1993;81:3414-3421.
- [56] Adams ML, Ostapiuk I, Grasso JA. The effects of inhibition of heme synthesis on the intracellular localization of iron in rat reticulocytes. *Biochim Biophys Acta* 1989;1012:243-253.
- [57] Laftah AH, Simpson RJ, Peters TJ, Raja KB. The effect of haem biosynthesis inhibitors and inducers on intestinal iron absorption and liver haem biosynthetic enzyme activities. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;229:273-280.
- [58] Granick S. Induction of the synthesis of delta-aminolevulinic acid synthetase in liver parenchyma cells in culture by chemical that induce acute porphyria. *J Biol Chem* 1963;238:2247-2249.

- [59] Reynolds ES. Liver parenchymal cell injury. 3. The nature of calcium-associated electron-opaque masses in rat liver mitochondria following poisoning with carbon tetrachloride. *J Cell Biol* 1965;25:53-75.
- [60] Biempica L, Kosower NS, Roheim PS. Cytochemical and ultrastructural changes in rat liver in experimental porphyria. II. Effects of repeated injections of allylisopropylacetamide. *Lab Invest* 1971;24:110-117.
- [61] Biempica L, Kosower NS, Nivikoff AB. Cytochemical and ultrastructural changes in rat liver in experimental porphyria. I. Effects of a single injection of allylisopropylacetamide. *Lab Invest* 1967;17:171-189.
- [62] Perlroth MG, Tschudy DP, Marver HS, Berard CW, Zeigel RF, Rechcigl M, Collins A. Acute intermittent porphyria. New morphologic and biochemical findings. *Am J Med* 1966;41:149-162.
- [63] Biempica L, Kosower N, Ma MH, GoldFisher S. Hepatic porphyrias. Cytochemical and ultrastructural studies of liver in acute intermittent porphyrias and porphyria tarda. *Arch Pathol* 1974;98:336-343.

Table I. Mean plasma, liver and urine ALA levels for all the studied groups. The animals in group I were treated with saline solution (0.67 mL/kg body weight). Animals in groups II, III and IV were treated with 10, 40 and 80 mg SAME/kg body weight, respectively. Data are shown as mean ($\pm$ SD).

ALA levels (unit; n)	Groups (mg SAME/kg body weight)			
	I (control)	II (10 mg)	III (40 mg)	IV (80 mg)
Plasma (μ mol/mL; n=8)	0.48 ($\pm$ 0.04) (0.45-0.60)	3.30 ($\pm$ 0.80)* (2.28-4.48)	3.99 ($\pm$ 0.45)* (3.26-4.56)	4.39 ($\pm$ 0.93)*,# (3.10-5.62)
Liver (nmol/mg protein; n=8)	1.92 ($\pm$ 0.35) (1.60-2.60)	30.83 ($\pm$ 7.36)* (22.13-39.99)	42.73 ($\pm$ 4.38) [#] (40.40-49.77)	45.80 ($\pm$ 11.74) ^{#,δ} (33.62-66.62)
Urine (between the 2 nd and 3 rd i.p.) (μ mol/mL; n=8)	4.15 ($\pm$ 1.69) (1.66-7.66)	49.93 ($\pm$ 5.3)* (43.55-58.11)	52.26 ($\pm$ 9.58)* (39.13-66.67)	54.26 ($\pm$ 8.44)*,# (40.51- 67.63)

Plasma: * $p < 0.001$ is statistically different from control (group I). # $p < 0.001$ is statistically different from group II (10 mg SAME/kg body weight). Multiple comparisons between the groups were made using the Tukey-Kramer test.

Liver: * $p < 0.05$ is statistically different from control (group I). # $p < 0.001$ is statistically different from control (group I). $\delta p < 0.05$ is statistically different from group II (10 mg SAME/kg body weight). Multiple comparisons between the groups were made using the Kruskal-Wallis test.

Urine: * $p < 0.001$ is statistically different from control (group I). # $p < 0.05$ is statistically different from group II (10 mg SAME/kg body weight). Multiple comparisons between the groups were made using the Kruskal-Wallis test.

Table II. Liver ALA-D activity for animals in groups I, II, III and IV. Animals in group I were treated with saline solution (0.67 mL/kg body weight). Animals in groups II, III and IV were treated with 10, 40 and 80 mg SAME/kg body weight, respectively. n=6.

Group	% ALA-D activity
	Liver
I	100
II	5.63 ^{a,d}
III	4.18 ^{b,d}
IV	0.98 ^c

a. $p < 0.05$ is statistically different from control (group I); b. $p < 0.01$ is statistically different from control (group I); c. $p < 0.001$ is statistically different from control (group I); d. $p < 0.001$ is statistically different from group IV (80 mg SAME/kg body weight). Multiple comparisons between the groups were made using the Kruskal-Wallis test.

Table III. Mean ($\pm$ SD) reduction in urinary COPRO for all the treated groups. Mean ($\pm$ SD) renal clearance of ALA for all the treated groups. Animals in group I were treated with saline solution (0.67 mL/kg body weight). Animals in groups II, III and IV were treated with 10, 40 and 80 mg SAME/kg body weight, respectively. n=5.

Group	Reduction in urinary COPRO levels (%)	Clearance of ALA (mL/min) (mean $\pm$ SD)
I		0.24 ($\pm$ 0.14)
II	90 (ranging from 72 to 104) ^{*,#,δ}	0.39 ($\pm$ 0.18) ^{a,b}
III	65 (ranging from 51 to 80) ^{*,#}	0.25 ($\pm$ 0.08)
IV	79 (ranging from 50 to 118) ^{*,#}	0.33 ($\pm$ 0.13) ^c

Urinary COPRO: *Data were normalized subtracting the values found for the control group. # $p < 0.001$ is statistically different from control (group I). $\delta p < 0.05$ is statistically different from groups III and IV (40 and 80 mg SAME/kg body weight, respectively). Multiple comparisons between the groups were made using the Tukey-Kramer test.

Clearance of ALA: $a p < 0.05$ is statistically different from control (group I). $b p < 0.01$ is statistically different from group III (40 mg SAME/kg body weight). $c p < 0.01$ is statistically different from group III (40 mg SAME/kg body weight). Multiple comparisons between the groups were made using the Kruskal Wallis test.

Table IV. Mean liver protein carbonyl, lipid peroxidation, GSH/(GSH+GSSG) ratio, total non-heme iron content, SOD activity and glutathione peroxidase activity for all the studied groups. Animals in group I were treated with saline solution (0.67 mL/kg body weight). Animals in groups II, III and IV were treated with 10, 40 and 80 mg SAME/kg body weight, respectively. Data are shown as mean ($\pm$ SD).

Biomarkers of oxidative imbalance	Groups (mg SAME/kg body weight)			
	Liver			
	I (control)	II (10 mg)	III (40 mg)	IV (80 mg)
Carbonyl protein (nmol/mg protein; n=6)	6.04 ($\pm$ 2.10) (3.75-9.20)	13.78 ($\pm$ 3.99)* (10.13-20.76)	5.34 ($\pm$ 1.18) (4.11-7.50)	4.99 ($\pm$ 0.68) (3.99-6.10)
Lipid peroxidation (MDA) nmol/mg protein; n=6)	2.63 ($\pm$ 0.40) (2.22-3.17)	2.92 ($\pm$ 0.60) (2.11-3.67)	3.41 ($\pm$ 0.42)*.# (2.90-4.08)	2.83 ($\pm$ 0.24) (2.48-3.09)
GSH/(GSH+GSSG) ratio (n=5)	0.22 ($\pm$ 0.04)	0.23 ($\pm$ 0.10)	0.23 ($\pm$ 0.05)	0.25 ($\pm$ 0.08)
Total non-heme iron (μ g Fe/mg tecido; n=8)	0.50 ($\pm$ 0.15)	0.48 ($\pm$ 0.10)	0.75 ($\pm$ 0.24)**	0.59 ($\pm$ 0.15)
SOD activity (U/ mg protein; n=8)	54.11 ($\pm$ 8.27)	52.74 ($\pm$ 12.28)	48.80 ($\pm$ 10.04)	56.31 ($\pm$ 5.40)
Glutathione peroxidase activity (nmols NADPH/min.mg protein; n=7)	2.19 ($\pm$ 1.19)	3.35 ($\pm$ 1.36)	4.82 ($\pm$ 1.24)*	3.48 ($\pm$ 1.29)

Liver protein carbonyl: * $p < 0.001$ is statistically different from groups I (control), III and IV. Multiple comparisons between the groups were made using the Tukey-Kramer test.

Liver MDA: * $p < 0.001$ is statistically different from control (group I). # $p < 0.05$ is statistically different from group IV (80 mg SAME/kg body weight). Multiple comparisons between the groups were made using the Tukey-Kramer test.

Total non-heme iron liver levels: ** $p < 0.05$ is statistically different from control (group I) and group II.

Glutathione Peroxidase activity: * $p < 0.001$ is statistically different from control (group I). Multiple comparisons between the groups were made using the Tukey-Kramer test.

Figure legends

Figure 1. Localization of iron (**A, E, I**), ferritin (**B, F, J**) and DNP (**C, G, K**) in the liver of normal (**A-D**) or SAME treated rats (10 mg, **E-H**; 40 mg **I-L**; 80 mg, insert of Figures **I-K**). Stainable iron is observed as irregular dark granules in liver cell cytoplasm (arrows). The density of granules in the liver parenchyma varied with the animals' treatment (**A, E, I** and insert). By contrast, DNP immunoreactivity shows differences (**C, G, K** and insert) in intensity, but is uniformly distributed in liver cells. In general, immunoreaction for ferritin is weak in liver cells except in 10 mg SAME-treated samples (**B, F, J**). (v) portal vein; (s) sinusoid; (h) hepatocyte columns; (p) portal area. Figures **D, H** and **L** are representative of the immunoreaction controls in which the primary antibody was replaced by non-immune rabbit serum, respectively, for anti-ferritin in the control group, anti-DNP in the 10 mg SAME treated group, and anti-DNP reaction in the 40 mg SAME treated group.

Figure 2. Electron microscopy analyses of the hepatic parenchyma: (**A**) control group. (**B-D**) 10 mg SAME/Kg. (**E-H**) 40 mg SAME/kg. Hepatocytes (**h**) show euchromatic nucleus (**n**), prominent nucleolus (**nc**) and cytoplasm rich in mitochondria. **C** and **D**, respectively, highlight mitochondria with electron dense matrix (white asterisk) and mitochondria with normal morphology (black asterisk), as well as a heterophagosome-like organelle, which are common ultrastructural findings in hepatocyte-treated animals. (**E,H**) Mitochondria with atypical electron dense matrix (white asterisk) and with electron dense inclusions (arrows) prevailed over mitochondria with normal appearance (black asterisk) in hepatocytes of 40 mg SAME-treated animals. (**F**) Lipid droplets are particularly numerous in this group (**L**) and occasionally also (**G**) rounded mitochondria with scarce cristae (**m**) surrounded by dilated endoplasmic reticulum cisternae (arrowheads). (d) Space of Disse. Bar in **E** indicates 7 μm (**A, B, F**), 2 μm (**C, G**), 0.25 μm (**D**), 20 μm (**E**), or 5 μm (**H**).

Figure 1. Localization of iron (A, E, I), ferritin (B, F, J) and DNP (C, G, K) in the liver of normal (A-D) or SAME-treated rats (10 mg, E-G; 40 mg I-K; 80 mg, insert of Figures I-K). Figures D, H and L are representative of the immunoreaction controls in which the primary antibody has been replaced by non-immune rabbit serum, respectively, for anti-ferritin in the control group, anti-DNP in the 10 mg SAME-treated group, and anti-DNP reaction in the 40 mg SAME-treated group.

Figure 2. Electron microscopy analyses of the hepatic parenchyma: (A) control group. (B-D) 10 mg SAME/kg. (E-H) 40 mg SAME/kg.