

Evidência de que os ácidos β -hidroxibutirato e acetoacetato não causam estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens in vitro

CAROLINA GONÇALVES FERNANDES ¹
ESTELA NATACHA BRANDT BUSANELLO ²
ALANA PIMENTEL MOURA ³
ANA PAULA BESKOW ⁴
LUCILA DE BORTOLI DA SILVA ⁴
MOACIR WAJNER ⁵

RESUMO

O acúmulo dos corpos cetônicos (CC) acetoacetato (AcAc) e β -hidroxibutirato (BHB) ocorre durante o jejum e durante episódios de descompensação metabólica em desordens neurometabólicas hereditárias. O presente estudo investigou o efeito in vitro do AcAc e do BHB sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens. Nossos resultados demonstraram que o AcAc e o BHB não foram capazes de alterar os parâmetros testados. Concluindo, estes dados sugerem que o AcAc e o BHB não possuem propriedades anti-oxidantes ou pró-oxidantes em córtex cerebral de ratos jovens.

Palavras-chave: *Corpos cetônicos, acetoacetato, β -hidroxibutirato, ratos, in vitro.*

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina/ULBRA – Bolsista CNPq-PIBIC/ULBRA

² Acadêmico do Curso de Biomedicina/ULBRA

³ Acadêmico do Curso de Biomedicina/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

⁴ Acadêmico do PPG Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA

⁵ Professor – Orientador do PPG Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA (mwajner@ufrgs.br)

ABSTRACT

The ketone bodies (CC) acetoacetate (AcAc) and β -hydroxybutyrate (BHB) accumulation occurs during fasting and during metabolic decompensation in inherited neurometabolic disorders. The present study investigated the *in vitro* effect of AcAc and BHB on several oxidative stress parameters in cerebral cortex of young rats. Our results show that AcAc and BHB did not alter the parameters analysed. Concludingly, the data suggest that CC do not act as *pro-oxidant* nor *antioxidant* effects in cerebral cortex of young rats.

Key words: Ketone bodies, acetoacetate, β -hidroxibutirato, rats, *in vitro*.

INTRODUÇÃO

Os corpos cetônicos (CC) são conhecidos como uma grande fonte de energia utilizada no jejum (OWEN et al. 1967). Os CC, β -hidroxibutirato (BHB), acetoacetato (AcAc) e acetona, são produzidos pela degradação de ácidos graxos no fígado e liberados na circulação para serem incorporados por vários tecidos extra-hepáticos incluindo o cérebro para fornecer energia (MITCHELL et al. 1995). Concentrações plasmáticas elevadas de CC são devido a um aumento de produção, a uma diminuição do consumo ou a uma alteração de algum processo específico regulatório em seu metabolismo. Os CC também estão caracteristicamente elevados em condições patológicas como diabetes durante descompensação metabólica (aumento na produção) e defeitos cetolíticos (diminuição no uso) como nas deficiências da acetoacetil-CoA tiosolase (T2) e da succinil CoA: 3-oxoácido CoA transferase (SCOT), nas quais as concentrações sanguíneas dessas substâncias (cetose) podem atingir níveis tão elevados quanto 25 mM (ADROGUE et al. 1982; LAFFEL 1999; NIEZEN-KONING et al. 1997; MITCHELL e FUKAO 2001; FUKAO et al. 2004). Pacientes afetados pelas deficiências de T2 e SCOT normalmente apresentam sintomas neurológicos (MITCHELL e FUKAO 2001).

Apesar de apresentarem efeitos benéficos como excelentes substratos para formação de energia,

ações deletérias vem sendo demonstradas para os CC, como por exemplo gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), induzir lipoperoxidação e níveis diminuídos de glutatona reduzida (GSH) em eritrócitos, células endoteliais e monócitos de pacientes diabéticos, e em culturas de células hepáticas *in vitro* (JAIN et al. 1998, 1999; JAIN e MCVIE 1999; LEE et al. 2002; SQUIRES et al. 2003; ABDELMEGGED et al. 2004; BROOKES et al. 2004; Jain et al. 2006). Também vem sendo demonstrado que ocorre estresse oxidativo em diabéticos hipercetonêmicos, mas não em normocetonêmicos em comparação com indivíduos normais (JAIN et al. 2006).

A maioria destes estudos associam hipercetonemia, especialmente com altos níveis de AcAc, com indução de peroxidação lipídica e normocetonemia com redução do dano oxidativo a lipídeos (JAIN et al. 1998, 1999; JAIN e MCVIE 1999). No entanto, a ativação de rotas de sinalização celular envolvida com o estresse oxidativo por corpos cetônicos ainda não foi estabelecida e o papel dos CC induzir estresse oxidativo até agora foi baseado em resultados obtidos com somente alguns parâmetros e em tecidos periféricos.

Por outro lado, trabalhos prévios tem demonstrado que uma dieta cetogênica é neuroprotetora contra várias doenças agudas e crônicas (GILBERT et al. 2000; KASHIWAYA et al. 2000). Além disso, foi verificado que o BHB e o AcAc protegem neu-

rônios hipocampais expostos a MPP⁺, um inibidor da NADH desidrogenase e reduzem o dano cerebral de roedores submetidos à inibição da glicólise ou isquemia generalizada *in vivo* e *in vitro* (SUZUKI et al. 2001, 2002; MASSIEU et al. 2003).

No presente estudo tivemos como objetivo avaliar os efeitos de BHB e AcAc, nas concentrações encontradas em pacientes diabéticos durante crises de cetoacidose e em indivíduos afetados pelas deficiências da SCOT e da T2 sobre um amplo espectro de parâmetros de estresse oxidativo, tais como quimiluminescência e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (peroxidação lipídica), formação de carbonilas e oxidação de grupamentos sulfidrila (dano oxidativo a proteínas), reatividade antioxidante total (TAR) e níveis de GSH (defesas antioxidantes não-enzimáticas) em cérebro de ratos jovens.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de experimentação: Foram utilizados ratos Wistar de 30 dias de idade, de ambos os sexos, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Os ratos foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais tinham livre acesso à água e ao alimento (ração Supra ou Purina, São Leopoldo, RS). A utilização dos animais seguiu um protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 80-23, revisada em 1996).

Reagentes: foram utilizados reagentes químicos das marcas Sigma e Merck.

Preparação das amostras para análise dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo

Os animais foram sacrificados por decapitação com guilhotina e sem anestesia, a caixa craniana foi aberta e o seu conteúdo retirado e, a partir de então, mantido sobre uma placa de vidro a aproximadamente 0°C . O cérebro foi limpo, sendo retirado o excesso de sangue dos vasos externos. Posteriormente, o bulbo olfatório, o tronco cerebral e o cerebelo foram desartados, e o córtex cerebral dissecado, pesado e homogeneizado em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo KCl 140 mM, na proporção de 1:10 (peso/volume). Finalmente, foram retiradas alíquotas para a realização de uma pré-incubação de 60 min a 37°C na ausência dos metabólitos a serem testados (grupo controle) ou na presença dos mesmos (grupos teste).

Parâmetros de Estresse oxidativo (oxidações biológicas)

Medida dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS): foi realizada baseando-se na reação do malondialdeído formado na amostra durante a incubação com o ácido tiobarbitúrico (ESTERBAUER e CHEESEMAN, 1990).

Medida da quimiluminescência espontânea: foi realizada através da medida da quimiluminescência emitida pelos radicais livres formados no processo de lipoperoxidação em homogeneizado de córtex cerebral (GONZALEZ-FLECHA et al., 1991).

Medida do conteúdo de sulfidrilas totais: foi realizada através da redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) pelos grupamentos tióis não-oxidados das proteínas contidas na amostra (AKSENOV e MARKESBERY, 2001).

Medida do conteúdo de grupos carbonila: foi realizada de acordo com o método de Reznick e Packer (1994), em que os grupos carbonila presentes em proteínas oxidadas contidas na amostra reagem com dinitrofenil-hidrazina (DNPH).

Determinação das concentrações de glutatona reduzida (GSH): foram determinadas através do método descrito por Browne e Armstrong (1998), em que GSH reage com o fluoróforo o-ftaldialdeído.

Reatividade Antioxidante Total (TAR): foi determinada pelo método descrito por Lissi et al. (1995), através da medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida pelo 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP) à temperatura ambiente.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados usando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 16.0 em um computador PC compatível. Para os experimentos, utilizou-se análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan, quando o valor de F foi significativo. Utilizou-se também o teste *t* de Student para amostras pareadas. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Medida de Proteínas

O conteúdo protéico em todas as técnicas empregadas foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951), usando albumina bovina sérica como padrão.

RESULTADOS

A peroxidação lipídica foi inicialmente investigada através dos níveis de TBA-RS e quimiluminescência em cérebro de ratos. As Figuras 1 e 2, respectivamente, mostram que sob condições basais AcAc [$F_{(3,12)} = 2,440$; $P = 0,115$] e BHB [$F_{(3,12)} = 1,043$; $P = 0,409$] não alteraram os valores de TBA-RS em doses tão altas quanto 25mM. Similarmente, AcAc [$F_{(3,16)} = 0,183$; $P = 0,906$] (Figura 3) e BHB [$F_{(3,16)} = 0,360$; $P = 0,782$] (Figura 4) não alteraram os valores de quimiluminescência em sobrenadante cortical de ratos. Isso também pode ser visto nas Figuras 5 e 6 onde tanto o AcAc [$F_{(3,16)} = 29,854$; $P < 0,001$] como o BHB [$F_{(3,16)} = 42,048$; $P < 0,001$], respectivamente, também não alteraram o aumento dos níveis de TBA-RS causado pelo sistema gerador de radicais hidroxila. Sendo assim, podemos concluir que o BHB e o AcAc não provocam peroxidação lipídica em córtex cerebral de ratos.

O dano oxidativo protéico foi avaliado pela medida dos conteúdos de sulfidrilas e carbonilas. O AcAc [$F(3,12) = 0,622$; $P = 0,614$] (Figura 7) e o BHB [$F(3,12) = 0,777$; $P = 0,529$] (Figura 8) não alteraram a oxidação das sulfidrilas e tampouco o conteúdo de carbonilas [Figura 9 – AcAc: $F(3,20) = 1,757$; $P = 0,188$], [Figura 10 – BHB: $F(3,15) = 0,847$; $P = 0,489$], nas concentrações de 1 a 25 mM, indicando que estes metabólitos não causam dano oxidativo protéico em córtex cerebral.

As defesas antioxidantes não-enzimáticas foram também investigadas através da medida do TAR e dos níveis de GSH. Nossos resultados demonstram que o AcAc [$F(3,8) = 0,304$; $P = 0,822$] (Figura 11) bem como o BHB [$F(3,8) = 0,422$; $P = 0,743$] (Figura 12) não modificaram o valor

do TAR. Da mesma maneira, ambos os metabólitos não alteraram os níveis de GSH [AcAc: $F(3,12)=0,744$; $P=0,530$] (Figura 13), [BHB: $F(3,12)=2,069$; $P=0,158$] (Figura 14). Além disso, AcAc e BHB, na concentração de 25mM, também não foram capazes de oxidar uma solução comercial de GSH na concentração de 200 μM , enquanto 150 μM de N-etilmaleimida (controle positivo) promoveu a oxidação de 75% de uma solução de 200 μM de GSH [$F(3,4)=16,123$; $P<0,001$] (resultados não demonstrados).

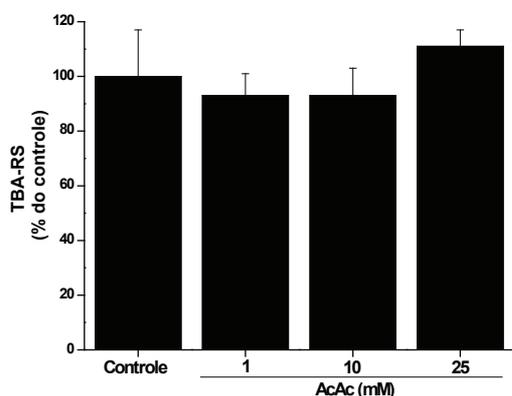


Figura 1 - Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizados de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=4$) e foram expressos em percentual dos controles ($4,15 \pm 0,15$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

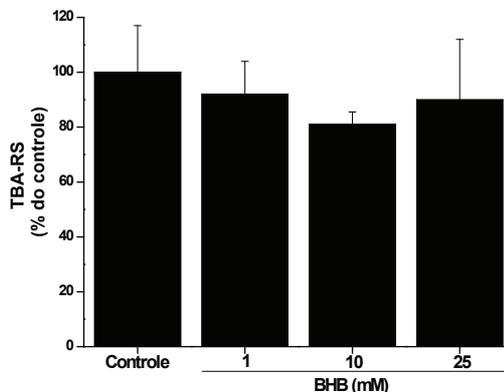


Figura 2 - Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizados de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=5$) e foram expressos em percentual dos controles ($4,15 \pm 0,15$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

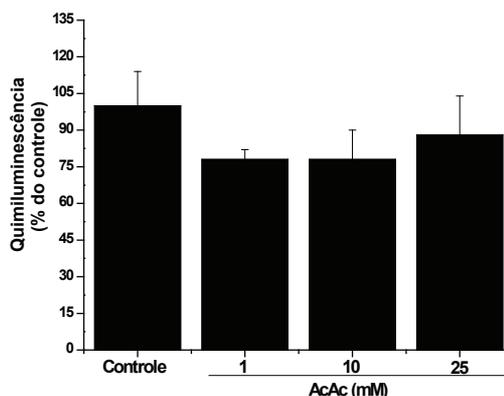


Figura 3 - Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=5$) e foram expressos em percentual do controle (3632 ± 706 cpm/min). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao con-

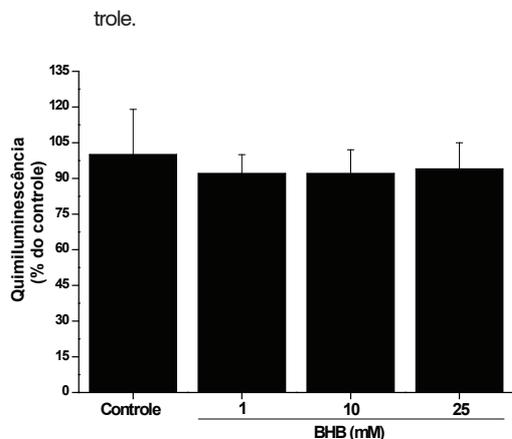


Figura 4 - Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e foram expressos em percentual do controle (3632 ± 706 cpm/min). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

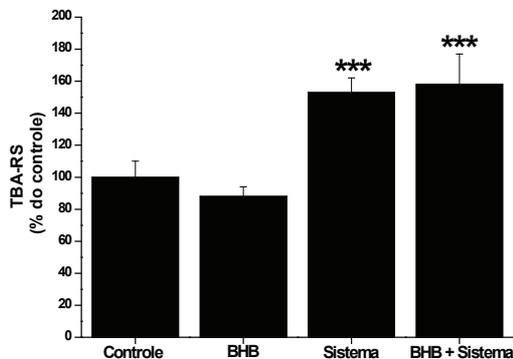


Figura 6 - Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre os níveis de TBA-RS na presença de um sistema gerador de radicais hidroxila em homogeneizados de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e foram expressos em percentual dos controles ($3,74 \pm 0,40$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguindo-se do teste de Duncan (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, comparado ao controle).

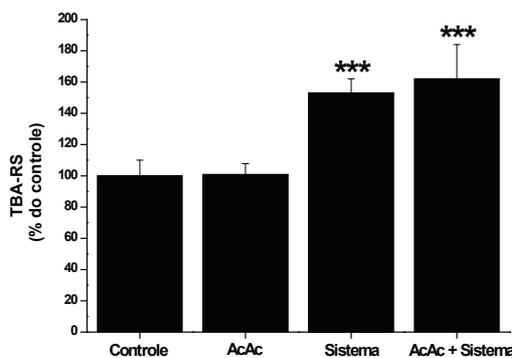


Figura 5 - Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre os níveis de TBA-RS na presença de um sistema gerador de radicais hidroxila em homogeneizados de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e foram expressos em percentual dos controles ($3,74 \pm 0,40$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguindo-se do teste de Duncan (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, comparado ao controle).

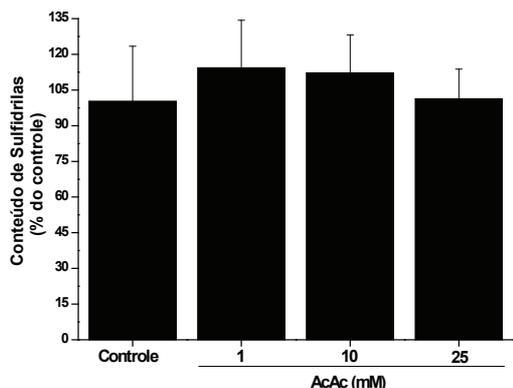


Figura 7 - Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre a medida de grupos sulfidrilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e foram expressos em percentual do controle ($15,0261 \pm 9,47$ nmol de sulfidrilas/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

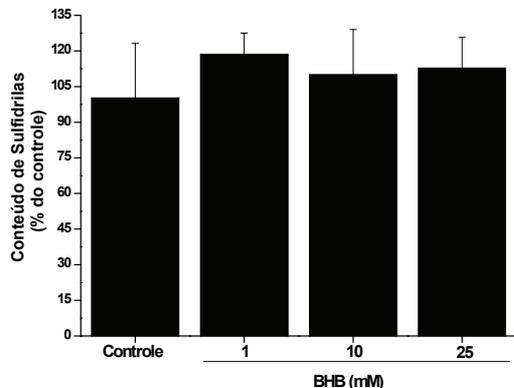


Figura 8 - Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a medida de grupos sulfidrilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4) e foram expressos em percentual do controle ($15,0261 \pm 9,47$ nmol de sulfidrilas/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

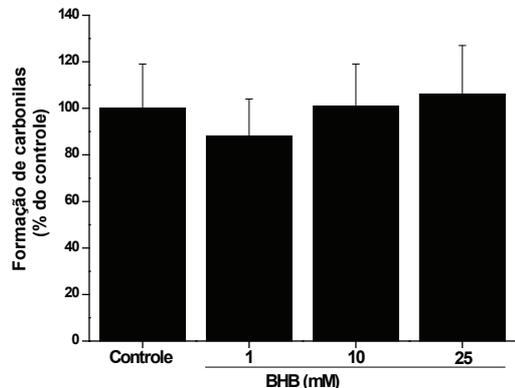


Figura 10 - Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=7) e foram expressos em percentual do controle ($0,86 \pm 0,17$ nmol de carbonila/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

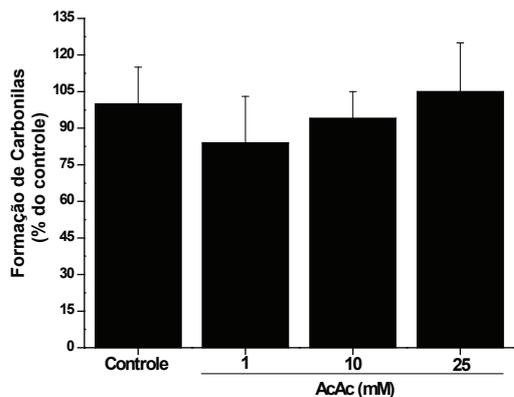


Figura 9 - Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=6) e os resultados expressos em percentual do controle ($0,74 \pm 0,11$ nmol de carbonila/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

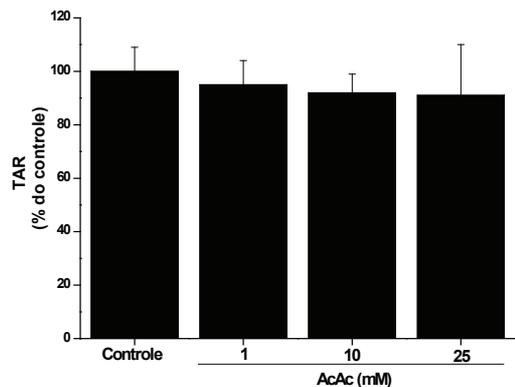


Figura 11 - Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de córtex de cérebros de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (n=3) e estão expressos em percentual do controle ($66,73 \pm 6,30$ nmol de Trolox / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

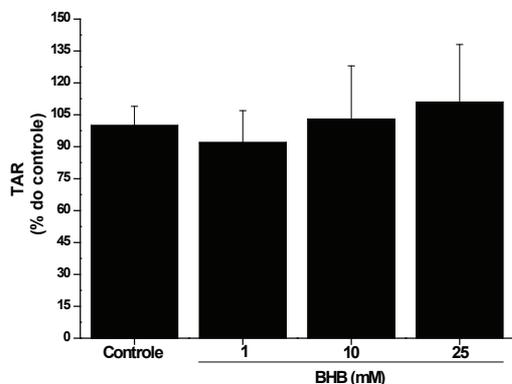


Figura 12 - Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de córtex de cérebros de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=3$) e estão expressos em percentual do controle ($66,73 \pm 6,30$ nmol de Trolox / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

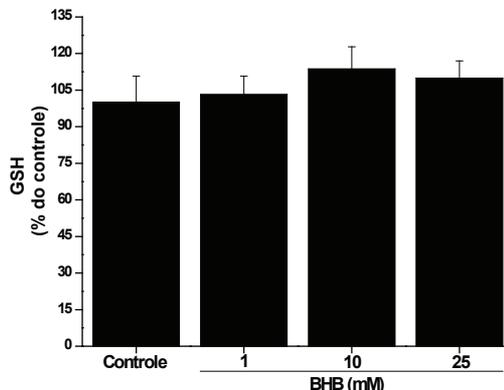


Figura 14 - Efeito *in vitro* do ácido β -hidroxibutírico (BHB) sobre as concentrações de glutathione reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=4$) e foram expressos em percentual do controle ($8,78 \pm 0,94$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

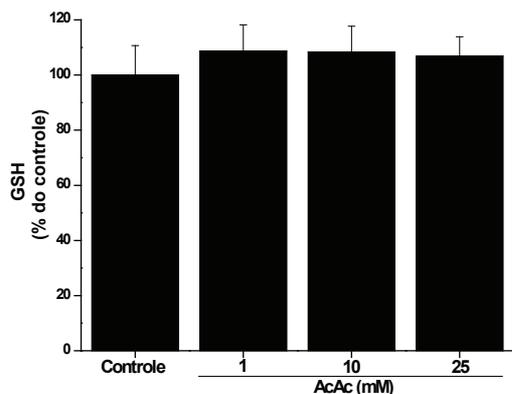


Figura 13 - Efeito *in vitro* do ácido acetoacético (AcAc) sobre as concentrações de glutathione reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=4$) e foram expressos em percentual do controle ($8,78 \pm 0,94$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não foi detectada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

DISCUSSÃO

Existem relatos controversos na literatura sobre atividades pró-oxidantes e antioxidantes dos CC que estão normalmente aumentados em pacientes durante descompensação metabólica (produção elevada) e em indivíduos afetados pelas deficiências de SCOT e T2 (diminuição da degradação). Estudos prévios revelaram que AcAc, mas não o BHB, parece induzir geração de espécies reativas em células periféricas (JAIN et al. 1998, 1999; JAIN e MCVIE 1999; ABDELMEGGED et al. 2004; JAIN et al. 2006). Além disso, algumas evidências tem revelado que o BHB possui atividades neuroprotetoras *in vivo* e *in vitro* provavelmente através de suas propriedades antioxidantes (GILBERT et al. 2000; KASHIWAYA et al. 2000; SUZUKI et al. 2001, 2002; MASSIEU et al. 2003). Outros

estudos demonstram que esses CC, com ênfase particular ao BHB, reduzem o dano oxidativo no tecido cardíaco (Veech et al. 2001). Entretanto, em geral estes trabalhos utilizam poucos parâmetros de estresse oxidativo, particularmente a peroxidação lipídica e os níveis teciduais de GSH.

No presente estudo investigamos os efeitos *in vitro* do BHB e AcAc, nas concentrações normalmente encontradas no sangue de pacientes diabéticos com severa descompensação metabólica e de pacientes afetados pelas deficiências de SCOT e T2, sobre um largo espectro de parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens.

Observamos que a peroxidação lipídica (quimiluminescência e níveis de TBA-RS), o dano oxidativo protéico (oxidação de sulfidrila e formação de carbonilas) e as defesas antioxidantes não enzimáticas (TAR e GSH) não foram alteradas por doses de BHB e AcAc tão elevadas quanto 25 mM no tecido cerebral. Também observamos que os CC não afetaram o aumento de produção de ERO induzida por um sistema gerador de radical hidroxila. Portanto, sob condições basais com uma alta produção de radicais livres, o AcAc e o BHB não foram capazes de reduzir ou aumentar os parâmetros de estresse oxidativo no cérebro. Além disso, BHB e AcAc não oxidaram os grupamentos sulfidrila de uma solução comercial de GSH.

Nossos resultados, em conjunto, não sustentam a hipótese de que BHB e o AcAc atuam *in vitro* como potentes agentes pró ou antioxidantes diretos ou indiretos no sistema nervoso central. Esta conclusão está de acordo com o fato de que diabéticos com freqüentes e severos episódios cetóticos não sofrem danos neurológicos e psicomotores aparentes. Além disso, o desenvolvimento físico e mental é normal nos pacientes afetados pelas deficiências de SCOT e T2 com cetose e cetonúria persistentes, refletindo

um desenvolvimento normal do SNC, bem como das funções cerebrais (NIEZEN-KONING et al. 1997), como poderia ser esperado no caso em que AcAc e BHB provocassem estresse oxidativo já que o cérebro é especialmente vulnerável ao ataque de radicais livres (JAIN et al. 1998, 1999; JAIN e MCVIE 1999; ABDELMEGGED et al. 2004; JAIN et al. 2006).

Por outro lado, não podemos excluir a possibilidade de que os corpos cetônicos, especialmente o AcAc, pudessem atuar como pró-oxidantes em tecidos periféricos bem como vem sendo demonstrado em monócitos, eritrócitos e células endoteliais principalmente em pacientes diabéticos com alto nível de cetonas no sangue (JAIN et al. 1998, 1999; JAIN e MCVIE 1999; LEE et al. 2002; SQUIRES et al. 2003; ABDELMEGGED et al. 2004; JAIN et al. 2006). Neste particular, atividades pró-oxidantes, pelos quais os mecanismos ainda não estão bem estabelecidos, tem sido particularmente atribuídas ao AcAc em células periféricas (JAIN e MCVIE 1999) e em um sistema livre de células (JAIN et al. 2006). Além disso, não podemos até o presente momento estabelecer o papel dos CC no estresse oxidativo característicos em diabéticos já que a hiperglicemia é também capaz de induzir estresse oxidativo, bem como em monócitos e na disfunção endotelial (JAIN 1989; RAJESWARI et al. 1991; TESFAMARIAM e COHEN 1992; NISCHIKAWA et al. 2000; NATARAJAN et al. 2002).

Outros resultados revelaram propriedades neuroprotetoras para estas substâncias *in vitro* e *in vivo* e especialmente para o BHB em isquemia, epilepsia, inibição da glicólise, doenças de Parkinson e Alzheimer (GILBERT et al. 2000; KASHIWAYA et al. 2000; SUSUKI et al. 2001, 2002; MASSIEU et al. 2003; Malouf et al. 2007). Pode-se presumir que a indução neuroprotetora do BHB pode ocorrer via mecanismo indireto como, por exemplo, pela

reposição energética tecidual devido ao aumento da respiração celular e produção de ATP nestas situações caracterizadas por déficit de energia, ao invés das atividades antioxidantes diretas (SUZUKI et al. 2001; VEECH et al. 2001). Neste contexto, está bem estabelecido que os corpos cetônicos são excelentes substratos para geração de energia no cérebro (MORRIS 2005). Alternativamente, dietas cetogênicas podem ser neuroprotetoras pelo aumento do nível de proteínas desaclopadas no hipocampo, conduzindo indiretamente a diminuição da produção de espécies reativas e excitabilidade neuronal (SULLIVAN et al. 2004).

Concluindo, o presente estudo demonstrou que o AcAc e o BHB *per se* não promovem ou previnem o estresse oxidativo *in vitro* no cérebro de ratos em desenvolvimento. Vários parâmetros de estresse oxidativo foram testados, distintamente de outros estudos descritos na literatura que basicamente testaram os efeitos dos CC sobre a peroxidação lipídica e os níveis de GSH. Presumimos que os efeitos neuroprotetores observados pelo AcAc e particularmente BHB em várias situações patológicas *in vivo* e em culturas de células hipocâmpais são, ao menos em parte, indiretos e provavelmente devidos a restauração dos substratos energéticos necessários para a sobrevivência e atividade neuronal. Não podemos também excluir que os estudos contraditórios de estudos prévios e do presente trabalho em relação aos efeitos pró ou antioxidantes dos CC provavelmente refletem diferenças de metodologia ou teciduais específicas. Neste contexto, demonstramos no presente estudo que estes compostos não alteram os parâmetros de estresse oxidativo no cérebro, enquanto que quase todos os estudos descritos anteriormente demonstram os efeitos desses corpos cetônicos em tecidos periféricos.

REFERÊNCIAS

ABDELMEGGED, M.A. et al. Acetoacetate activation of extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$ and p38 mitogen-activated protein kinase in primary culture rat hepatocytes: role of oxidative stress. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.310, p.728-736, 2004.

ADROGUÉ, H.J. et al. Plasma acid-base patterns in diabetic ketoacidosis. **New England Journal of Medicine**, v.307, p.1603-1610, 1982.

AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v.302, p.141-145, 2001.

BROOKES, PS et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v. 287, p.C817-C833, 2004.

BROWNE, R.W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Methods in Molecular Biology**, v.108, p.347-352, 1998.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v.186, p.407-421, 1990.

FUKAO, T. et al. Patients homozygous for the T435N mutation of succinyl-CoA: 3-ketoacid CoA transferase (SCOT) do not show permanent ketosis. **Pediatric Research**, v.56, p.858-863, 2004.

GILBERT, D.L.; PYZIK, P.L.; FREEMAN, J.M. The ketogenic diet: seizure control correlates

better with serum beta-hydroxybutyrate than with urine ketones. **Journal of Child Neurology**, v.15, p.787-790, 2000.

GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v.10, p.93-100, 1991.

JAIN, S.K. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, p.21340-21345, 1989.

JAIN, S.K.; KRISHNASWAMY, K.; LIM, G. Ketosis (acetoacetate) can generate oxygen radicals and cause increased lipid peroxidation and Growth inhibition in human endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v.25, p.1083-1088, 1998.

JAIN, S.K.; MCVIE, R. Hyperketonemia can increase lipid peroxidation and lower glutathione levels in human erythrocytes in vitro and in type 1 diabetic patients. **Diabetes**, v.48, p.1850-1855, 1999.

JAIN, S.K.; MCVIE, R.; BOCCHINI, J.A, Jr. Hyperketonemia (ketosis), oxidative stress and type 1 diabetes. **Pathophysiology**, v.13, p.163-170, 2006.

JAIN, S.K. et al. Effect of hyperketonemia on plasma lipid peroxidation levels in diabetic patients. **Diabetes Care**, v.22, p.1171-1175, 1999.

KASHIWAYA, Y. et al. D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, p.5440-5444, 2000.

LAFFEL, L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. **Diabetes/Metabolism: Research and Reviews**, v.15, p.412-426, 1999.

LEE, D.M. et al. Lipid peroxidation and antioxidant vitamins prior to, during, and after correction of diabetic ketoacidosis. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v.16, p.294-300, 2002.

LISSI, E. et al. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radical Biology and Medicine**, v.18, p.153-58, 1995.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

MAALOUF, M. et al. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. **Neuroscience**, v.145, p.256-264, 2007.

MASSIEU, L. et al. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. **Neuroscience**, v.120, p.365-378, 2003.

MITCHELL, G.A. et al. Medical aspects of ketone body metabolism. **Clinical and Investigative Medicine**, v.18, p.193-216, 1995.

MITCHELL, G.A.; FUKAO, T.J.C. Inborn errors of ketone body metabolism. In: SCRIVER, C.R. (Eds). **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 2340-2342,

MORRIS, A.A.M. Cerebral ketones body metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.28, p.109-121, 2005.

NATARAJAN, R. et al. Role of 12-lipoxygenase and oxidant stress in hyperglycaemia-induced acceleration of atherosclerosis in a diabetic pig model. **Diabetologia**, v.45, p.125-133, 2002.

NIEZEN-KONING, K. E. et al. Succinyl-CoA:acetoacetate transferase deficiency: identification of a new patient with a neonatal onset and review of the literature. **European Journal of Pediatrics**, v.156, p.870-873, 1997.

NISCHIKAWA, T. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. **Nature**, v.404, p.787-790, 2000.

OWEN, O.E. et al. Brain metabolism during fasting. **Journal of Clinical Investigation**, v.46, p.1589-1596, 1967.

RAJESWARI, P. et al. Glucose induces lipid peroxidation and inactivation of membrane associated iron transport enzymes in human erythrocytes *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Cellular Physiology**, v.149, p.100-109, 1991.

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v.233, p.357-363, 1994.

SQUIRES, J.E. et al. Acetoacetate augments β -adrenergic inotropism of stunned myocardium by an antioxidant mechanism. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v.284, p.H1340-H1347, 2003.

SULLIVAN, P.G. et al. The ketogenic diet increase mitochondrial uncoupling protein levels and activity. **Annals of Neurology**, v.55, p.576-580, 2004.

SUZUKI, M. et al. Beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.89, p.36-43, 2002.

SUZUKI, M. et al. Effect of beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.87, 143-150, 2001.

TESFAMARIAM, B.; COHEN, R.A. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. **Journal of Physiology**, v.262, p.H321-H326, 1992.

VEECH, R.L. et al. Ketones bodies, potential therapeutic uses. **IUBMB Life**, v.51, p.241-247, 2001.