

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**L-CARNITINA NO TRATAMENTO DA DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO  
BORDO: ESTUDOS EM HUMANOS E EM MODELO ANIMAL SOBRE O  
ESTRESSE OXIDATIVO E O PERFIL INFLAMATÓRIO**

CAROLINE PAULA MESCKA

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE, 2015.

Mescka, Caroline Paula

L-carnitina no tratamento da Doença da Urina do Xarope do Bordo: estudos em humanos e em modelo animal sobre o estresse oxidativo e o perfil inflamatório / Caroline Paula Mescka. -- 2015. 146 f.

Orientador: Carlos Severo Dutra Filho.

Coorientadora: Carmen Regla Vargas.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Doença da Urina do Xarope do Bordo. 2. Estresse Oxidativo. 3. Inflamação. 4. Antioxidantes. 5. L-carnitina. I. Dutra Filho, Carlos Severo, orient. II. Vargas, Carmen Regla, coorient. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**L-CARNITINA NO TRATAMENTO DA DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO  
BORDO: ESTUDOS EM HUMANOS E EM MODELO ANIMAL SOBRE O  
ESTRESSE OXIDATIVO E O PERFIL INFLAMATÓRIO**

**CAROLINE PAULA MESCKA**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho

Co-orientadora: Profa. Dr. Carmen Regla Vargas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas: Bioquímica da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como  
requisito parcial à obtenção do título de Doutor

Porto Alegre, 2015.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (Laboratório 34D) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Agradecimento especial ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), órgão financiador da bolsa de Doutorado e do projeto de pesquisa para o desenvolvimento deste trabalho.

*Aos meus pais, Paulo e Maristela, pelo  
exemplo e amor incondicional.  
Ao meu irmão, Guilherme, pelo  
companheirismo e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho, e a minha co-orientadora, Profa. Dra. Carmen Regla Vargas, por todo aprendizado e crescimento proporcionados e pelas orientações repletas de compreensão, carinho e amizade;

Aos professores Moacir Wajner e Clóvis Wannmacher, pelas sugestões, ensinamentos e amizade;

Ao Departamento de Bioquímica da UFRGS, em especial aos colegas do Grupo de Erros Inatos do Metabolismo e ao Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, principalmente aos colegas do Laboratório de Análise de Metabólitos (Angela e Daniella), que forneceram condições para a realização deste trabalho, estrutura e suporte necessários;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

Aos colegas, bolsistas e amigos do Laboratório 34D (Felipe, Gabriel, Laila, Priscila e Thales) e um agradecimento especial a minha amiga e irmã de coração Andrea Pereira Rosa;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Alana, Bruna, Camila, Carlos Eduardo, Carlos Alberto, Daiane, Desirrèe, Giovana, Gilian, Graziela, Heryk, Jéssica, Marion, Tatiane) pela união, ajuda e ótimos momentos de convívio;

Aos meus pais, Paulo e Maristela, irmãos (Cassiano, Alessânder e Guilherme) e cunhadas, Camile e Fabíola, pelo incentivo, apoio e carinho;

Ao Flávio por todo amor, momentos de alegria e carinho. Um agradecimento especial também a toda sua família;

Aos pacientes e as suas famílias que participaram deste estudo, meu sincero reconhecimento. Espero que este trabalho auxilie a ciência para proporcionar um futuro melhor;

A Deus, pela proteção.

# APRESENTAÇÃO

Conforme as normas do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, a presente tese de doutorado está organizada em três partes e os resultados estão apresentados na forma de artigo científico.

A parte 1 contém os Resumos, Lista de Abreviaturas, a Introdução e os Objetivos do trabalho.

A parte 2 aborda essencialmente os Materiais e Métodos e os Resultados do trabalho, sendo apresentada na forma de capítulos constituídos por artigos científicos publicados/submetidos em revistas internacionais indexadas. O capítulo 1 refere-se ao artigo intitulado “*Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro*”. O capítulo 2 trata do artigo intitulado “*L-carnitine supplementation decreases DNA damage in treated MSUD patients*”. O capítulo 3 refere-se ao artigo “*Investigation of inflammatory profile in MSUD patients: benefit of L-carnitine supplementation*”. O capítulo 4 reporta-se ao artigo intitulado “*Urinary biomarkers of oxidative damage in Maple Syrup Urine Disease: the L-carnitine role*” e por fim, o capítulo 5 refere-se ao artigo intitulado “*L-carnitine prevents oxidative stress in the brains of rats subjected to a chemically induced chronic model of MSUD*”.

A parte 3 constitui-se da interpretação dos resultados (Discussão), Conclusões, Perspectivas e Referências.

As sessões de Introdução, Discussão e Conclusão encontradas nesta tese apresentam interpretações e comentários gerais sobre os resultados presentes nos artigos científicos. As referências bibliográficas adicionais ao final desta tese representam as utilizadas apenas nas partes 1 e 3 deste trabalho.

# SUMÁRIO

## PARTE 1

Resumo.....	02
Abstract.....	04
Lista de Abreviaturas.....	06
INTRODUÇÃO .....	07
1.1. Erros inatos do metabolismo .....	07
1.2. Doença da Urina do Xarope do Bordo .....	08
1.3. Radicais Livres.....	21
1.4. Defesas Antioxidantes.....	22
1.4.1. Defesas Antioxidantes Enzimáticas.....	23
1.4.1.1. Superóxido Dismutase.....	23
1.4.1.2. Catalase.....	24
1.4.1.3. Glutathione Peroxidase.....	24
1.4.2. Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas.....	25
1.4.2.1. Glutathione.....	25
1.4.2.2. L-Carnitina.....	25
1.5. Estresse Oxidativo.....	27
1.5.1. Dano a lipídios .....	27
1.5.2. Dano a proteínas.....	28
1.5.3. Dano ao DNA.....	29
1.6. Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas.....	30
1.7. Estresse Oxidativo e MSUD.....	31
OBJETIVOS.....	33
2.1. Objetivo Geral.....	33
2.2. Objetivos Específicos.....	33



## **PARTE 2**

### **ARTIGO I**

*Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro*.....36

### **ARTIGO II**

*L-carnitine supplementation decreases DNA damage in treated MSUD patients*.....42

### **ARTIGO III**

*Investigation of inflammatory profile in MSUD patients: benefit of L-carnitine supplementation*.....48

### **ARTIGO IV**

*Urinary biomarkers of oxidative damage in Maple Syrup Urine Disease: the L-carnitine role*.....57

### **ARTIGO V**

*L-carnitine prevents oxidative stress in the brains of rats subjected to a chemically induced chronic model of MSUD* .....63

## **PARTE 3**

DISCUSSÃO.....96

CONCLUSÕES.....112

PERSPECTIVAS.....115

REFERÊNCIAS .....116

ANEXOS ..... 126



## **PARTE 1**

## RESUMO

A doença da urina do xarope do bordo (MSUD) é causada pela deficiência na atividade do complexo da desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKAD), promovendo o acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) leucina (Leu), isoleucina (Ile) e valina (Val) e seus  $\alpha$ -cetoácidos correspondentes (BCKA). A MSUD caracteriza-se por cetoacidose, ataxia, coma, retardo mental e psicomotor. Estudos em animais demonstraram que BCAA e BCKA estimulam a lipoperoxidação e reduzem capacidade antioxidante cerebral em ratos. Também há evidências de que o estresse oxidativo ocorra em pacientes com MSUD no diagnóstico e durante o tratamento e que devido à terapia com dieta restrita e hipoproteica eles possuam deficiência de L-carnitina (L-car), um importante composto para o metabolismo energético. Recentemente, estudos demonstraram o papel antioxidante e anti-inflamatório da L-car, através de sua ação antiperoxidativa, sequestradora de espécies reativas e efeito estabilizador de danos às membranas celulares. Considerando que a fisiopatologia da MSUD ainda é pouco compreendida e que existe um crescente número de estudos enfatizando o envolvimento do estresse oxidativo na doença, neste trabalho foi investigado o efeito *in vitro* e *in vivo* da L-car sobre o estresse oxidativo e o dano inflamatório na MSUD tendo como objetivos: A) estudar a indução ao dano oxidativo pelos metabólitos acumulados na MSUD, verificando o possível papel antioxidante da L-car sobre o dano ao DNA *in vitro*; B) avaliar o efeito *in vivo* da suplementação de 50 mg/kg/dia de L-car sobre: b.1) a indução do dano ao DNA em leucócitos de pacientes com a MSUD tratados com dieta de restrição proteica, correlacionando as concentrações dos principais metabólitos acumulados nesta doença e verificando o possível papel antioxidante da suplementação da L-car; b.2) a concentração de citocinas pró-inflamatórias em plasma de pacientes com MSUD tratados com dieta de restrição proteica e a correlação com o estresse oxidativo; b.3) os parâmetros de dano oxidativo à biomoléculas em urina de pacientes com MSUD sob dieta de restrição proteica; C) avaliar o efeito da L-car sobre o estresse oxidativo causado pelos metabólitos acumulados na MSUD em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar, através de um modelo crônico de indução química da doença. Verificou-se que a Leu e o seu  $\alpha$ -cetoácido correspondente, o ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico (KIC), causaram danos ao DNA *in vitro* e L-car foi capaz de diminuir significativamente essas alterações, principalmente as causadas pelo KIC. Quando testado o efeito da suplementação de L-car sobre o dano ao DNA em pacientes MSUD, observou-se um aumento significativo de lesões ao DNA em pacientes com dieta de restrição proteica quando comparados aos controles e a terapia com L-car foi capaz de diminuir significativamente os níveis desses danos. Também foram verificadas correlações do tipo negativa entre as concentrações de L-car e os índices de dano ao DNA e do tipo positiva entre as lesões ao DNA e níveis de MDA, marcador de lipoperoxidação, explicitando uma relação entre o dano ao DNA observado nos pacientes com MSUD, estresse oxidativo e o benefício da suplementação de L-car. Também averiguou-se o efeito da terapia de L-car sobre as citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e interferon gama (INF- $\gamma$ ). Constatou-se aumentos significativos de IL-1 $\beta$ , IL-6 e INF- $\gamma$  no plasma de pacientes com MSUD antes da suplementação de L-car e uma reversão completa desses valores aos níveis dos controles para IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$  após a administração de L-car. Ainda, verificou-se que a L-car pode auxiliar na defesa celular contra a inflamação e o estresse oxidativo, observando-se uma correlação negativa entre todas citocinas testadas e as concentrações de L-car, e uma correlação positiva entre o conteúdo de MDA e níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6. Constatou-se também que as medidas de di-tirosina (dano oxidativo a proteínas) e isoprostanos (dano de lipoperoxidação) estavam aumentadas e a capacidade antioxidante total diminuída na urina de pacientes com MSUD sem terapia com L-car e a suplementação deste

composto induziu efeitos benéficos sobre estes parâmetros, reduzindo os níveis de di-tirosina e isoprostanos e aumentando a capacidade antioxidante medida em urina. Foi também observado um aumento de KIC urinário após dois meses de tratamento com L-car, quando comparado com o grupo controle, demonstrando um incremento da excreção deste metabolito tóxico. Desta forma, esses resultados sugerem um efeito de reversão de dano oxidativo pela L-car e que a urina pode ser utilizada para monitorar este tipo de lesão em pacientes afetados pela MSUD. Por fim, foram analisados em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar submetidos ao modelo crônico de MSUD: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), para avaliar lipoperoxidação, conteúdo de carbonilas (dano oxidativo proteico), oxidação de diclorofluoresceína (DCF), para quantificar produção de espécies reativas teciduais, conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) que é um importante antioxidante não enzimático e a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD). Os resultados mostraram que a administração crônica de BCAA estimulou a lipoperoxidação, o dano oxidativo proteico, aumento de espécies reativas e diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, especialmente em córtex cerebral e o tratamento com L-car foi capaz de prevenir estes efeitos, exceto o dano oxidativo a proteínas. Em conjunto, estes resultados demonstram que os metabólitos acumulados na MSUD induzem dano oxidativo a biomoléculas (lipídios, proteínas e DNA), diminuem o *status* antioxidante e promovem aumento de processos inflamatórios. Ainda, estes dados podem contribuir para a compreensão dos mecanismos de ação dos efeitos citotóxicos dos metabólitos acumulados na MSUD e evidenciar o papel do estresse oxidativo e da inflamação na neuropatofisiologia desta doença, além do efeito protetor da L-car sobre este processo. O estudo de antioxidantes, como a L-car, pode propor uma abordagem terapêutica adicional ao que é empregado atualmente para pacientes com MSUD, que é essencialmente dietética e, portanto, de difícil manejo.

**Palavras-chave:** Doença da Urina do Xarope do Bordo, L-Carnitina, Estresse Oxidativo, Inflamação.

## ABSTRACT

Maple syrup urine disease (MSUD) is caused by deficiency of the activity of the mitochondrial enzyme complex branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase (BCKAD). The metabolic defect leads to accumulation of the branched chain amino acids (BCAA) leucine (Leu), isoleucine (Ile) and valine (Val) and the corresponding branched-chain  $\alpha$ -keto acids. The clinical features of MSUD include ketoacidosis, seizures, coma, psychomotor delay and mental retardation. Treatment consists in Leu, Val and Ile restricted diet. Studies in animals have demonstrated that lipid peroxidation is stimulated by BCAA and BCKA in brain of rats and these metabolites reduce *in vitro* and *in vivo* the cerebral capacity to modulate the damage associated to increased free radical production. Also, there is evidence that oxidative stress occurs in MSUD patients at diagnosis and during treatment and that due to therapy with protein restricted diet they present L-carnitine (L-car) deficiency, an important compound for energy metabolism. Recent studies have demonstrated the antioxidant and anti-inflammatory role of L-carnitine (L-car), through its action against peroxidation in different tissues by various mechanisms, a scavenger of reactive oxygen species and the stabilizing effect of damage to cell membranes. Considering that the pathophysiology of MSUD is still poorly understood, and that there is an increasing number of studies emphasizing the oxidative stress involvement in the disease, this study investigated the *in vitro* and *in vivo* effect of L-car on oxidative stress and inflammatory damage in MSUD with the following purposes: A) to study the induction of damage by accumulated metabolites in MSUD, analyzing the possible antioxidant role of L-car on DNA damage *in vitro*; B) to evaluate the *in vivo* effect of 50 mg/kg/day of L-car supplementation about: b.1) the induction of DNA damage in leukocytes of MSUD patients treated with protein-restricted diet, correlating this damage with the concentrations of the major metabolites accumulated in this disorder and checking the possible antioxidant role of L-car supplementation; b.2) plasma inflammatory cytokines in treated MSUD patients with protein-restricted diet and the correlation with oxidative stress; b.3) oxidative damage parameters in urine of MSUD patients with protein-restricted diet supplemented with L-car; C) to investigate the BCAA effect on some oxidative stress parameters and evaluate the L-car efficacy against these possible pro-oxidant effects in cerebral cortex and cerebellum of rats submitted to a chronic chemically-induced model of MSUD. DNA damage index (DI) showed that Leu and  $\alpha$ -ketoisocaproic acid (KIC) groups was significantly higher than that of the control group, and that L-car was able to significantly prevent this damage, especially that due to KIC. Accordingly, DNA DI in MSUD patients under BCAA-restricted diet was significantly increased as compared to controls and L-car supplementation was able to significantly decrease this parameter. It was also verified a significant positive correlation between DNA DI and MDA content, a marker of lipid peroxidation. Furthermore, we found an inverse significant correlation between DI and L-car levels. These results strengthen a relationship between DNA damage observed in MSUD patients, oxidative stress and the L-car supplementation benefit. The role of L-car on plasma inflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and interferon-gamma (INF- $\gamma$ ) was also evaluated in these patients. Significant increases of IL-1 $\beta$ , IL-6, and INF- $\gamma$  were observed before the treatment with L-car. Moreover, there is a negative correlation between all cytokines tested and L-car concentrations and a positive correlation among the MDA content and IL-1 $\beta$  and IL-6 values after L-car supplementation. It was also demonstrated that the oxidative stress parameters di-tyrosine (oxidative protein damage) and isoprostanes (lipid peroxidation assay) were increased and the antioxidant capacity was reduced in urine of MSUD patients without L-car therapy and that the supplementation of this compound induced beneficial effects on these parameters, so reducing the di-tyrosine and

isoprostanes levels and increasing the antioxidant capacity. It was also showed a significant increase in urinary KIC after 2 months of L-car treatment compared to control group, demonstrating an increased excretion of this toxic metabolite. In conclusion, these results suggest a reversion effect of the oxidative damage by L-car and that urine can be used to monitorize oxidative damage in patients affected by this disease. The following parameters were analysed in cerebral cortex and cerebellum of Wistar rats submitted to MSUD chemically-induced chronic model: thiobarbituric acid reactive species (TBA-RS), to evaluate lipid peroxidation, carbonyl content to evaluate protein oxidative damage, DCF oxidation to quantify reactive species production, reduced glutathione (GSH), an important non-enzymatic antioxidant and the activities of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). The results showed that the chronic administration of BCAA was able to promote both lipid and protein oxidation, increase of reactive species production and decreased brain antioxidant defenses, especially in cerebral cortex and that L-car was able to prevent these effects, except for oxidative damage to proteins. Taken together, these results demonstrate that the metabolites accumulated in MSUD cause oxidative damage to biomolecules (lipids, proteins and DNA), decrease antioxidant status and promote increased inflammatory processes. These results may contribute to the understanding of the mechanism of action of the cytotoxic effect of the metabolites accumulated in MSUD and the role of oxidative stress and inflammation in the MSUD neuropathophysiology besides the protective effect of L-car on this process. The study of antioxidants like L-car can opens an additional therapeutic approach to that currently employed for MSUD patients, which is primarily dietary and therefore difficult to handle.

**Keywords:** Maple Syrup Urine Disease, L-Carnitine, Oxidative Stress, Inflammation.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BCAA – do inglês *branched-chain amino acids*: Aminoácidos de cadeia ramificada
- BCKA – do inglês *branched-chain  $\alpha$ -keto acids*:  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada
- BCKAD – do inglês *branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex*: Complexo da desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada
- CAT – Catalase
- DCF- 2'7'-diclorofluoresceína
- DI - índice de dano
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- EIM – Erros inatos do metabolismo
- ROS – do inglês *reactive oxygen species*: Espécies reativas de oxigênio
- G6PD – Glicose-6-fosfato-desidrogenase
- GPx – Glutationa peroxidase
- GSH – Glutationa reduzida
- Ile – Isoleucina
- IL-1- Interleucina 1
- IL-6- Intereucina 6
- INF- $\gamma$ - interferon gama
- KIC – do inglês  *$\alpha$ -ketoisocaproic acid*: Ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico
- KMV – do inglês  *$\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvaleric acid*: Ácido  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalérico
- KIV – do inglês  *$\alpha$ -keto isovaleric acid*: Ácido  $\alpha$ -cetoisovalérico
- L-car – L-carnitina
- Leu - Leucina
- MDA – Malondialdeído
- MSUD – do inglês *Maple Syrup Urine Disease*: Doença da urina do xarope do bordo
- SOD – Superóxido dismutase
- TBA-RS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- Val – Valina



# INTRODUÇÃO

## 1.1) Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios genéticos que correspondem a um defeito parcial ou total de uma proteína, normalmente uma enzima, capaz de acarretar a interrupção de vias metabólicas. A ausência ou deficiência grave da atividade enzimática pode causar falhas na síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas no organismo, com ausência de um produto esperado, acúmulo de substratos da etapa anterior à interrompida ou, então, o desvio para rota(s) metabólica(s) alternativa(s) que pode comprometer processos celulares. Dependendo da importância da via afetada, este bloqueio repercute de forma clínica variável, geralmente provocando sintomatologia grave, que na maioria das vezes afeta o sistema nervoso central (Scriver et al., 2001).

O grande número de alterações genéticas acarreta quadros clínicos extremamente diversos, desde assintomáticos até os tão graves que implicam em morte neonatal. De uma maneira geral, os EIM possuem sintomatologia severa que se manifesta ainda durante a infância (Giugliani, 1998).

De acordo com o fenótipo clínico dos pacientes, Saudubray e Charpentier (2001) classificaram os EIM em três grandes grupos:

Grupo I: distúrbios de síntese ou catabolismo de moléculas complexas, como as doenças lisossômicas de depósito (doença de Fabry, doença de Gaucher, etc.);

Grupo II: doenças do metabolismo intermediário, como as aminoacidopatias (doença da urina do xarope do bordo, fenilcetonúria, etc.), as acidemias orgânicas (acidemia metilmalônica, acidemia propiônica, etc.), defeitos do ciclo da uréia (citrulinemia, argininemia, etc.), intolerância a açúcares (galactosemia, etc.);

Grupo III: distúrbios na utilização e produção de energia, como as doenças mitocondriais da cadeia respiratória.

Os erros inatos do metabolismo representam cerca de 10% de todos os distúrbios genéticos (Sanseverino et al., 2000). A incidência isolada de cada uma destas doenças metabólicas é pequena. No entanto, se forem contabilizados os cerca de 600 distúrbios conhecidos (Scriver et al., 2001) a frequência se torna mais expressiva, de aproximadamente 1/5000 nascidos vivos (Giugliani, 1998). Para a maioria dessas doenças, a prevenção da morte ou de sequelas neurológicas permanentes nos pacientes é dependente de um diagnóstico precoce e instituição de uma terapia adequada (Jimenez-Sanchez et al., 2001; Burton, 1998).

## **1.2) Doença da Urina do Xarope do Bordo**

Menkes e colaboradores, em 1954, reportaram quatro casos de uma doença neurodegenerativa caracterizada por edema cerebral, espasticidade, dificuldade respiratória e convulsões, com o aparecimento dos sintomas na primeira semana de vida e falecimento antes dos três meses de idade. Estes pacientes possuíam níveis aumentados dos aminoácidos de cadeia ramificada nos líquidos corpóreos e a urina apresentava um forte odor de xarope de bordo, cheiro adocicado, parecido com açúcar queimado ou caramelo. Esta nova síndrome foi chamada, então, de Doença de Urina do Xarope do Bordo (“Maple Syrup Urine Disease” - MSUD). Em 1959, Dancis e colaboradores identificaram que os compostos acumulados na MSUD eram os aminoácidos de cadeia ramificada e os seus correspondentes  $\alpha$ -cetoácidos, e, portanto, a doença também foi denominada cetoacidúria de cadeia ramificada. O mesmo grupo de pesquisa, em 1960, demonstrou em estudos enzimáticos em leucócitos e fibroblastos de pacientes afetados que o bloqueio metabólico na MSUD ocorria na descarboxilação dos  $\alpha$ -

cetoácidos de cadeia ramificada. O primeiro tratamento proposto foi em 1964 por Snyderman e colaboradores, que sugeriram uma dieta restrita em aminoácidos de cadeia ramificada.

Portanto, MSUD ou cetoacidúria de cadeia ramificada é um EIM causado por uma deficiência grave na atividade do complexo da desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (“Branched-Chain  $\alpha$ -Keto Acid Dehydrogenase”- BCKAD), como ilustrado na Figura 1.

A inabilidade deste complexo enzimático em descarboxilar os  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (“Branched-Chain  $\alpha$ -Keto Acids”- BCKA)  $\alpha$ -cetoisocapróico (“ $\alpha$ -Ketoisocaproic Acid”- KIC),  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalérico (“ $\alpha$ -Keto- $\beta$ -Methylvaleric Acid” - KMV) e  $\alpha$ -cetoisovalérico (“ $\alpha$ -Keto- $\beta$ -Methylvaleric Acid”- KIV) leva ao acúmulo tecidual desses metabólitos e de seus aminoácidos precursores de cadeia ramificada (“Branched Chain Amino Acids”- BCAA) leucina (Leu), isoleucina (Ile) e valina (Val) (Chuang e Shih, 2001; Treacy et al.,1992). Os derivados hidroxilados  $\alpha$ -hidróxi-isocapróico,  $\alpha$ -hidróxi- $\beta$ -metilvalérico e  $\alpha$ -hidroxivalérico, produzidos pela redução dos seus  $\alpha$ -cetoácidos também se acumulam, mas em menor extensão (Treacy et al.,1992).

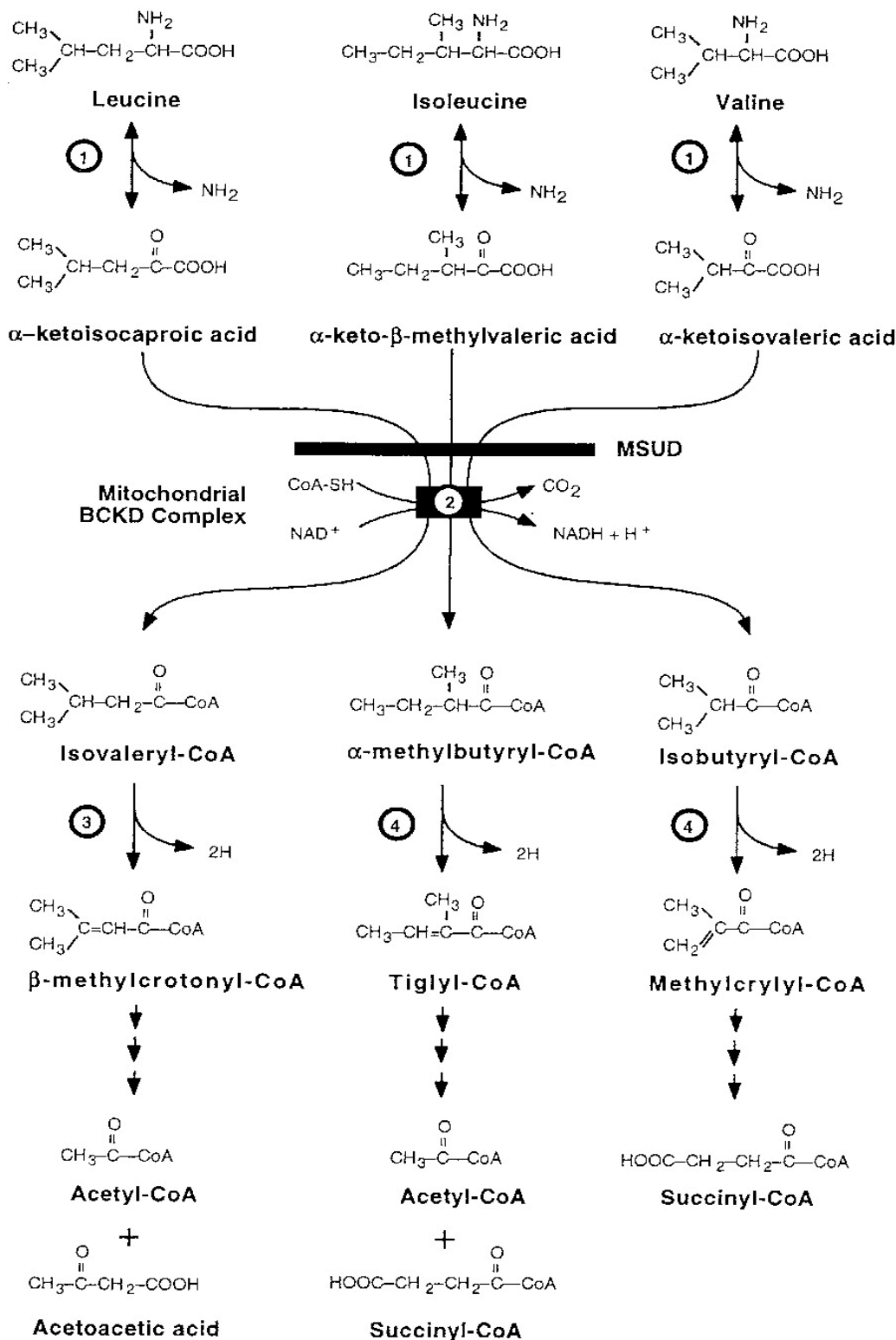


Figura 1. Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina (leucine), isoleucina (isoleucine) e valina (valine), indicando o bloqueio metabólico que ocorre na Doença da Urina do Xarope do Bordo (MSUD), situado no complexo da desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (Mitochondrial BCKD complex) (Adaptado de Scriver et al., 2001).

A MSUD é uma doença metabólica de caráter autossômico recessivo com uma frequência mundial estimada em aproximadamente 1 para cada 185.000 recém-nascidos vivos (Chuang e Shih, 2001). Embora a MSUD seja uma desordem rara, em alguns povos menonitas assentados na Pensilvânia e em algumas cidades dos Estados Unidos, a incidência estimada é de 1:200 nascidos vivos (Morton et al., 2002). No Brasil, a frequência da MSUD pode ser maior do que a literatura internacional comenta. Em um levantamento realizado em recém-nascidos brasileiros, foi estimada uma frequência aproximada de 1:84.000 (Jardim et al., 1995).

Quanto aos aspectos genéticos, a BCKAD humana é codificada por seis loci ( $E1\alpha$ ,  $E1\beta$ , E2, E3, BCKAD quinase e BCKAD fosfatase), sendo que mais de 90 mutações já foram descritas nas subunidades catalíticas deste complexo enzimático. A MSUD pode ser classificada em três subtipos, de acordo com o locus afetado: tipo IA (OMIM#608348) para mutações do gene BCKDHA (subunidade  $E1\alpha$ ); tipo IB (OMIM#248611) para as mutações observadas no gene BCKDHB (subunidade  $E1\beta$ ) e o tipo II (OMIM#248610) para mutações no gene DBT da subunidade E2 (Quental et al., 2008 a,b). As alterações genéticas que causam a deficiência enzimática do BCKAD podem ocorrer em qualquer um dos 3 genes, e como não há relato de uma mutação prevalente entre os pacientes MSUD, exceto em isolados genéticos em comunidades específicas, a abordagem molecular geralmente envolve a análise completa dos genes BCKDHA, BCKDHB e DBT.

Baseada na apresentação clínica, na atividade enzimática residual e na resposta bioquímica à administração de tiamina, os pacientes com MSUD podem ser divididos basicamente em cinco fenótipos clínicos e/ou bioquímicos: clássico, intermediário, intermitente, tiamina-responsivo e deficiente em lipoamida desidrogenase (E3). Para classificar a forma da doença é levada em consideração, principalmente, a idade do início dos sintomas e a gravidade clínica, como mostrado na Tabela 1 (Chuang e Shih, 2001).

Tabela 1 – Classificação fenotípica da Doença da Urina do Xarope do Bordo.

<b>Fenótipo Clínico</b>	<b>Idade de início</b>	<b>Principais sintomas clínicos</b>	<b>Características Bioquímicas</b>	<b>Leucina plasmática (μmol/L)</b>	<b>Atividade de descarboxilação (* % do normal)</b>
<b>Clássico</b>	Neonatal até o 1º ano	Dificuldade de alimentação, letargia, hipotonia, cetoacidose, convulsões, apnéia e hipoglicemia	Presença de proteínas do BCKAD e aloisoleucina	1000-5000	0-2
<b>Intermediário</b>	Infância à vida adulta	Ataxia progressiva, RDPM, retardo de crescimento e cetoacidose pouco frequente	Presença de proteínas do BCKAD e aloisoleucina	400-2000	3-30
<b>Intermitente</b>	Infância à vida adulta	Início do desenvolvimento normal. Ataxia e cetoacidose intermitentes	Proteínas do BCKAD presentes. Normal BCAA quando assintomáticos	50-4000	5-20
<b>Tiamina-responsiva</b>	Infância à vida adulta	Mais leve do que a forma clássica, similar a forma intermediária	Aumento da atividade do BCKAD com administração de tiamina	50-5000	2-40
<b>Deficiente em lipoamida desidrogenase (E3)</b>	Neonatal	Hipotonia com lesão progressiva do SNC. Usualmente sem sintomas neonatais	Moderado aumento de BCAA e BCKA. Aumento de α-cetoglutarato e piruvato.	400-600	0-25

\* Medido em leucócitos periféricos intactos, cultura de fibroblastos ou linfoblastos com [1-<sup>14</sup>C]- marcado e BCAA e BCKA como substrato. RDPM: retardo no desenvolvimento psicomotor (Adaptado de Jardim et al.,1995 e Chuang e Shih, 2001).

Os pacientes com a forma clássica, que representam cerca de 80% dos casos de MSUD, apresentam os primeiros sinais clínicos da doença entre o 4º e o 7º dia de vida (dependendo do grau de deficiência do complexo enzimático BCKAD e da quantidade de proteína ingerida), com odor de açúcar queimado na urina, cetacidose, hipoglicemia, opistótono, dificuldade de alimentação, apnéia, ataxia, convulsões, coma, letargia, deterioração neurológica, e geralmente morrem nos primeiros meses de vida se o tratamento não é instituído prontamente. (Chuang e Shih, 2001). Achados neuropatológicos característicos desta doença incluem edema e atrofia dos hemisférios cerebrais, degeneração espongiiforme da substância branca e desmielinização, principalmente durante as crises de descompensação metabólica (Chuang e Shih, 2001; Ogier de Baulny e Saudubray, 2002). Um aumento significativo na concentração dos BCAA e de seus correspondentes  $\alpha$ -cetoácidos e  $\alpha$ -hidroxiácidos no plasma, líquor e urina dos pacientes é uma característica bioquímica marcante desta doença, além da presença do aminoácido aloisoleucina. O odor característico de xarope do bordo inicia a partir de 12 horas de vida, e embora seja difícil a sua identificação nos primeiros dias, torna-se mais aparente quando a urina seca na fralda ou roupa do paciente e também nas crises de descompensação metabólica. A atividade do BCKAD em fibroblastos ou cultura de linfócitos é usualmente menor que 2%, resultando em concentrações de Leu superiores a 2000  $\mu\text{mol/L}$ . A maioria dos pacientes clássicos, quando não tratados, morrem nos primeiros meses de vida devido à deterioração neurológica e crises metabólicas agudas (Chuang e Shih, 2001; Morton et al., 2002).

As outras variantes são caracterizadas por um fenótipo mais brando, normalmente sem manifestações agudas no período neonatal e com um menor acúmulo dos metabólitos característicos. Entretanto, os pacientes afetados usualmente exibem variados graus de atraso neuropsicomotor e retardo mental (Chuang e Shih, 2001).

Os pacientes com a forma intermediária não apresentam sintomas no período neonatal, porém, possuem concentrações elevadas de BCAA (menores que na forma clássica), comprometimento neurológico e descompensação metabólica que pode levar ao óbito. A atividade residual do BCKAD é um pouco maior que na sintomatologia clássica, variando de 3 a 30%. Pelo fato de muitos pacientes não apresentarem crises de descompensação metabólica aguda, normalmente são diagnosticados entre 5 meses e 7 anos de idade em decorrência do atraso no desenvolvimento neuropsicomotor acompanhado de cetoacidose e rara encefalopatia aguda (Chuang e Shih, 2001).

A forma intermitente não apresenta desenvolvimento psicomotor afetado e normalmente os pacientes são diagnosticados entre 5 meses e 2 anos de idade após crises de descompensações metabólicas ocasionadas por situações de estresse e/ou infecções, o que pode acarretar o desenvolvimento de características clínicas e bioquímicas semelhantes à forma clássica. A atividade do BCKAD varia de 5 a 20% e os pacientes assintomáticos possuem valores de BCAA dentro da faixa da normalidade ou com discretas elevações (Chuang e Shih, 2001).

Os pacientes com fenótipo responsivo à tiamina não exibem doença neonatal aguda e as manifestações clínicas se assemelham às da forma intermediária, com atraso no desenvolvimento psicomotor. As concentrações dos BCAA chegam a ser 5 vezes maiores que o normal e podem ser reduzidas drasticamente com doses de 10 a 1000 mg/dia de tiamina e dieta hipoproteica. A atividade do complexo varia de 2 a 40% comparada à normal (Chuang e Shih, 2001).

A deficiência de lipoamida desidrogenase (E3-deficiente) é a forma mais rara, com sintomatologia clínica semelhante à da forma intermediária, além de atraso no desenvolvimento psicomotor e acidose láctica. Os pacientes apresentam uma deficiência residual na atividade do BCKAD de 0 a 25% comparada ao normal, concomitantemente com



um aumento de piruvato,  $\alpha$ -cetogluturato e BCAA. Os pacientes com este fenótipo são diagnosticados entre 8 semanas e 2 anos de idade com acidose láctica persistente, acompanhada de hipotonia e deterioração neurológica progressiva. O tratamento consiste de dieta com restrição proteica e lipídica adicionada de doses farmacológicas de biotina, tiamina e ácido lipóico (Chuang e Shih, 2001).

A atividade do BCKAD é o passo-chave irreversível da via catabólica dos BCAA e regula o fluxo destes aminoácidos para produção de energia. O BCKAD está localizado na membrana interna mitocondrial das células de mamíferos e se divide em três sítios catalíticos, ilustrados na Figura 2: E1, uma descarboxilase de  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada heterotetramérica ( $\alpha_2\beta_2$ ); E2, uma dihidrolipoil transacilase com 24 subunidades idênticas; e E3, uma di-hidrolipoamida desidrogenase homodimérica. Os sítios catalíticos E1 e E2 são específicos para BCKAD, enquanto que o componente E3 faz parte dos complexos  $\alpha$ -cetogluturato e piruvato desidrogenase. Além disso, este complexo possui duas enzimas reguladoras: uma quinase da desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada, que através de fosforilação de uma subunidade do complexo E1 é capaz de inativar o BCKD e uma fosfatase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada, apta para defosforilação da proteína E1 e ativação do complexo enzimático (Peinemann e Danner, 1994; Chuang, 1998; Chuang e Shih, 2001).

O catabolismo dos BCAA inicia-se pela ação de uma aminotransferase de cadeia ramificada que os transamina reversivelmente em  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada, que por sua vez, são translocados por um sistema L de transporte não dependente de sódio para o interior da mitocôndria. Nesta organela, os BCKA são descarboxilados oxidativamente de forma irreversível pelo complexo multienzimático BCKAD. Esta reação produz, por fim, acil CoAs de cadeia ramificada respectivos a cada aminoácido: acetil-CoA e acetoacetato resultantes do catabolismo da leucina; acetil-CoA e succinil-CoA da isoleucina e succinil-

CoA respectivo do metabolismo da valina, além de  $\text{CO}_2$  e NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) na proporção de 1:1:1 (Chuang e Shih, 2001; Danner et al., 1979). Desta forma, os BCAA são considerados tanto cetogênicos quanto glicogênicos, pois seus produtos catabólicos são utilizados como substratos para a síntese de colesterol e ácidos graxos e para produção energética, via succinil-CoA e acetoacetato (Chuang e Shih, 2001).

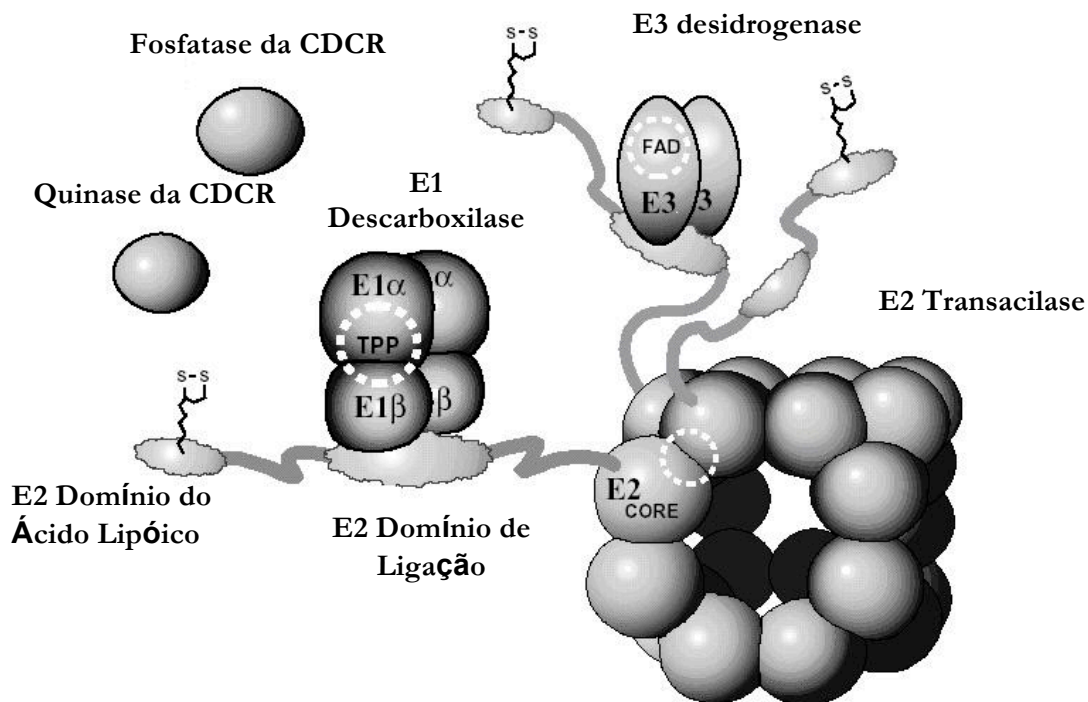


Figura 2. Subunidades do complexo da desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKAD), que se divide em três sítios catalíticos: E1, descarboxilase de  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada; E2, di-hidrolipoil transacilase; E3, di-hidrolipoamida desidrogenase. Os sítios ativos ou de ligação ao cofator em cada componente da enzima estão circulos em branco (Adaptado de Chuang, 1998).

O diagnóstico é feito pela dosagem dos BCAA em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência e/ou por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa para a determinação na urina de altos níveis de BCKA. Outro achado característico da doença, principalmente em pacientes com a forma clássica que sofreram crises metabólicas severas, é a presença do aminoácido aloisoleucina, que possui uma metabolização lenta, o qual é decorrente da racemização da isoleucina. Este aminoácido, embora não esteja apenas

correlacionado com a MSUD, é patognomômico da doença, já que é indetectável no plasma de indivíduos saudáveis devido à presença de interferentes e à sua baixa concentração. Altos níveis plasmáticos de aloisoleucina persistem por vários dias após episódios de crises de descompensação metabólica, sendo permanentemente detectável nos pacientes com a forma clássica da doença (Chuang e Shih, 2001).

Enquanto os aminoácidos Val e Ile encontram-se em concentrações plasmáticas de até 1 mM no momento do diagnóstico, o aminoácido Leu pode alcançar concentrações plasmáticas de até 5 mM, sendo a sua dosagem quantitativa fundamental para o diagnóstico e acompanhamento do tratamento (Bremer et al., 1981). Além disso, foi observado que estes metabólitos podem chegar a concentrações de 1 mM no líquido cefalorraquidiano (Shigematsu et al., 1983). A espectrometria de massa em *Tandem* em sangue total impregnado em papel filtro tem sido cada vez mais utilizada na triagem da doença no período neonatal, permitindo o diagnóstico da MSUD já nos primeiros dias de nascimento, quando os pacientes ainda são assintomáticos ou apresentam poucas manifestações clínicas. Este método possui alta sensibilidade e especificidade, contudo, apresenta um custo mais elevado e é bastante empregado em países desenvolvidos, onde se realiza a triagem neonatal expandida (Simon et al., 2006).

O diagnóstico confirmatório da MSUD é realizado através da medida da atividade da BCKAD em leucócitos periféricos, cultura de linfoblastos ou fibroblastos dos pacientes e biópsia hepática (Peinemann e Danner, 1994; Chuang e Shih, 2001).

O teste do pezinho para MSUD não é fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Além disso, os testes para confirmação do diagnóstico e monitoramento dos níveis de BCAA são realizados por laboratórios privados, ou em poucos hospitais universitários com verbas de projeto de pesquisa. O Laboratório para Diagnóstico de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre constitui um centro de

referência nacional para o diagnóstico da MSUD, disponibilizando a análise quantitativa de aminoácidos por HPLC ou auto-analisador, e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) (Herber et al., 2014).

Exames complementares são necessários para definir o grau de envolvimento neurológico e definição do prognóstico. Estas pesquisas são realizadas caso a caso, mas geralmente incluem: ressonância magnética nuclear do encéfalo, tomografia do crânio, eletroencefalograma, avaliação oftalmológica e auditiva, além de exames laboratoriais gerais (Herber et al., 2014).

O tratamento preconizado para a doença é para toda a vida e consiste em uma dieta hipercalórica com restrição na ingestão de proteínas, utilizando fórmulas específicas contendo aminoácidos essenciais, exceto aqueles acumulados na MSUD, além de vitaminas e minerais. Essencialmente, a terapêutica da MSUD visa restaurar a homeostase do metabolismo intermediário e evitar a descompensação metabólica através da manutenção da síntese proteica normal e prevenção do catabolismo proteico, da prevenção de desequilíbrios ou deficiências de aminoácidos e intermediários metabólicos, da atenuação da disfunção celular, da restauração da homeostase energética e da promoção do anabolismo. O tratamento deve ser iniciado o mais cedo possível, ainda no período neonatal. Dessa forma, objetiva-se normalizar as concentrações de BCAA, sem prejudicar o desenvolvimento dos pacientes, principalmente o neuronal (Chuang e Shih, 2001; Snyderman et al., 1964). Para detecção dos pacientes pertencentes ao fenótipo responsivo à tiamina, é administrada tiamina (50-300 mg/dia) nas três primeiras semanas de início do tratamento. É importante ressaltar que uma intoxicação metabólica aguda e deterioração neurológica podem se desenvolver em qualquer idade, com riscos de graves complicações ao sistema nervoso central. Portanto, um diagnóstico precoce, antes dos 15 dias de vida, e um tratamento efetivo são cruciais para o desenvolvimento e a sobrevivência destes pacientes, já que os danos neurológicos causados pelo acúmulo dos

metabólitos envolvidos na MSUD são irreversíveis e podem levar à morte nos primeiros meses de vida (Chuang e Shih, 2001). Outra opção terapêutica proposta recentemente é o transplante hepático, no entanto a experiência prática é muito limitada e necessita de maiores estudos.

A expectativa de vida dos pacientes MSUD vem melhorando ao longo dos anos, no entanto o diagnóstico precoce e a aderência a um tratamento adequado são determinantes, principalmente em crises de descompensação metabólica. Dados da literatura relatam que um terço dos pacientes diagnosticados tem desenvolvimento psicomotor normal. Destes, a maioria iniciou o tratamento antes dos 10 dias de vida (Serra et al., 2010).

Quanto aos achados neuropatológicos, na maioria dos pacientes MSUD observa-se encefalopatia com edema cerebral generalizado, formação de intumescência envolvendo o tronco cerebral dorsal, os pedúnculos cerebrais e a cápsula interna. Estudos relatam também a ocorrência de hipodensidade difusa no globo pálido e tálamo afetando a substância branca destas regiões, o que é um indicativo de hipomielinização (Treacy et al., 1992). Paralela à deficiência de mielina, observa-se redução de oligodendrócitos e nos núcleos da base e substância negra verifica-se perda neuronal considerável (Chuang e Shih, 2001).

Alterações comportamentais também são atribuídas ao acúmulo de BCAA e BCKA. Foi demonstrado que ocorrem distúrbios no perfil neurocognitivo de pacientes com MSUD, com déficit no raciocínio não-verbal e visual-espacial. Além das alterações neurocognitivas, estudos constataram que pacientes MSUD na idade adulta apresentam uma elevada taxa de distúrbios neuropsiquiátricos, como transtorno de déficit de atenção, depressão e ansiedade (Walsh e Scott, 2010). Muelly e colaboradores (2013) evidenciaram que as deficiências neuroquímicas previamente demonstradas em pacientes com MSUD e em modelos animais podem persistir no estado crônico, embora em menor grau, e cumulativamente, contribuir para a morbidade neuropsiquiátrica.

Os mecanismos neurotóxicos responsáveis pelas sequelas neurológicas na MSUD ainda não estão completamente esclarecidos. Tashian (1961) demonstrou que o KIC, KIV e Leu inibem competitivamente a atividade da enzima glutamato descarboxilase em homogeneizado de cérebro de ratos. Além disso, foi evidenciado que um excesso de KIC ocasiona uma diminuição de 50% do conteúdo de glutamato em astrócitos, aumentando sua velocidade de oxidação através da transferência do grupamento amino do glutamato para o KIC levando à formação de Leu e  $\alpha$ -cetoglutarato que é posteriormente oxidado no ciclo de Krebs (Zielke et al., 1997). Além do aumento da velocidade de oxidação do glutamato, níveis elevados de KIC e BCAA são capazes de diminuir a captação de glutamato por vesículas sinápticas em cérebro de ratos (Tavares et al., 2000) e também aumentam a oxidação e diminuem a síntese de glutamina em cultura de astrócitos (Youdkoff et al., 1994). Outros estudos demonstram que a elevação sérica de Leu e KIC no espaço extracelular altera a concentração cerebral dos aminoácidos transferidos pelo transportador de aminoácidos neutros de cadeia longa (sistema L), afetando a biossíntese de neurotransmissores como a serotonina e as catecolaminas (Wajner et al., 2000; Tavares et al., 2000; Zielke et al., 1997). Jouvret et al. (2000) verificaram um aumento de apoptose em fibroblastos de pacientes com MSUD pela presença de elevados níveis de BCAA e BCKA. Outros estudos revelaram um efeito inibitório dos metabólitos acumulados na doença sobre a cadeia respiratória com consequente déficit energético no tecido neuronal (Chuang e Shih, 2001; Sgaravatti et al., 2003; Ribeiro et al., 2008). Scaini et al. (2013a) demonstraram que a administração crônica de BCAA prejudica a memória espacial e aumenta o fator neurotrófico cerebral em modelo animal de MSUD. Além disso, o mesmo grupo de pesquisa evidenciou que a administração de BCAA em ratos diminui o fator de crescimento nervoso em hipocampo (Scaini et al., 2013b) e aumenta a razão Pro-BDNF/BDNF-Total cerebral (Scaini et al., 2015). Desta forma, Leu e/ou seu cetoácido (KIC) são considerados os principais metabólitos neurotóxicos na MSUD,

já que o aumento da concentração plasmática destes compostos está associado com o aparecimento de sintomas neurológicos (Chuang e Shih, 2001; Snyderman et al., 1964).

### 1.3) Radicais Livres

Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existência independente contendo um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica. Este desemparelhamento eletrônico confere uma situação energeticamente instável, o que caracteriza a alta reatividade dessas espécies. Os radicais livres podem ser formados pela perda ou pelo ganho de um elétron por um não-radical ou então por processos de fissão homolítica (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, pelo menos 95% do oxigênio molecular ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente, com aceitação de 4 elétrons, resultando na formação de duas moléculas de água ( $H_2O$ ). Porém, durante esse processo são produzidos intermediários reativos na respiração mitocondrial, como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Figura 3). Outras fontes importantes de espécies reativas de oxigênio (ROS) são as membranas nucleares e plasmáticas, o retículo endoplasmático e algumas substâncias encontradas no citosol (Halliwell e Gutteridge, 2007). É importante enfatizar que em processos patológicos a formação destas espécies reativas pode ser exacerbada (Zablocka e Janusz, 2008).

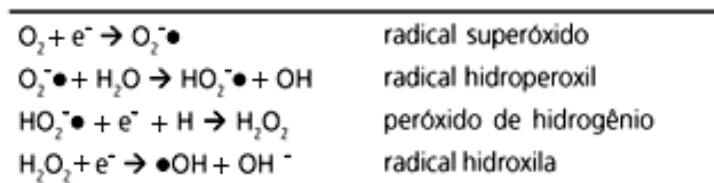


Figura 3. Espécies reativas de oxigênio: radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroperoxil ( $HO_2^{\cdot}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ).

O  $O_2^-$  (formado durante a respiração celular, em reações de auto-oxidação e por certas enzimas) é bastante reativo. Apesar de o  $O_2^-$  contribuir para a eliminação de microorganismos e não gerar diretamente danos a biomoléculas, outras ROS são geradas rapidamente a partir deste precursor. Duas moléculas de  $O_2^-$  são reduzidas a  $H_2O_2$  por dismutação espontânea e/ou ação catalítica da enzima superóxido dismutase. O  $OH\cdot$ , o mais reativo, é gerado pela reação de  $H_2O_2$  com íons  $Cu^+$  ou  $Fe^{2+}$ . O  $O_2$  pode, por sua vez, ser eletronicamente excitado a oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ), o qual é também gerado a partir dos radicais  $O_2^-$  e  $OH\cdot$ . O  $^1O_2$  é uma forma especialmente reativa do oxigênio capaz de oxidar diversas moléculas, incluindo os lipídios de membrana (Halliwell, 2004).

Assim, as ROS incluem não apenas os radicais formados pela redução do  $O_2$  ( $O_2^-$  e  $OH\cdot$ ), mas também alguns não-radicaais derivados do oxigênio, como o  $H_2O_2$ , o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) e o ozônio ( $O_3$ ) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

As ROS são produzidas em processos fisiológicos, como na defesa do hospedeiro contra uma infecção, na destruição de microorganismos pelos fagócitos e na liberação de espécies tóxicas oxidantes por neutrófilos. O desequilíbrio entre os sistemas de produção e os de remoção dessas espécies é que pode resultar em conseqüências patológicas, como a oxidação de moléculas biológicas incluindo proteínas, lipídios e DNA (Maxwell, 1995).

#### **1.4) Defesas Antioxidantes**

Em condições saudáveis, a produção de espécies reativas, além de outros oxidantes, é eficientemente balanceada pelos sistemas de defesa antioxidantes do organismo. Assim, os sistemas de reparo são essenciais para prevenir o acúmulo de biomoléculas danificadas oxidativamente (Halliwell e Gutteridge, 2007). Os seres vivos dispõem desses mecanismos protetores, que agem de maneira tanto independente quanto cooperativa, para retardar e/ou



prevenir o acúmulo e a atuação de espécies reativas e seus efeitos deletérios. Embora diferindo de tecido para tecido em sua composição, as defesas antioxidantes compreendem:

- agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase, entre outras;
- proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo), como as transferrinas e haptoglobinas;
- agentes de baixo peso molecular, tanto lipofílicos (bioflavonóides, tocoferóis, carotenóides) quanto hidrofílicos (glutathiona, ácido ascórbico, carnitina) que sequestram espécies reativas (Halliwell, 2006, 2007).

#### **1.4.1) Defesas antioxidantes enzimáticas**

##### **1.4.1.1) Superóxido Dismutase (SOD)**

A SOD catalisa a dismutação de dois radicais  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Figura 4), atuando, desta forma, como *scavenger* (sequestradora) de íons  $O_2^{\cdot-}$  (Fridovich, 1995; Halliwell e Gutteridge, 2007). A SOD exerce uma defesa primária ao estresse oxidativo, já que o  $O_2^{\cdot-}$  é um forte iniciador de reações em cadeia.

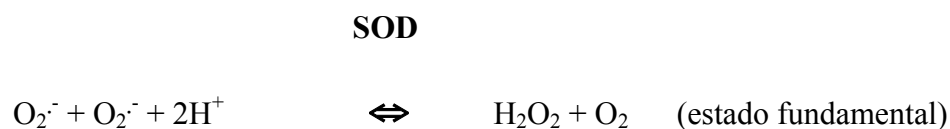


Figura 4. Reação de dismutação do íon superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2007).

Existem três tipos de superóxido dismutase: SOD contendo cobre e zinco (CuZnSOD) presente em praticamente todas as células eucarióticas; SOD contendo manganês (MnSOD), localizada principalmente nas mitocôndrias de tecidos animais; e a SOD contendo ferro (FeSOD), encontrada em procariotos (Fridovich, 1975).

#### 1.4.1.2) Catalase (CAT)

A CAT é uma hemoproteína que catalisa diretamente a decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao oxigênio no estado fundamental (Figura 5). O mecanismo de reação da CAT é, essencialmente uma decomposição; duas moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são reduzidas a duas moléculas de H<sub>2</sub>O e a uma de O<sub>2</sub> (Chance, 1979; Halliwell e Gutteridge, 2007).

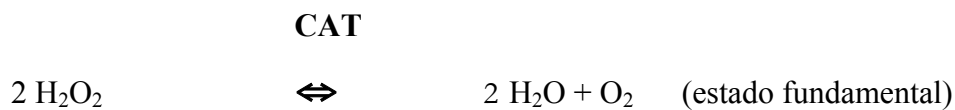


Figura 5. Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a oxigênio no estado fundamental (O<sub>2</sub>), catalisada pela CAT (Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2007).

A atividade da CAT de tecidos animais e vegetais está principalmente localizada em peroxissomas, mas também são encontradas em menor quantidade no citosol e nas frações mitocondriais das células (Chance, 1979).

#### 1.4.1.3) Glutathione Peroxidase (GPx)

Esta enzima remove o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peróxidos orgânicos (LOOH) para seus álcoois correspondentes (LOH) pelo acoplamento de sua redução a H<sub>2</sub>O com a oxidação da glutathione reduzida (GSH). O grupo sulfidril da GSH atua como doador de elétrons e é oxidado para a forma glutathione oxidada (GSSG) (Wendel, 1981) (Figura 6).

A GPx está presente em animais, plantas e muitas bactérias aeróbias, em concentrações intracelulares que estão freqüentemente na faixa de milimolar (Halliwell e Gutteridge, 2007). Existem dois tipos de GPx: uma que utiliza selênio como cofator (observada no citosol e na mitocôndria); e outra que não é dependente de selênio (encontrada

no citosol, responsável pela metabolização de hidroperóxidos orgânicos) (Wendel, 1981; Halliwell e Gutteridge, 2007).



Figura 6. Reação de redução de peróxidos (LOOH) a alcoóis (LOH), catalisada pela GPx (Adaptado de Halliwell e Gutteridge 2007).

## **1.4.2) Defesas antioxidantes não-enzimáticas**

### **1.4.2.1) Glutationa (GSH)**

A GSH, um tripeptídeo formado por resíduos de glutamato, cisteína e glicina, é o principal tiol intracelular de baixo peso molecular presente nas células. É um antioxidante endógeno que atua sinergicamente com o  $\alpha$ -tocoferol e o ácido ascórbico, sendo fundamental para mantê-los nas suas formas reduzidas, e que desempenha um papel de cofator enzimático, particularmente importante na reação catalisada pela GPx. Além disso, executa outras funções como a proteção de grupos sulfidrílicos (-SH) de proteínas contra oxidação e a manutenção da comunicação intercelular, além de servir como uma forma atóxica de depósito e armazenamento de cisteína (Rani e Panneerselvam, 2002).

### **1.4.2.2) L-Carnitina (L-car)**

A L-car [L-3-hidroxi-4-N,N,N-trimetilaminobutirato] (Figura 7) é uma pequena amina primária altamente polar, de fonte essencialmente exógena (oriunda de alimentos como carnes, ovos, peixes e leite), com importante papel fisiológico por facilitar o transporte mitocondrial de ácidos graxos de cadeia longa para a  $\beta$ -oxidação e posterior síntese de energia a partir de ATP (Agarwal e Said, 2004).

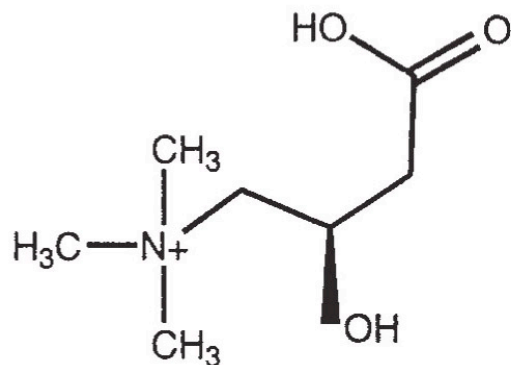


Figura 7. Estrutura química da L-carnitina (L-car).

Esta substância é também capaz de se conjugar e aumentar a excreção dos ácidos orgânicos acumulados em algumas doenças metabólicas, através da ação da enzima carnitina aciltransferase, que catalisa a formação de ésteres de carnitina. Devido à sua interação em diversos processos bioenergéticos, a L-car assume especial importância em doenças associadas com comprometimento metabólico e a deficiência desse composto pode provocar efeitos deletérios sobre o sistema nervoso central (Hoppel, 2003). Nos últimos anos muitos estudos têm demonstrado o papel antioxidante e antirradicais deste composto, através da sua ação contra peroxidação, pelo efeito “scavenger” em ROS e pelo efeito estabilizador de danos em membranas celulares (Izgut-Uysal et al., 2001; Gulcin, 2006; Lee et al., 2014; Wu et al., 2014). Sitta e colaboradores (2009) sugeriram que o estresse oxidativo observado em pacientes fenilcetonúricos tratados com dieta hipoproteica pode estar associado ao decréscimo nas concentrações de L-car nos mesmos, sendo portanto, interessante a suplementação dietética deste composto. Da mesma forma, Ribas et al., (2010 a e b) verificaram efeitos benéficos do tratamento com L-car sobre o dano a lipídios, a proteínas e ao DNA em pacientes com desordens do metabolismo do propionato. Em um modelo de indução química aguda da MSUD, Mescka et al. (2011) observaram um aumento do *status* antioxidante com a administração de L-car em córtex cerebral de ratos jovens. Além disso, Mescka et al. (2013) demonstraram que pacientes MSUD possuem deficiência de L-car e que após dois meses de

suplementação (50 mg/kg/dia) houve o restabelecimento desses níveis a valores normais e uma diminuição dos valores de lipoperoxidação no plasma dos pacientes suplementados com este composto.

### **1.5) Estresse Oxidativo**

Em condições saudáveis, a produção de ROS além de outras espécies reativas, é eficientemente balanceada pelos sistemas de defesa antioxidantes do organismo. Assim, os sistemas de reparo são essenciais para prevenir o acúmulo de biomoléculas danificadas oxidativamente (Halliwell, 2007).

Assim, o termo “Estresse Oxidativo” é usado para referir-se à situação de desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante, tanto por uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de fatores oxidantes. O estresse oxidativo pode resultar em adaptação das células por *up regulation*, injúria celular e morte por apoptose ou necrose (Halliwell, 2006). A seguir serão destacados processos de dano às biomoléculas:

#### **1.5.1) Dano a lipídios**

A lipoperoxidação trata-se de um processo no qual ocorre a oxidação das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, incluindo aquelas que compõem a membrana das células ou organelas, devido à ação dos radicais livres. Como consequência, suscedem-se transtornos nas funções exercidas pela membrana plasmática, extravasamento do conteúdo de certas organelas (como as enzimas lisossomais) e a formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído e o 4-hidroxinonenal), culminando em morte celular (Ferreira e Matsubara, 1997).

A lipoperoxidação é representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação e pode ser catalisada, por exemplo, por íons ferro (Figura 8).

Os efeitos da lipoperoxidação sobre as membranas podem ser divididos em três tipos:

- Mudanças no microambiente lipídico;
- Alteração da permeabilidade, por formação de novos canais de membrana;
- Inativação irreversível de proteínas e lipídios por formação de ligações cruzadas.

Ainda, pode ocorrer a perda de propriedades funcionais da membrana por oxidação de grupamentos sulfidrila nos sítios ativos de enzimas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

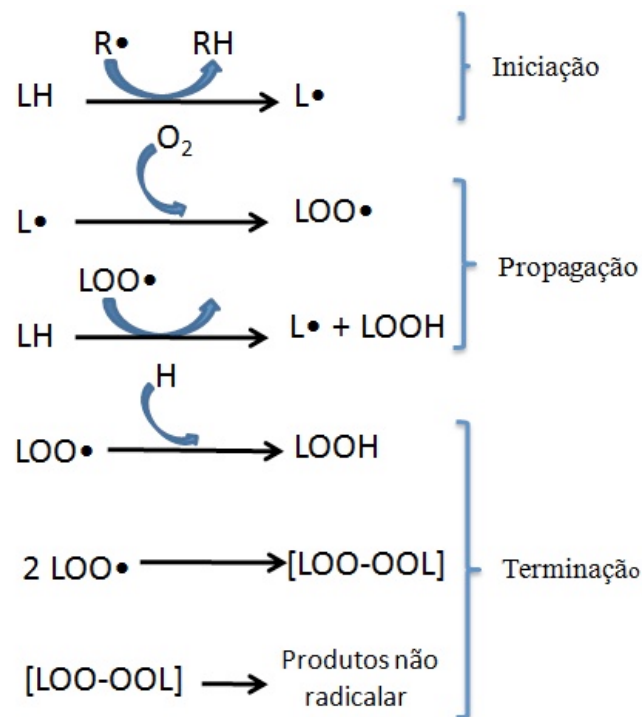


Figura 8. Reações de iniciação, propagação e terminação da lipoperoxidação (Adaptado de Ferreira e Matsubara, 1997).

### 1.5.2) Dano a Proteínas

As cadeias laterais de resíduos de aminoácidos das proteínas, em particular resíduos de cisteína e metionina são sensíveis à oxidação pela ação da ROS (Stadtman, 2004). O uso de

biomarcadores de estresse oxidativo em proteínas, como a medida de grupamentos sulfidrilas e de carbonilas, tem algumas vantagens em comparação à dosagem de outros produtos de oxidação proteica em função da rápida detecção e formação, e, no caso das proteínas carboniladas, sua relativa estabilidade. A maioria dos ensaios para detecção de grupos de proteínas carboniladas, metodologia mais empregada para análise deste tipo de dano, envolve derivatização do grupo carbonila com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), levando à formação de uma dinitrofenil-hidrazona correspondente. Assim, os grupamentos carbonila podem ser detectados por vários meios, como o espectrofotométrico, o enzima imunoenensaio (ELISA) e a eletroforese unidimensional ou bidimensional seguida por Western blot (Dalle-Donne et al., 2006).

### **1.5.3) Dano ao ácido desoxirribonucléico (DNA)**

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem levar ao dano ao DNA por ataque químico direto a esta biomolécula ou por mecanismos indiretos, como a ativação de endonucleases  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes como consequência do aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  livre intracelular, e interferências em enzimas de replicação e de reparo ao DNA. O  $\text{OH}\cdot$  é conhecido por reagir com todos os componentes da molécula de DNA, danificando tanto bases purínicas e pirimidínicas e também o esqueleto de desoxirribose. O DNA é particularmente suscetível à oxidação, com consequentes quebras em sua estrutura (simples ou duplas), danos alcalilábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão. Assim, danos ao DNA são frequentemente observados em células submetidas ao estresse oxidativo que podem ser provocado pelos seguintes métodos:

- a) exposição à radiação ionizante, elevadas concentrações de  $\text{O}_2$ , células fagocíticas ativadas, fumaça de cigarro e ozônio;
- b) adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxinitrito, ácido nitroso, hidroperóxidos orgânicos;

- c) exposição a agentes químicos auto-oxidantes: dopamina, L-DOPA, noradrenalina, adrenalina;
- d) exposição à xantina oxidase e seus substratos;
- e) adição de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).

Os produtos decorrentes destas reações podem provocar mutações, microsátélites instáveis, perda de heterozigidade, aberrações cromossômicas, citotoxicidade e crescimentos neoplásicos. Modificações permanentes no material genético resultante destes incidentes oxidativos representam o primeiro passo envolvido na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (Halliwell e Gutteridge, 2007).

#### **1.6) Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas**

Todos os organismos aeróbios estão expostos ao dano oxidativo. O sistema nervoso é, entretanto, mais suscetível em relação aos outros tecidos, devido ao alto consumo de oxigênio (já que utiliza uma grande quantidade de O<sub>2</sub> em uma massa relativamente pequena), a elevada concentração de lipídios poliinsaturados na sua composição, a deficiência de mecanismos de proteção contra as ROS e ao grande conteúdo de ferro que favorecem a lipoperoxidação em determinadas áreas cerebrais (Halliwell e Gutteridge, 2007). Além disso, a morte celular ou a alteração do gradiente iônico normal podem elevar consideravelmente a liberação de glutamato, levando ao aumento excessivo de Ca<sup>2+</sup> livre intracelular e Na<sup>+</sup> em neurônios adjacentes resultando em alta produção de ROS (Reznick e Packer, 1993).

Os radicais livres e o estresse oxidativo estão sendo gradativamente mais reconhecidos como fatores importantes na fisiopatologia de muitas doenças humanas e têm sido relacionados à patogênese de várias desordens que afetam o sistema nervoso como doenças



cerebrovasculares, epilepsia, esclerose lateral amiotrófica, desordens neurodegenerativas (doenças de Huntington, Alzheimer e Parkinson), desmielinização e demência, entre outras (Halliwell e Gutteridge, 2007; Delanty e Dichter, 1998; Salminen e Paul, 2014; Mena et al., 2015). Como várias disfunções neurológicas observadas nestas desordens também estão presentes em pacientes com EIM, pode-se supor que haja uma relação entre o estresse oxidativo e os danos cerebrais observados nestas doenças. Neste sentido, diversos estudos já revelaram que estresse oxidativo está aumentado em EIM como acidemias orgânicas, aminoacidopatias, defeitos peroxissomais e de oxidação de ácidos graxos mitocondriais (Wajner et al., 2004; Sitta et al., 2006; Pederzoli et al., 2010) e este incremento de espécies reativas pode ser incentivado pelo acúmulo de metabólitos tóxicos e/ou pelas dietas restritas a que estes pacientes são submetidos, com o conseqüente comprometimento do *status* antioxidante (Sierra et al., 1998). Em conjunto, estas pesquisas sugerem que o estresse oxidativo possa contribuir, ao menos em parte, com os sintomas neurológicos observados em pacientes com EIM e que as terapias antioxidantes possam, assim, ser benéficas a estes pacientes.

### **1.7) Estresse Oxidativo e MSUD**

Foi demonstrado *in vitro* que os BCAA, BCKA e  $\alpha$ -hidroxiácidos derivados estimulam a lipoperoxidação em cérebro de ratos de 7 e 30 dias (Fontella et al., 2002). Verificou-se também que a Leu, a Ile e a Val estimulam *in vitro* a lipoperoxidação e reduzem a capacidade cerebral de ratos de modular eficientemente o dano associado ao aumento na produção de radicais livres (Bridi et al., 2003). A literatura descreve poucos estudos que abordem especificamente aspectos relacionados à MSUD e os radicais livres em seres humanos. Barschak e colaboradores verificaram que ocorre estresse oxidativo em pacientes

portadores de MSUD antes e durante o tratamento dietético preconizado para esta doença (Barschak et al., 2006; Barschak et al., 2008). Quando foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo em plasma de pacientes com MSUD obtidos antes do tratamento (diagnóstico) e de dois grupos de pacientes de MSUD com tratamento dietético com níveis plasmáticos baixos e altos de Leu, verificou-se um aumento significativo de lipoperoxidação e uma diminuição da capacidade em modular uma produção aumentada de radicais livres, sendo esta última mais pronunciada em pacientes com baixos níveis de Leu, o que pode ser explicado pela deficiência de micronutrientes na dieta a que estes pacientes estão submetidos. Além disso, não foi observada neste estudo uma correlação entre os níveis dos BCAA e BCKA com os parâmetros de estresse oxidativo (Barschak et al., 2008). Este mesmo grupo de pesquisa estudou os níveis de selênio no plasma de pacientes com MSUD antes e durante o tratamento dietético, bem como a atividade de enzimas antioxidantes em eritrócitos nestes pacientes. Foi verificado que os pacientes com MSUD apresentam uma deficiência moderada de selênio no momento do diagnóstico da doença e que esta deficiência se agrava com o tratamento dietético. Foi observado também que a atividade da enzima GPx está diminuída em eritrócitos de pacientes em tratamento (Barschak et al., 2007). Estes resultados sugerem que há um aumento na produção de radicais livres e uma diminuição das defesas antioxidantes nos pacientes com MSUD não tratados e em tratamento, e que estes processos não estão correlacionados com níveis plasmáticos dos aminoácidos Leu, Ile e Val acumulados na doença. Além disso, a deficiência de selênio e a concomitante diminuição da atividade da enzima GPx podem estar associados ao desenvolvimento do estresse oxidativo na doença. Neste contexto, faz-se necessário o estudo do possível efeito protetor de antioxidantes na MSUD.

## **OBJETIVOS**

### **2.1) Objetivo Geral**

Pacientes MSUD apresentam extensos danos cerebrais com variáveis graus de retardo mental e outros sintomas neurológicos, porém até o momento não existe uma explicação completamente satisfatória que elucide a fisiopatologia destas alterações. Desta forma, considerando que relatos de estudos anteriores indicam o envolvimento do estresse oxidativo como mecanismo neurotóxico na MSUD e que a L-car tem se demonstrado um interessante composto com ações antioxidantes e anti-inflamatórias em diversas doenças neurometabólicas, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito *in vitro e vivo* da L-car sobre o estresse oxidativo e o dano inflamatório na MSUD, a fim de avaliar se a administração deste composto é capaz de proteger dos efeitos deletérios dos metabólitos acumulados na doença.

### **2.2) Objetivos Específicos**

- a) Estudar a indução ao dano oxidativo pelos metabólitos acumulados na MSUD, verificando o possível papel antioxidante da L-car sobre o dano ao DNA *in vitro* em leucócitos periféricos humanos;
- b) Avaliar o efeito *in vivo* da indução ao dano ao DNA em leucócitos de pacientes com a MSUD e verificar o possível papel antioxidante da suplementação de L-car por um período de dois meses nesses pacientes;
- c) Analisar o efeito *in vivo* de dois meses de suplementação de L-car sobre a concentração de citocinas pró-inflamatórias em plasma de pacientes com MSUD;

d) Verificar parâmetros de dano oxidativo *in vivo* em urina de pacientes com MSUD sob dieta de restrição protéica e suplementados ou não com L-car por um período de dois meses;

e) Investigar o efeito *in vivo* e o possível papel neuroprotetor da L-car sobre o estresse oxidativo em córtex cerebral e cerebelo de ratos submetidos a um modelo crônico de indução química da MSUD através da avaliação de vários parâmetros de estresse oxidativo, no que tange dano a lipídios e proteínas, bem como a ação antioxidante enzimática e não enzimática.

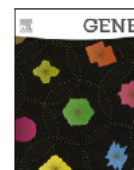
***PARTE 2***

*ARTIGO I*

**PREVENTION OF DNA DAMAGE BY L-CARNITINE INDUCED BY  
METABOLITES ACCUMULATED IN MAPLE SYRUP URINE DISEASE IN  
HUMAN PERIPHERAL LEUKOCYTES *IN VITRO***

Artigo publicado na revista Gene

Gene 548(2):294-8, 2014.



## Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro



Caroline Paula Mescka<sup>a,b,\*</sup>, Carlos Alberto Yasin Wayhs<sup>d</sup>, Gilian Guerreiro<sup>a</sup>, Vanusa Manfredini<sup>c</sup>, Carlos Severo Dutra-Filho<sup>b</sup>, Carmen Regla Vargas<sup>a,b,d</sup>

<sup>a</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em CB:Bioquímica e Departamento de Bioquímica, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Universidade Federal do Pampa, BR 472, Km 585, Caixa Postal 118, 97500-970 Uruguaiana, RS, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 December 2013

Received in revised form 31 March 2014

Accepted 18 July 2014

Available online 18 July 2014

#### Keywords:

Maple syrup urine disease

L-Carnitine

Oxidative stress

Antioxidant-DNA damage

### ABSTRACT

Maple syrup urine disease (MSUD) is an inherited aminoacidopathy caused by a deficiency in branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex activity that leads to the accumulation of the branched-chain amino acids (BCAAs) leucine (Leu), isoleucine, and valine and their respective  $\alpha$ -keto-acids,  $\alpha$ -ketoisocaproic acid (KIC),  $\alpha$  keto- $\beta$ -methylvaleric acid, and  $\alpha$ -ketoisovaleric acid. The major clinical features presented by MSUD patients include ketoacidosis, failure to thrive, poor feeding, apnea, ataxia, seizures, coma, psychomotor delay, and mental retardation; however, the pathophysiology of this disease is poorly understood. MSUD treatment consists of a low protein diet supplemented with a mixture containing micronutrients and essential amino acids but excluding BCAAs. Studies have shown that oxidative stress may be involved in the neuropathology of MSUD, with the existence of lipid and protein oxidative damage in affected patients. In recent years, studies have demonstrated the antioxidant role of L-carnitine (L-Car), which plays a central function in cellular energy metabolism and for which MSUD patients have a deficiency. In this work, we investigated the in vitro effect of Leu and KIC in the presence or absence of L-Car on DNA damage in peripheral whole blood leukocytes using the alkaline comet assay with silver staining and visual scoring. Leu and KIC resulted in a DNA damage index that was significantly higher than that of the control group, and L-Car was able to significantly prevent this damage, mainly that due to KIC.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Maple syrup urine disease (MSUD), or branched-chain  $\alpha$ -keto aciduria, is a classical inborn error of amino acid metabolism caused by a mutation in the gene encoding the mitochondrial enzyme complex branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase. This metabolic blockage leads to the tissue and body fluid accumulation of the branched chain amino acids (BCAAs) leucine (Leu), isoleucine, and valine and the corresponding branched chain  $\alpha$ -keto acids (BCKAs),  $\alpha$ -ketoisocaproic acid (KIC),  $\alpha$ -keto- $\beta$  methylvaleric acid, and  $\alpha$ -ketoisovaleric acid in addition to the corresponding  $\alpha$ -hydroxy acids (Chuang and Shih, 2001; Strauss et al., 2006).

**Abbreviations:** ANOVA, one-way analysis of variance; BCAAs, branched-chain amino acids; BCKAs, branched chain  $\alpha$ -keto acids; DI, damage index; L-Car, L-carnitine; Leu, leucine; KIC,  $\alpha$ -ketoisocaproic acid; MSUD, maple syrup urine disease; SPSS, statistical package for the social sciences.

\* Corresponding author at: C.P. Mescka, Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: [carolmescka@yahoo.com.br](mailto:carolmescka@yahoo.com.br) (C.P. Mescka).

Patients affected by this disease can be divided into five phenotypes ranging from the classical form with a neonatal onset to milder variants with a later onset (Chuang and Shih, 2001; Strauss and Morton, 2003). Acutely sick MSUD children or adults with metabolic decompensation suffer from muscle fatigue, vomiting, anorexia, dystonia, ataxia, stupor, and acute neurologic dysfunction manifested as decreased cognitive ability, hyperactivity, sleep disturbances, and hallucinations (Schönberger et al., 2004). In this context, damage has been shown to be associated with cerebral energy deficit (Amaral et al., 2010), neurotransmitter disturbances (Tavares et al., 2000), essential amino acid deficiency in the brain (Araújo et al., 2001), and oxidative stress. Recent studies have demonstrated that MSUD metabolites stimulate lipid peroxidation and protein oxidative damage and reduce the capacity to modulate the damage associated with increased free radical production, thereby causing cell damage and malfunction (Barschak et al., 2006, 2008; Bridi et al., 2003, 2005a,b; Fontella et al., 2002; Scaini et al., 2012; Sitta et al., 2013).

The recommended therapy for MSUD patients consists of a protein-restricted diet with a low BCAA content combined with a semi-synthetic formula of essential amino acids, vitamins, and minerals without

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.07.051>

0378-1119/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

L-carnitine (L-Car) (Chuang and Shih, 2001; Treacy et al., 1992). It was recently verified that MSUD patients have a deficiency of L-Car (Mescka et al., 2013), a highly polar quaternary amine that plays important metabolic functions, including transport of long-chain fatty acids across the inner mitochondrial membrane for utilization in  $\beta$ -oxidation participation, transesterification, and the excretion of acyl-CoA esters (Derin et al., 2004; Gulcin, 2006). In addition, L-Car has demonstrated antioxidant activity by reducing and scavenging free radical formation and by enhancing the activity of enzymes involved in the defense against oxidative damage (Derin et al., 2004; Gulcin, 2006; Muthuswamy et al., 2006). Moreover, L-Car was able to prevent oxidative damage in the cerebral cortex of young rats in an induced acute MSUD model, and L-Car supplementation increased the antioxidant status in patients with inborn errors of metabolism (Mescka et al., 2011, 2013; Ribas et al., 2010a; Sitta et al., 2011).

In the present work, we extended the investigations of the damage to biomolecules in MSUD analyzing the *in vitro* effect of different concentrations of Leu and KIC on DNA damage in white blood cells from normal individuals using the comet assay, as well as evaluating whether L-Car is protective under such possible damage.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Blood sample and *in vitro* studies

Venous blood samples were collected into heparinized vials under sterile conditions from three healthy volunteers and used for the control group and for the tested metabolite addition. Leukocytes from each control subject were pre-treated with various concentrations of Leu (100, 250, 500, 1000, 2500, and 3000  $\mu$ M) and KIC (30, 60, 150, 600, 1200, and 2000  $\mu$ M) for 6 h at 37 °C. These metabolite concentrations are similar to those found in the blood of MSUD patients.

### 2.2. *In vitro* effect of L-carnitine on DNA damage

Leukocytes from healthy volunteers were co-incubated with 250, 500, and 3000  $\mu$ M of Leu or 60, 150, and 2000  $\mu$ M of KIC with an L-Car concentration curve (30, 60, 90, 120, and 150  $\mu$ M) for 6 h at 37 °C. The final concentrations of L-Car in the assays were based on previous findings obtained for patients with MSUD, showing that the plasma levels of this compound can vary from 30  $\mu$ M at diagnosis to almost 100  $\mu$ M under supplementation (Mescka et al., 2013).

### 2.3. Single-cell gel electrophoresis (comet assay)

An alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. (1988) and was performed in accordance with the general guidelines

(Tice et al., 2000). Isolated human leukocytes were suspended in agarose and spread onto a glass microscope slide pre-coated with agarose; the agarose was allowed to set at 4 °C for 5 min. The slides were incubated in ice-cold lysis solution to remove the cellular proteins, leaving the DNA as nucleoids. After lysis, the slides were placed on a horizontal electrophoresis unit and covered with fresh buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min at 4 °C to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was performed for 20 min (25 V; 300 mA; 0.9 V/cm). The slides were then neutralized, washed in bi-distilled water, and stained using a silver staining protocol (Nadin et al., 2001). After drying at room temperature overnight, the gels were analyzed using an optical microscope. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. The cells were visually scored according to the tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration) according to the tail intensity. Therefore, the damage index (DI) for the cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analyzed under blind conditions by at least two different individuals.

### 2.4. Statistical analysis

The data were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Bonferroni test when the F value was significant. A p value of less than 0.05 was considered to be significant. The values are presented as the mean  $\pm$  S.D. All of the analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software with a PC-compatible computer.

## 3. Results

Fig. 1A and B shows the *in vitro* effects of Leu and KIC, respectively, on DNA damage in healthy human white blood cells. All of the tested concentrations of Leu and KIC resulted in a DNA damage index (DI) that was significantly higher than that of the control [ $F(6,12) = 410.4$  and  $F(6,12) = 126.4$ , ( $p < 0.05$ )], respectively. No significant difference was found with regard to the DNA damage between the Leu concentrations of 500 to 3000  $\mu$ M (Fig. 1A) and between the KIC concentrations of 150 to 2000  $\mu$ M (Fig. 1B). We then analyzed the *in vitro* effect of L-Car (30, 60, 90, 120, and 150  $\mu$ M) on the DNA damage induced by 250, 500, and 3000  $\mu$ M Leu and 60, 150, and 2000  $\mu$ M KIC (Figs. 2 and 3, respectively). L-Car in concentrations higher than 90  $\mu$ M and 120  $\mu$ M reduced the DI induced by Leu [Fig. 2A:  $F(6,12) = 56.88$ ; Fig. 2B:  $F(6,12) = 267.5$ ; Fig. 2C:  $F(6,12) = 1174$ , ( $p < 0.05$ )] and KIC [Fig. 3A:  $F(6,12) = 149.5$ ; Fig. 3B:  $F(6,12) = 187.5$ ; Fig. 3C:  $F(6,12) = 280.9$ , ( $p < 0.05$ )], respectively, at all of the tested concentrations of this amino acid and alpha keto acid. A particularly large inhibitory effect

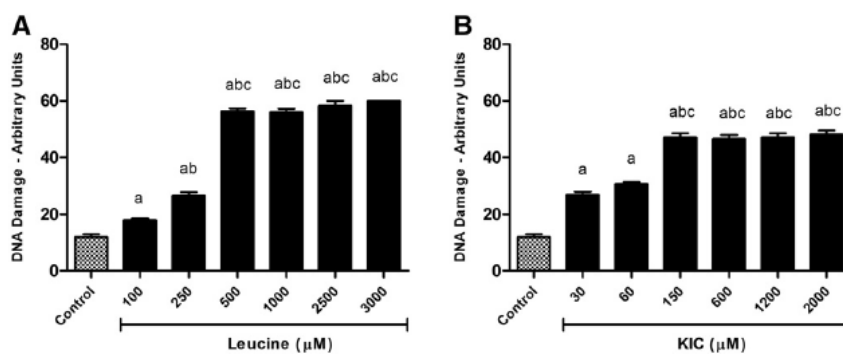
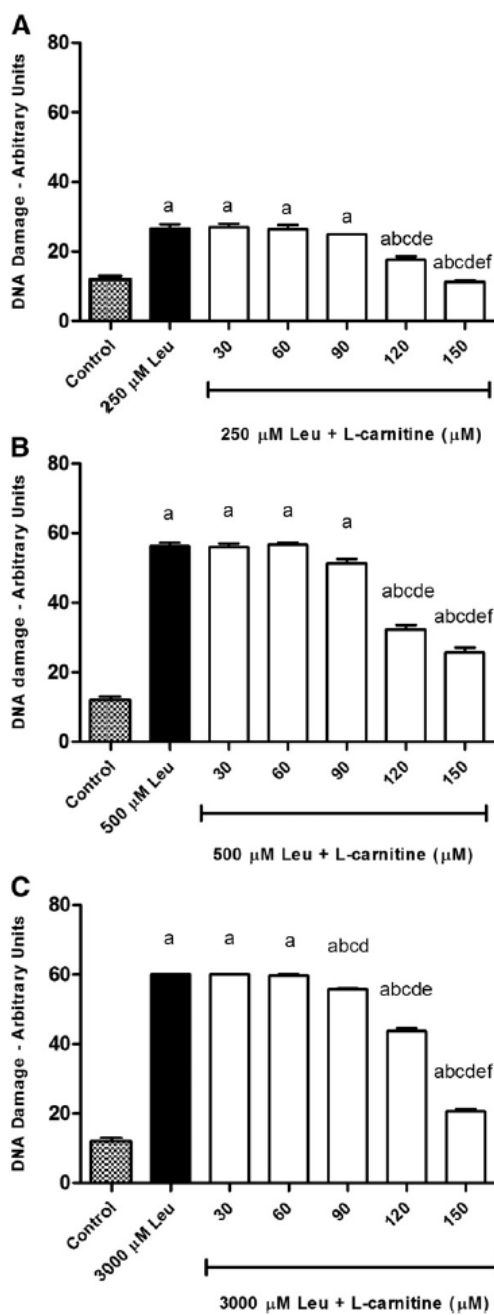
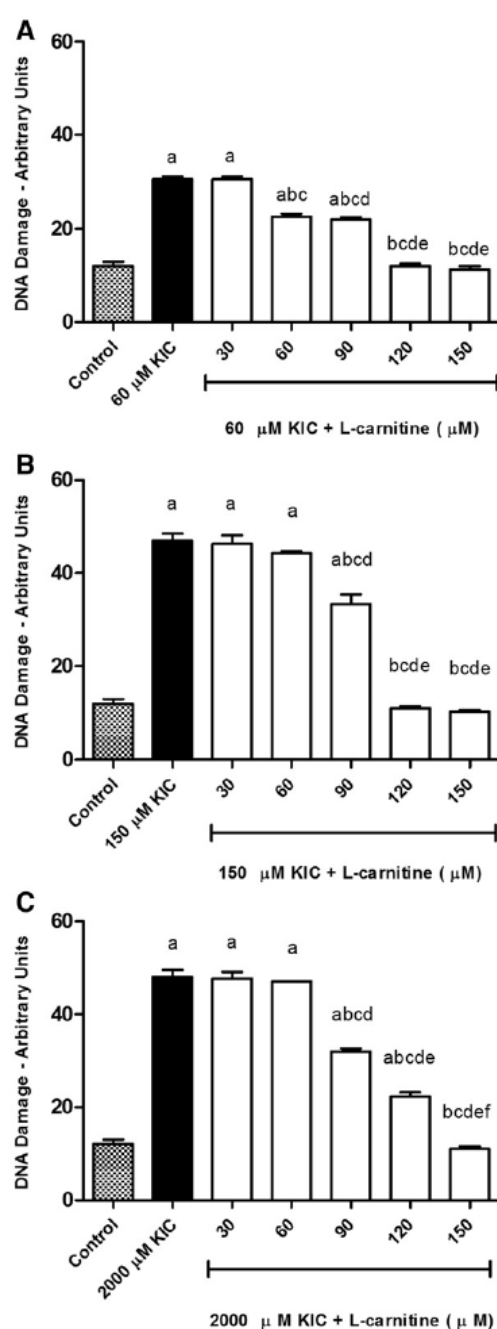


Fig. 1. *In vitro* effect of leucine (Leu) [A] and  $\alpha$ -ketoisocaproic acid (KIC) [B] on DNA damage (comet assay) in leukocytes from whole blood. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. [A]: (a)  $p < 0.05$  compared to the control group; (b)  $p < 0.05$  compared to 100  $\mu$ M Leu; (c)  $p < 0.05$  compared to 250  $\mu$ M Leu. [B]: (a)  $p < 0.05$  compared to the control group; (b)  $p < 0.05$  compared to 30  $\mu$ M KIC; (c)  $p < 0.05$  compared to 60  $\mu$ M KIC (one-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by a Bonferroni test).





**Fig. 2.** In vitro effect of L-carnitine (L-Car) (30, 60, 90, 120, and 150  $\mu$ M) on the DNA damage (comet assay) induced by 250  $\mu$ M [A], 500  $\mu$ M [B], and 3000  $\mu$ M leucine (Leu) [C] in leukocytes from whole blood. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. [A]: (a)  $p < 0.05$  compared to the control group; (b)  $p < 0.05$  compared to 250  $\mu$ M Leu; (c)  $p < 0.05$  compared to 30  $\mu$ M L-Car; (d)  $p < 0.05$  compared to 60  $\mu$ M L-Car; (e)  $p < 0.05$  compared to 90  $\mu$ M L-Car; (f)  $p < 0.05$  compared to 120  $\mu$ M L-Car. [B]: (a)  $p < 0.05$  compared to the control group; (b)  $p < 0.05$  compared to 500  $\mu$ M Leu; (c)  $p < 0.05$  compared to 30  $\mu$ M L-Car; (d)  $p < 0.05$  compared to 60  $\mu$ M L-Car; (e)  $p < 0.05$  compared to 90  $\mu$ M L-Car; (f)  $p < 0.05$  compared to 120  $\mu$ M L-Car. [C]: (a)  $p < 0.05$  compared to the control group; (b)  $p < 0.05$  compared to 3000  $\mu$ M Leu; (c)  $p < 0.05$  compared to 30  $\mu$ M L-Car; (d)  $p < 0.05$  compared to 60  $\mu$ M L-Car; (e)  $p < 0.05$  compared to 90  $\mu$ M L-Car; (f)  $p < 0.05$  compared to 120  $\mu$ M L-Car (one-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by a Bonferroni test).



**Fig. 3.** In vitro effect of L-carnitine (L-Car) (30, 60, 90, 120, and 150  $\mu$ M) on the DNA damage (comet assay) induced by 60  $\mu$ M [A], 150  $\mu$ M [B], and 2000  $\mu$ M KIC [C] in leukocytes from whole blood. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. [A]: (a)  $p < 0.05$  compared to the control group; (b)  $p < 0.05$  compared to 60  $\mu$ M KIC; (c)  $p < 0.05$  compared to 30  $\mu$ M L-Car; (d)  $p < 0.05$  compared to 60  $\mu$ M L-Car; (e)  $p < 0.05$  compared to 90  $\mu$ M L-Car. [B]: (a)  $p < 0.05$  compared to the control group; (b)  $p < 0.05$  compared to 150  $\mu$ M KIC; (c)  $p < 0.05$  compared to 30  $\mu$ M L-Car; (d)  $p < 0.05$  compared to 60  $\mu$ M L-Car; (e)  $p < 0.05$  compared to 90  $\mu$ M L-Car. [C]: (a)  $p < 0.05$  compared to the control group; (b)  $p < 0.05$  compared to 2000  $\mu$ M KIC; (c)  $p < 0.05$  compared to 30  $\mu$ M L-Car; (d)  $p < 0.05$  compared to 60  $\mu$ M L-Car; (e)  $p < 0.05$  compared to 90  $\mu$ M L-Car; (f)  $p < 0.05$  compared to 120  $\mu$ M L-Car (one-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by a Bonferroni test).

was found for KIC because the highest concentration of L-Car tested (150  $\mu\text{M}$ ) was able to revert the DNA damage index to the control level at all of the analyzed KIC concentrations.

#### 4. Discussion

MSUD is an inborn error of metabolism that is biochemically characterized by elevated levels of the BCAAs Leu, isoleucine, and valine and their corresponding BCKAs. Leu and its keto acid KIC are considered to be the main neurotoxic metabolites in MSUD, as an increase in the plasma concentration of these compounds is associated with the onset of cerebral symptoms (Chuang and Shih, 2001).

Free radicals and oxidative stress appear to be involved in a large number of human diseases. Indeed, there is evidence that the damage generated by free radicals is important in neurodegenerative disorders, chronic-inflammatory and vascular diseases, and cancer (Halliwell and Gutteridge, 2007) and that oxidative stress occurs in some inborn errors of metabolism, such as phenylketonuria (Sitta et al., 2011) and methylmalonic and propionic acidemias (Ribas et al., 2010b).

An imbalance between the production and removal of free radicals can result in pathological consequences, such as oxidative damage to cellular membrane phospholipids, proteins, and DNA, eventually leading to cell death (Halliwell and Gutteridge, 2007). In vitro studies have shown that lipid peroxidation is stimulated by BCAAs and BCKAs in rat brain, reducing the cerebral capacity to modulate the damage associated with increased free radical production (Bridi et al., 2003, 2005a,b; Fontella et al., 2002). Moreover, it is known that MSUD patients present oxidative stress at diagnosis and during treatment (protein-restricted diet supplemented with a semisynthetic formula of essential amino acids without BCAAs and without L-Car). Because L-Car levels are markedly deficient in MSUD treated patients, it has been proposed that dietary L-Car supplementation should be incorporated into the therapy (Barschak et al., 2006, 2007, 2008; Mescka et al., 2013).

In MSUD, L-Car appears to be efficient in reducing oxidative process, as supplementation can reverse the lipid oxidative damage found in the plasma of patients affected by this disease (Mescka et al., 2013). Furthermore, L-Car prevented lipoperoxidation, protein damage, and alterations in catalase and glutathione peroxidase activities in rat cortex in a chemically induced model of MSUD (Mescka et al., 2011). These results indicate a possible neuroprotective role for L-Car as a potential adjuvant therapy in MSUD. DNA damage can include chemical and structural modifications to purine and pyrimidine bases, and 2'-deoxyribose and can lead to the formation of single and double strand breaks, inter/intra-strand cross-links, and DNA-protein cross-links. These products can elicit mutations, microsatellite instability, and loss of heterozygosity, chromosomal aberrations, cytotoxicity, neoplastic growth, and aging (Halliwell and Gutteridge, 2007).

The alkaline comet assay (Singh et al., 1988), a relatively simple, rapid, low-cost, and sensitive technique for the analysis of DNA damage in all cell types (Liao et al., 2009), was used in this work to assess the effects of L-Car on the DNA damage induced by Leu and KIC in healthy human leukocytes in vitro. In this technique, increased DNA migration can be associated with incomplete excision repair sites (Tice et al., 2000), which are generated as an intermediate step during the action of different DNA repair systems (Speit and Hartmann, 1995). Because the DNA damage caused by oxidative stress is a crucial factor in the investigation of MSUD pathogenesis, the present study was aimed at investigating whether L-Car could offer protection against DNA injury through an alkaline comet assay analysis.

We verified a significantly greater levels of DNA migration and therefore DNA damage in the leukocytes treated with Leu or KIC compared to the control group. As shown in Figs. 1 and 2, we observed that the DNA damage induced by Leu appears to be higher than that induced by KIC, although the DNA damage profiles are very similar. Thus, we cannot rule out a possible in vitro interconversion between these metabolites. We then evaluated the effect of L-Car on the DNA damage

caused by Leu and KIC; Fig. 2 illustrates the in vitro effect of L-Car with treatments of 250 and 500  $\mu\text{M}$  Leu (Fig. 2A and B, respectively), concentrations that can be found in the blood of well-treated MSUD patients. Fig. 2C shows the effect of L-Car on 3000  $\mu\text{M}$  Leu, a concentration that can be observed at MSUD patient diagnosis and during severe metabolic crisis. We found that 90, 120, and 150  $\mu\text{M}$  L-Car were able to partially prevent the DNA damage level produced relative to the control group.

Fig. 3A and B demonstrates the effect of an L-Car concentration curve on 60 and 150  $\mu\text{M}$  of KIC, respectively. These concentrations can be found in the blood of well-treated MSUD patients. Fig. 3C shows the in vitro effect of L-Car on 2000  $\mu\text{M}$  KIC, a concentration that can be observed in MSUD patients at diagnosis and during severe metabolic crisis. At all of these concentrations, from 120  $\mu\text{M}$ , L-Car is able to reverse to the control level the damage caused by KIC, also demonstrating that the  $\alpha$ -keto acid appears to be less toxic to DNA than Leu.

Recent reports have suggested that L-Car has additional pleiotropic functions in tissues, as it reduces the level of apoptosis induced by an apoptotic inducer and decreases the antiproliferative effect promoted by the presence of an interleukin, such as TNF- $\alpha$  (Haripriya et al., 2004). Furthermore, Boerighter et al. (1993) have demonstrated an L-carnitine-dependent reduction of DNA single-strand breaks after in vitro treatment with an oxygen radical-generating system in isolated human lymphocytes, possibly by accelerating the repair action of poly(ADP ribosyl) polymerase and/or other related repair mechanisms.

The comet assay is unable to discriminate among the causes of DNA damage. Nonetheless, we propose that the main metabolites in MSUD, Leu and KIC, are capable of promoting DNA damage via increased free radical production, which is in agreement with other studies showing oxidative damage to other biomolecules in MSUD. Based on our results, we suggest that the antioxidant L-Car prevents DNA damage, contributing to cell-protective functions and reinforcing the involvement of oxidative stress in this injury. These findings could represent a tool for further research on the possible pharmacological applications of L-Car in MSUD therapy.

#### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Acknowledgments

This work was supported in part by grants from FAPERGS, CNPq and FINE/HCPA-Brazil.

#### References

- Amaral, A.U., Leipnitz, G., Fernandes, C.G., Seminotti, B., Schuck, P.F., Wajner, M., 2010. Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Res.* 1324, 75–84.
- Araújo, P., Wassermann, G.F., Tallini, K., Furlanetto, V., Vargas, C.R., Wannmacher, C.M.D., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S., Wajner, M., 2001. Reduction of large neutral amino acid level in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem. Int.* 38, 529–537.
- Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., Oliveira, M.H., Haeser, A., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Vargas, C.R., 2006. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with Maple Syrup Urine Disease. *Metab. Brain Dis.* 21, 279–286.
- Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., Barden, A.T., Schmitt, G.O., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Vargas, C.R., 2007. Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma selenium concentration are reduced in maple syrup urine disease patients during treatment. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25, 335–338.
- Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., Barden, A.T., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Vargas, C.R., 2008. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab. Brain Dis.* 23, 71–80.
- Boerighter, M.E., Franceschi, C., Arrigoni-Martelli, E., Wei, J.Y., Vijg, J., 1993. The effect of L-carnitine and acetyl L-carnitine on the disappearance of DNA single-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 14 (10), 2131–2136.
- Bridi, R., Araldi, J., Sgarbi, M.B., Testa, C.G., Durigon, K., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., 2003. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21, 327–332.
- Bridi, R., Braum, C.A., Zorzi, G.K., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Lissi, E.G., Dutra-Filho, C.S., 2005a. Alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defences in cerebral cortex from young rats. *Metab. Brain Dis.* 20, 155–167.

- Bridi, R., Latini, A., Braum, C.A., Zorzi, G.K., Mbsacir, W., Lissi, E., Dutra-Filho, C.S., 2005b. Evaluation of the mechanism involved in leucine-induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic. Res.* 39, 71–79.
- Chuang, D.T., Shih, V.E., 2001. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.L., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 1971–2005.
- Derin, N., Izgut-Uysal, V.N., Agac, A., Ahiciguzel, Y., Demir, N., 2004. L-Carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *J. Physiol. Pharmacol.* 55, 595–606.
- Fontella, F.H., Gassen, E., Pulitnick, V., Wannmacher, C.M.D., Klein, A.B., Wajner, M., Dutra, C.S., 2002. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 17, 47–54.
- Gulein, I., 2006. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci.* 78, 803–811.
- Halliwell, B., Gutteridge, M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4<sup>ed</sup>. Oxford University Press Inc., New York.
- Haripriya, D., Devi, M., Kokilavani, V., Sangeetha, P., Panneerselvam, C., 2004. Age dependent alterations in mitochondrial enzymes in cortex, striatum and hippocampus of rat brain—potential role of L-carnitine. *Biogerontology* 5, 355–364.
- Liao, W., McNutt, M.A., Zhu, W.G., 2009. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48, 46–53.
- Mescka, C., Moraes, T., Rosa, A., Muzzola, P., Piconi, B., Jacques, C., Dalazen, G., Coelho, J., Cortes, M., Terra, M., Regia Vargas, C., Dutra-Filho, C.S., 2011. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 26, 21–28.
- Mescka, C.P., Wayhs, C.A., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Guerreiro, G., Manfredini, V., Souza, C., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., Vargas, C.R., 2013. Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: L-carnitine effect. *Int. J. Dev. Neurosci.* 31 (1), 21–24.
- Muthuswamy, A.D., Vedagiri, K., Ganesan, M., Chinrakamu, P., 2006. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: role of L-carnitine and  $\alpha$ -lipoic acid. *Clin. Chim. Acta* 368, 84–92.
- Nadin, S., Vargas-Roig, L., Goora, D., 2001. A silverstaining method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1183–1186.
- Ribas, G.S., Manfredini, V., De Mari, J.F., Wayhs, C.Y., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Sitta, A., Deon, M., Wajner, M., Vargas, C.R., 2010a. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28, 127–132.
- Ribas, G.S., Manfredini, V., De Marco, M.G., Veira, R.B., Wayhs, C.Y., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Wajner, M., Vargas, C.R., 2010b. Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. *Mutat. Res.* 702, 123–128.
- Scaini, G., Jeremias, L.C., Moraes, O.S., Borges, G.D., Munhoz, R.P., Lefka, D.D., Andrade, V.M., Schuck, P.F., Ferreira, G.C., Streck, E.J., 2012. DNA damage in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol. Genet. Metab.* 106, 169–174.
- Schönberger, S., Schweiger, B., Schwahn, B., Schwarz, M., Wendel, U., 2004. Demyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol. Genet. Metab.* 82, 69–75.
- Singh, N., McCoy, M., Tice, R., et al., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Sitta, A., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Manfredini, V., de Oliveira, A.B., Wayhs, C.A., Ribas, G.S., Giugliani, L., Schwartz, L.V., Bohrer, D., Garcia, S.C., Wajner, M., Vargas, C.R., 2011. Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell. Mol. Neurobiol.* 31, 429–436.
- Sitta, A., Ribas, G.S., Mescka, C.P., Barschak, A.G., Wajner, M., Vargas, C.R., 2013. Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. *Cell. Mol. Neurobiol.* 13 (Epub ahead of print).
- Speit, G., Hartmann, A., 1995. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10, 555–559.
- Strauss, K.A., Morton, D.H., 2003. Branched-chain ketoacyl dehydrogenase deficiency: maple syrup disease. *Curr. Treat. Options Neurol.* 5, 329–341.
- Strauss, K.A., Puffenberger, E.G., Morton, D.H., 2006. Maple syrup urine disease. In: Pagon, R., Bird, T., Dolan, C., Stephens, K., Adam, M. (Eds.), *Gene Reviews*. University of Washington, Seattle, Washington, USA.
- Tavares, R.G., Santos, C.E.S., Tasca, C., Wajner, M., Souza, D.O., Dutra-Filho, C.S., 2000. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *J. Neurol. Sci.* 181, 44–49.
- Tice, R.R., Agurell, D., Anderson, D., et al., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221.
- Treacy, E., Clow, C.L., Reade, T.R., Chitayat, D., Mamer, O.A., Scriver, C.R., 1992. Maple syrup urine disease: interrelationship between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS demyelination. *J. Inher. Metab. Dis.* 15, 121–135.

## ***ARTIGO II***

### **L-CARNITINE SUPPLEMENTATION DECREASES DNA DAMAGE IN TREATED MSUD PATIENTS**

Artigo publicado na revista Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of  
Mutagenesis

Mutation Research 775:43–47, 2015.



Contents lists available at ScienceDirect  
**Mutation Research/Fundamental and Molecular  
 Mechanisms of Mutagenesis**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/molmut](http://www.elsevier.com/locate/molmut)  
 Community address: [www.elsevier.com/locate/mutres](http://www.elsevier.com/locate/mutres)



Short Communication

## L-Carnitine supplementation decreases DNA damage in treated MSUD patients



Caroline Paula Mescka<sup>c,\*</sup>, Gilian Guerreiro<sup>a</sup>, Tatiane Hammerschmidt<sup>a</sup>,  
 Jéssica Faverzani<sup>a</sup>, Daniella de Moura Coelho<sup>b</sup>, Vanusa Mandredini<sup>e</sup>,  
 Carlos Alberto Yasin Wayhs<sup>d</sup>, Moacir Wajner<sup>b,c</sup>, Carlos Severo Dutra-Filho<sup>c</sup>,  
 Carmen Regla Vargas<sup>a,b,c,d</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em CB:Bioquímica, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035 000, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>e</sup> Universidade Federal do Pampa, BR 472, Km 585, Caixa Postal 118, 97500 970 Uruguaiana, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 November 2014

Received in revised form 19 March 2015

Accepted 20 March 2015

Available online 28 March 2015

#### Keywords:

Maple syrup urine disease

L-Carnitine

DNA damage

Antioxidant

Oxidative stress

### ABSTRACT

Maple syrup urine disease (MSUD) is an inherited disorder caused by severe deficient activity of the branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex involved in the degradation pathway of branched-chain amino acids (BCAAs) and their  $\alpha$ -ketoacid derivatives. MSUD patients generally present ketoacidosis, poor feeding, ataxia, coma, psychomotor delay, mental retardation and brain abnormalities. Treatment consists of dietary restriction of the BCAA (low protein intake) supplemented by a BCAA-free amino acid mixture. Although the mechanisms of brain damage in MSUD are poorly known, previous studies have shown that oxidative stress may be involved in the neuropathology of this disorder. In this regard, it was recently reported that MSUD patients have deficiency of L-carnitine (L-car), a compound with antioxidant properties that is used as adjuvant therapy in various inborn errors of metabolism. In this work, we investigated DNA damage determined by the alkaline comet assay in peripheral whole blood leukocytes of MSUD patients submitted to a BCAA-restricted diet supplemented or not with L-car. We observed a significant increase of DNA damage index (DI) in leukocytes from MSUD patients under BCAA-restricted diet as compared to controls and that L-car supplementation significantly decreased DNA DI levels. It was also found a positive correlation between DI and MDA content, a marker of lipid peroxidation, and an inverse correlation between DI and L-car levels. Taken together, our present results suggest a role for reactive species and the involvement of oxidative stress in DNA damage in this disorder. Since L-car reduced DNA damage, it is presumed that dietary supplementation of this compound may serve as an adjuvant therapeutic strategy for MSUD patients in addition to other therapies.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Maple syrup urine disease (MSUD; branched-chain ketoaciduria) is an inherited metabolic disorder caused by

mutations leading to deficient activity of in the mitochondrial branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase (BCKDH) enzyme complex (E.C.1.2.4.4). This complex catalyses the irreversible oxidative decarboxylation of the branched-chain  $\alpha$ -keto acids (BCKA)  $\alpha$ -ketoisocaproate (KIC),  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvalerate and  $\alpha$ -ketoisovalerate, being also involved in the metabolism of the branched-chain amino acids (BCAA) leucine (Leu), isoleucine (Ile), and valine (Val). The metabolic blockage at this step results in the accumulation of BCKA and BCAA in tissues and body fluids of the affected individuals [1–3].

Patients affected by classical MSUD usually present poor feeding, ketoacidosis, apnea, hypoglycemia, convulsions, coma, ataxia, failure to thrive, psychomotor delay and mental retardation.

**Abbreviations:** MSUD, maple syrup urine disease; BCAAs, branched-chain amino acids; L-car, L-carnitine; DI, damage index; MDA, malondialdehyde; BCKDH, branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase; BCKA, branched-chain  $\alpha$ -keto acids; KIC,  $\alpha$ -ketoisocaproate; Leu, leucine; Ile, isoleucine; Val, valine.

\* Corresponding author at: Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33598011; fax: +55 51 33598010.

E-mail address: [carolmescka@yahoo.com.br](mailto:carolmescka@yahoo.com.br) (C.P. Mescka).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.03.008>  
 0027-5107/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Central nervous system images reveal spongy degeneration of the white matter, reflecting hypomyelination/demyelination, edema and cerebral atrophy [1,4].

Although severe neurological damage occurs in most MSUD patients, the mechanisms involved in the neurotoxicity of this disease are still poorly understood. However, Leu and KIC have been considered the main neurotoxic metabolites in MSUD, since increasing concentrations of these metabolites are associated with the appearance and worsening of neurological symptoms [1,5].

Clinical management of MSUD comprises a lifelong strict and carefully adjusted semi-synthetic diet with restricted amounts of protein supplemented by vitamins, minerals and a mixture of essential amino acids [6]. Although patients improve significantly by the implementations of this therapy, protein restricted diet may lead to important nutritional deficiency and compromise of the antioxidant defense system [7,8].

L-Carnitine (L-car), a small quaternary amine highly polar and water soluble molecule obtained from dietary supply [9,10] has been used in the treatment of various organic acidurias [11,12]. Furthermore, L-car deficiency has been previously reported in treated MSUD patients with protein-restricted diet supplemented by a semisynthetic formula of essential amino acids without BCAAs [13]. Recent studies have observed that L-car has antioxidant properties and may protect cells from toxic reactive oxygen species in some metabolic disorders [14–17]. In this context, it was found that L-car administration prevents lipoperoxidation, protein damage and alterations on catalase and glutathione peroxidase activities in rat cerebral cortex in a chemically-induced acute model of MSUD [18]. Likewise, patients under BCAA-restricted diet plus L-car supplementation present a marked reduction of malondialdehyde content (lipid peroxidation) in relation to controls [13]. *In vitro* studies performed with human peripheral leukocytes have shown that L-car prevents DNA damage induced by the metabolites accumulating in MSUD [19]. However, to the best of our knowledge there are no reports in literature investigating DNA damage in MSUD patients and the role of antioxidant therapy in this process.

Thus, the aim of the present study was to evaluate DNA damage in leukocytes from MSUD patients and the role of dietary L-car dietary supplementation on this damage. The relationship between DNA damage, MDA levels and Leu concentrations in plasma from MSUD patients was also studied.

## 2. Material and methods

### 2.1. Patients and controls

Six MSUD patients (classic form) admitted at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, aged 5–12 years old (mean age  $8.28 \pm 2.87$  years) were included in this study. The main clinical symptoms and laboratorial signals at diagnosis were seizures, convulsions, hypotonia, hypoglycemia, poor feeding, ketoacidosis and psychomotor delay. The length of treatment ranged from 15 days to 9.83 years and consisted of a natural protein restricted diet with low BCAA, supplemented with a semi-synthetic formula of essential amino acids, vitamins and minerals and not containing L-car (MSUD 2-Milupa). These patients were also supplemented for 2 months with dietary L-car ( $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) not exceeding  $1.5 \text{ g day}^{-1}$ . The control group was composed by six age-matched healthy individuals (mean age  $6.0 \pm 3.12$  years). The comet assay, as well as malondialdehyde (MDA), Leu and free L-car concentrations were determined in blood of MSUD patients before (Group A) and after 1 month (Group B) or 2 months (Group C) of L-car supplementation and compared to control group. Blood Leu levels, expressed in  $\mu\text{M}$ , were measured by HPLC according to Joseph and Marsden [20] with slight modifications [21]. MDA was measured according to

Karatepe [22] and expressed as  $\mu\text{M}$  of MDA. Free L-car levels were determined in blood spots by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), using the multiple reaction monitoring (MRM) mode [23] and the results were reported as  $\mu\text{M}$ . The present study was approved by the Ethical Committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, RS, Brazil. Parents from all patients included in the present study gave informed consent. Data are represented as mean  $\pm$  SD for the various measurements. For the statistical analysis, comparison between means was analyzed by repeated measures of ANOVA followed by the Tukey's multiple range test when the *F* value was significant ( $p < 0.05$ ). Correlations were carried out using the Pearson correlation coefficient.

### 2.2. Single-cell gel electrophoresis (comet assay)

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. [24] in accordance with the general guidelines [25]. Isolated human leukocytes were suspended in agarose and spread onto a glass microscope slide pre-coated with agarose; the agarose was allowed to set at  $4^\circ\text{C}$  for 5 min. The slides were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10) to remove the cellular proteins, leaving the DNA as histone-free nucleoids. After lysis, the slides were placed on a horizontal electrophoresis unit and covered with fresh electrophoresis solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min at  $4^\circ\text{C}$  to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was performed for 20 min (25 V; 300 mA;  $0.9 \text{ V/cm}$ ). The slides were then neutralized, washed in bi-distilled water, and stained using a silver staining protocol [26]. After drying at room temperature overnight, the gels were analyzed using an optical microscope. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. The cells were visually scored and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration) according to the tail intensity. Therefore, the damage index (DI) of the cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). All slides were analyzed under blind conditions by two different individuals and the average scores were used for the calculations.

## 3. Results

Data (represented as mean  $\pm$  SD) from MSUD patients are divided into Group A (without L-car supplementation), Group B (1 month of L-car therapy) and Group C (2 months of L-car supplementation). Leu levels were measured in plasma from controls and MSUD patients before and after treatment. We found the following values expressed as  $\mu\text{M}$ : controls =  $130.8 \pm 27.2$ , Group A =  $178.2 \pm 58.6$ , Group B =  $264.6 \pm 136.7$ , Group C =  $278.0 \pm 105.6$ . There were no significant differences between the groups.

On the other hand, patients from Group A had significantly decreased levels of L-car ( $20.9 \pm 6.6 \mu\text{M}$ ) as compared to the controls ( $43.8 \pm 8.9 \mu\text{M}$ ) that normalized after L-car supplementation [Group B ( $48.1 \pm 9.1 \mu\text{M}$ ) and Group C ( $54.8 \pm 12.6 \mu\text{M}$ )] [ $F(3,21) = 6.253$ ,  $p < 0.05$ ]. Moreover, MDA levels were significantly elevated in Group A ( $0.087 \pm 0.06 \mu\text{M}$ ) as compared to the control group ( $0.029 \pm 0.003 \mu\text{M}$ ), indicating lipid peroxidation, that was reversed after 2 months (Group C) ( $0.036 \pm 0.003 \mu\text{M}$ ) of L-car therapy [ $F(3,21) = 19.541$ ,  $p < 0.05$ ]. With regard to DNA damage, we observed that only Group A had damage classes three and four (the highest damage class) before L-car supplementation and already in the first month of L-car administration this high damage was not more verified, being observed just zero, one and two damage classes (data not shown).

Fig. 1 shows a significantly higher DNA migration (damage class index = DI) in Groups A (DI =  $72.3 \pm 4.5$ ), B (DI =  $36.2 \pm 5$ ) and

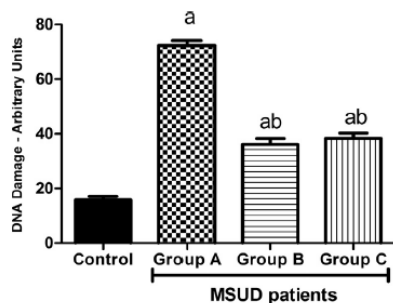


Fig. 1. DNA damage index (DI) of peripheral blood leukocytes from MSUD patients and controls. Group A: patients before supplementation with L-carnitine. Group B: patients after 1 month of L-carnitine supplementation. Group C: patients after 2 months of L-carnitine supplementation. Data represent the mean  $\pm$  SD (controls:  $n = 6$ ; Group A:  $n = 6$ ; Group B:  $n = 6$ ; Group C:  $n = 5$ ). (a)  $p < 0.05$ , compared to controls. (b)  $p < 0.05$ , compared to Group A (ANOVA, followed by the Tukey multiple range test).

C (DI =  $38.3 \pm 4.8$ ) of MSUD patients, when compared to the control group (DI =  $15.8 \pm 3.1$ ). Besides, L-carnitine supplemented by 1 and 2 months was able to reduce DNA damage relatively to patients not treated with L-carnitine [ $F(3,21) = 168$ ,  $p < 0.05$ ]. Moreover, a significant inverse correlation was observed between DNA damage and free plasma L-carnitine levels ( $r = -0.82$ ;  $p < 0.05$ ) in treated MSUD patients (Fig. 2A).

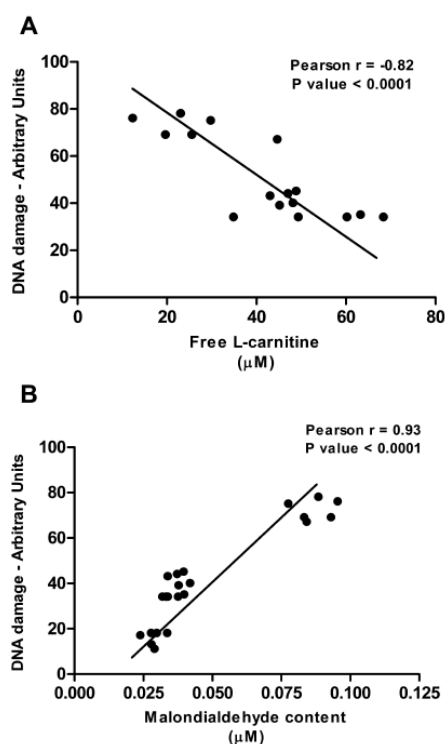


Fig. 2. (A) Correlation between DNA damage index (DI) and L-carnitine levels in MSUD patients. (B) Correlation between DNA damage index (DI) and MDA levels in MSUD patients. Graphs show the Pearson correlation coefficient and probabilities.

Finally, significant positive correlation between MDA content and DNA damage were highly correlated ( $r = 0.93$ ;  $p < 0.05$ ) in these patients (Fig. 2B).

#### 4. Discussion

Cellular DNA is constantly exposed to endogenous and exogenous deleterious conditions that may affect its integrity. Thus, accumulated evidence have demonstrated that an increment in the generation of reactive oxygen and nitrogen species is a major process provoking DNA lesions, including single- and double-strand breaks, DNA-proteins cross-links, inter/intra-strand cross-links, and sugar fragmentation products. These alterations may induce mutations, chromosomal aberrations, microsatellite instability, loss of heterozygosity and cytotoxicity [27]. The comet assay is a rapid, simple, sensitive and versatile tool for detecting DNA strand breaks and alkali-labile sites in individual cells [28,29]. This assay is widely accepted as a standard method to investigate DNA damage and repair in different cell types and mainly reflects the pro-oxidant/antioxidant effects of various compounds [25,30].

In this study, we investigated DNA damage in erythrocytes from MSUD patients and also whether L-carnitine dietary administration could protect against this damage in the same groups of patients treated with protein restricted diet supplemented by L-carnitine for a period of up to 2 months. We also correlated DNA damage with L-carnitine concentrations, MDA values (oxidative lipid damage) and Leu levels (the major metabolite accumulated in this disease) in order to get a better insight on the possible causes of this damage.

We first observed that MSUD patients treated only with protein restriction diet without supplementation of L-carnitine have significantly higher DI when compared with the control group, indicating DNA damage. Damage classes 3 and 4 were observed in patients before L-carnitine treatment (data not shown). Furthermore, L-carnitine supplementation ( $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) for 1 and 2 months provoked a significant decrease of DI when compared to Group A, but did not restore DNA damage at the level of the control group (healthy individuals). It was also verified a decrease in DNA damage classes 3 and 4 and an increase in DNA damage classes 0, 1 and 2 in Groups B and C of MSUD patients, indicating a decrease in the severity of this damage after L-carnitine supplementation (data not shown). A significant inverse correlation between free L-carnitine levels and DI was also found, reinforcing the role of L-carnitine as a protective factor against DNA damage.

As regards to the mechanisms underlying the protective effect of L-carnitine, we observed a significant positive correlation between DNA DI and the content of MDA in MSUD patients, indicating that DNA damage may be associated with the lipid peroxidation observed, and that probably there is an oxidative DNA damage in these patients. More recently, studies showed that L-carnitine treatment ( $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) reduced plasma MDA concentrations in patients with MSUD under treatment with protein-restricted diet [13]. Therefore, the protective role of L-carnitine could be attributed to its antioxidant functions scavenging free radicals and metal-chelating properties decreasing cytosolic iron, which has a vital role in free radical production [31,32]. L-Carnitine has also been reported to decrease lipid peroxidation and protect tissues from damage by repairing oxidized membrane lipids and decreasing MDA levels, besides facilitating fatty acid transport and therefore lowering the availability of lipids for peroxidation [33]. Still, it is important to note that in our study L-carnitine supplementation was held for a relatively short period of time, so that the evaluation of the use of this antioxidant in MSUD treatment for a longer period may be interesting in order to check for other benefits.

It is also of note that previous animal data have shown that accumulation of the major metabolite in MSUD induces DNA damage in the hippocampus and striatum of rats [34]. Furthermore, Mescka

et al. [19] evidenced that Leu and KIC induced DNA damage in peripheral whole blood leukocytes, which was prevented by L-car. Taken together, it is presumed that DNA damage may be caused by the metabolites accumulating in this disorder.

On the other hand, an important function of L-car, a small water-soluble molecule, is to act as a carrier for translocation of long-chain fatty acids from the cytosol into mitochondria for  $\beta$ -oxidation, therefore helping to keep energy supply in tissues that use fatty acids. Thus, although we cannot precise the causes of DNA damage prevention by L-car, one of the possible mechanisms involved on DNA protection after L-car administration in MSUD patients might be its ATP promotion action, which may induce protein phosphorylation involved in the synthesis and processing of nucleic acid [35]. In this scenario, it was reported that L-car may regulate DNA repair and also enhances the annealing effects by activation of DNA repair enzyme poly (ADP ribosyl) polymerase, a nuclear protein that is intimately linked with the occurrence of DNA strand breaks and also other related repair mechanisms [36]. Finally, we cannot rule out the possibility that L-car may decrease DNA damage due to its property of binding to the toxic metabolites accumulated in MSUD helping their urinary excretion that were shown to cause directly or indirectly DNA damage [16,37].

To the best of our knowledge, this is the first report demonstrating that DNA damage occurs in MSUD patients possibly as a result of oxidative stress, although other causes cannot be excluded. In this context, reactive oxygen and nitrogen species can provoke DNA damage by direct chemical attack on DNA, as well as by indirect mechanisms, such as activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -endonucleases and by interfering with enzymes of DNA replication and repair. Furthermore, oxidative damage can also lead to mutations whose pattern depends on the conformation of the bases of the genes, as well as on the repair efficiency, the type of polymerase and the conformation of the surrounding DNA affecting the accuracy of copying by polymerases [27].

In conclusion, L-carnitine supplementation to MSUD patients may represent a new therapeutic approach and a possible adjuvant to the current treatment of this disease.

#### Conflicts of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Acknowledgements

Very special thanks are dedicated to the physicians of the Medical Genetic Service of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, families and patients who participated in this study. This work was supported in part by grants from FAPERGS, CNPq and FIPE/HCPA-Brazil.

#### References

- [1] D.T. Chuang, V.E. Shih, Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria), in: C.R. Scriver, A.L. Beaudt, W.L. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 1971–2005.
- [2] E. Treacy, C.L. Clow, T.R. Reade, D. Chitayat, O.A. Mamer, C.R. Scriver, Maple syrup urine disease: interrelationship between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids: implications for treatment; associations with CNS dysmyelination, *J. Inher. Metab. Dis.* 15 (1992) 121–135.
- [3] K.A. Strauss, D.H. Morton, Branched-chain ketoacyl dehydrogenase deficiency: maple syrup disease, *Curr. Treat. Option Neurol.* 5 (2003) 329–341.
- [4] A. Sitta, G.S. Ribas, C.P. Mescka, A.G. Barschak, M. Wajner, C.R. Vargas, Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress, *Cell. Mol. Neurobiol.* 34 (2014) 157–165.
- [5] B. Hoffmann, C. Helbling, P. Schadewaldt, U. Wendel, Impact of longitudinal plasma leucine levels on the intellectual outcome in patients with classic MSUD, *Pediatr. Res.* 59 (2006) 17–20.
- [6] K.A. Strauss, B. Wardley, D. Robinson, C. Hendrickson, N.L. Rider, E.G. Puffenberger, D. Shellmer, A.B. Moser, D.H. Morton, Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design, *Mol. Genet. Metab.* 99 (2010) 333–345.
- [7] A.G. Barschak, A. Sitta, M. Deon, A.T. Barden, G.O. Schmitt, C.S. Dutra-Filho, M. Wajner, C.R. Vargas, Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma selenium concentration are reduced in maple syrup urine disease patients during treatment, *Int. J. Dev. Neurosci.* 25 (2007) 335–338.
- [8] A.G. Barschak, A. Sitta, M. Deon, A.T. Barden, C.S. Dutra-Filho, M. Wajner, C.R. Vargas, Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment, *Metab. Brain Dis.* 23 (2008) 71–80.
- [9] I. Gulcin, Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine, *Life Sci.* 78 (2006) 803–811.
- [10] G.E. Bigford, G. Del Rossi, Supplemental substances derived from foods as adjunctive therapeutic agents for treatment of neurodegenerative diseases and disorders, *Adv. Nutr.* 5 (2014) 394–403.
- [11] G.S. Ribas, V. Manfredini, J.F. de Mari, C.Y. Wayhs, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, A. Sitta, M. Deon, M. Wajner, C.R. Vargas, Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation, *Int. J. Dev. Neurosci.* 28 (2010) 127–132.
- [12] G.S. Ribas, G.B. Biancini, C. Mescka, C.Y. Wayhs, A. Sitta, M. Wajner, C.R. Vargas, Oxidative stress parameters in urine from patients with disorders of propionate metabolism: a beneficial effect of L-carnitine supplementation, *Cell. Mol. Neurobiol.* 32 (2012) 77–82.
- [13] C.P. Mescka, C.A. Wayhs, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, G. Guerreiro, V. Manfredini, C. Souza, M. Wajner, C.S. Dutra-Filho, C.R. Vargas, Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: L-carnitine effect, *Int. J. Dev. Neurosci.* 31 (2013) 21–24.
- [14] G.S. Ribas, A. Sitta, M. Wajner, C.R. Vargas, Oxidative stress in phenylketonuria: what is the evidence? *Cell. Mol. Neurobiol.* 31 (2011) 653–662.
- [15] M. Dos Santos Mello, G.S. Ribas, C.A. Wayhs, T. Hammerschmidt, G.B. Guerreiro, J.L. Favanzani, A. Sitta, D. de Moura Coelho, M. Wajner, C.R. Vargas, Increased oxidative stress in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, *Mol. Cell. Biochem.* 1–2 (2015) 149–155.
- [16] G.S. Ribas, C.R. Vargas, M. Wajner, L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic diseases, *Gene* 533 (2014) 469–476.
- [17] A. Sitta, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, V. Manfredini, A.B. de Oliveira, C.A. Wayhs, G.O. Ribas, L. Giugliani, I.V. Schwartz, D. Bohrer, S.C. Garcia, M. Wajner, C.R. Vargas, Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients, *Cell. Mol. Neurobiol.* 31 (2011) 429–436.
- [18] C. Mescka, T. Moraes, A. Rosa, P. Mazzola, B. Piccoli, C. Jacques, G. Dalazen, J. Coelho, M. Cortes, M. Terra, C. Regla Vargas, C.S. Dutra-Filho, In vivo neuro-protective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease, *Metab. Brain Dis.* 26 (2011) 21–28.
- [19] C.P. Mescka, C.A. Wayhs, G. Guerreiro, V. Manfredini, C.S. Dutra-Filho, C.R. Vargas, Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro, *Gene* 548 (2014) 294–298.
- [20] M.H. Joseph, C.A. Marsden, Amino acids and small peptides, in: C.F. Lim (Ed.), *HPLC of Small Peptides*, IRL Press, Oxford, 1986.
- [21] M. Wajner, D.M. Coelho, A.G. Barschak, P.R. Araujo, R.F. Pires, F.L. Lulhier, C.R. Vargas, Reduction of large neutral amino acid concentrations in plasma and CSF of patients with maple syrup urine disease during crises, *J. Inher. Metab. Dis.* 23 (2000) 505–512.
- [22] M. Karatepe, Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV, *LCGC N. Am.* 22 (2004) 362–365.
- [23] D.H. Chace, S.L. Hillman, J.L. Van Hove, E.W. Naylor, Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry, *Clin. Chem.* 43 (1997) 2106–2113.
- [24] N. Singh, M. McCoy, R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells, *Exp. Cell. Res.* 175 (1988) 184–191.
- [25] R.R. Tice, D. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.
- [26] S. Nadin, L. Vargas-Roig, D. Ciocca, A silver staining method for single-cell gel assay, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 1183–1186.
- [27] B. Halliwell, M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Oxford University Press Inc., New York, 2007.
- [28] J.L. Ravanat, J. Cadet, T. Douki, Oxidatively generated DNA lesions as potential biomarkers of in vivo oxidative stress, *Curr. Mol. Med.* 12 (2012) 655–671.
- [29] A.R. Collins, Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay, *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (2014) 794–800.
- [30] E. Cemeli, A. Baumgartner, D. Anderson, Antioxidants and the comet assay, *Mutat. Res.* 681 (2009) 51–67.
- [31] D. HariPriya, M. Devi, V. Kokilavani, P. Sangeetha, C. Panneerselvam, Age dependent alterations in mitochondrial enzymes in cortex, striatum and hippocampus of rat brain-potential role of L-carnitine, *Biogerontology* 5 (2004) 355–364.
- [32] T. Thangasamy, P. Jeyakumar, S. Sittadjody, A.G. Joyee, P. Chinnakannu, L-carnitine mediates protection against DNA damage in lymphocytes of aged rats, *Biogerontology* 10 (2009) 163–172.



- [33] P.J. Rani, C. Panneerselvam, Effect of L-carnitine on brain lipid peroxidation and antioxidant enzymes in old rats, *J. Gerontol. A: Biol. Sci. Med. Sci.* 57 (2003) 134–137.
- [34] G. Scaini, I.C. Jeremias, O.S. Morais, G.D. Borges, B.P. Munhoz, D.D. Leffa, V.M. Andrade, P.F. Schuck, G.C. Ferreira, E.L. Streck, DNA damage in an animal model of maple syrup urine disease, *Mol. Genet. Metab.* 106 (2012) 169–174.
- [35] G. Famularo, C. De Simone, V. Trinchieri, L. Mosca, Carnitines and its congeners: a metabolic pathway to the regulation of immune response and inflammation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1033 (2004) 132–138.
- [36] M.E. Boerighter, C. Franceschi, E. Arrigoni-Martelli, J.Y. Wei, J. Vijg, The effect of L-carnitine and acetyl L-carnitine on the disappearance of DNA single-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes, *Carcinogenesis* 14 (1993) 2131–2316.
- [37] G. Guerreiro, C.P. Mescka, A. Sitta, B. Donida, D. Marchetti, T. Hammerschmidt, J. Faverzani, D.M. Coelho, M. Wajner, C.S. Dutra-Filho, C.R. Vargas, Urinary biomarkers of oxidative damage in Maple syrup urine disease: the L-carnitine role, *Int. J. Dev. Neurosci.* 42 (2015) 10–14.

***ARTIGO III***

**INVESTIGATION OF INFLAMMATORY PROFILE IN MSUD PATIENTS:  
BENEFIT OF L-CARNITINE SUPPLEMENTATION**

Artigo publicado na revista Metabolic Brain Disease

Metab Brain Dis. 2015 May 24

## Investigation of inflammatory profile in MSUD patients: benefit of L-carnitine supplementation

Caroline Paula Mescka<sup>2,3</sup> · Gillian Guerreiro<sup>2,4</sup> · Bruna Donida<sup>2,3</sup> · Desirée Marchetti<sup>2,3</sup> · Carlos Alberto Yasin Wayhs<sup>2,4</sup> · Graziela Schmitt Ribas<sup>2</sup> · Adriana Simon Colútho<sup>5</sup> · Moacir Wajner<sup>2,3</sup> · Carlos Severo Dutra-Filho<sup>3</sup> · Carmen Regla Vargas<sup>1,2,3,4</sup>

Received: 2 March 2015 / Accepted: 15 May 2015  
© Springer Science+Business Media New York 2015

**Abstract** Maple Syrup Urine Disease (MSUD) is a metabolic disorder caused by a severe deficiency of the branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex activity which leads to the accumulation of branched-chain amino acids (BCAA) leucine (Leu), isoleucine and valine and their respective  $\alpha$ -keto-acids in body fluids. The main symptomatology presented by MSUD patients includes ketoacidosis, failure to thrive, poor feeding, apnea, ataxia, seizures, coma, psychomotor delay and mental retardation, but, the neurological pathophysiologic mechanisms are poorly understood. The treatment consists of a low protein diet and a semi-synthetic formula restricted in BCAA and supplemented with essential amino acids. It was verified that MSUD patients present L-carnitine (L-car) deficiency and this compound has demonstrated an antioxidant and anti-inflammatory role in metabolic diseases. Since there are no studies in the literature reporting the inflammatory profile of MSUD patients and the L-car role on the inflammatory response in this disorder, the present study evaluates

the effect of L-car supplementation on plasma inflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), interferon-gamma (INF-), and a correlation with malondialdehyde (MDA), as a marker of oxidative damage, and with free L-car plasma levels in treated MSUD patients. Significant increases of IL-1 $\beta$ , IL-6, and INF- were observed before the treatment with L-car. Moreover, there is a negative correlation between all cytokines tested and L-car concentrations and a positive correlation among the MDA content and IL-1 $\beta$  and IL-6 values. Our data show that L-car supplementation can improve cellular defense against inflammation and oxidative stress in MSUD patients and may represent an additional therapeutic approach to the patients affected by this disease.

**Keywords** Maple syrup urine disease · L-carnitine · Inflammation · Oxidative stress · Antioxidant

✉ Caroline Paula Mescka  
carolmescka@yahoo.com.br

<sup>1</sup> Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em CB:Bioquímica, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em CB:Fisiologia, UFRGS, Rua Sarmiento Leite, 500-90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

### Abbreviations

MSUD	Maple syrup urine disease
BCKAD	Branched chain $\alpha$ -keto acid dehydrogenase
BCAA	Branched-chain amino acid
Leu	Leucine
BCKA	Branched chain $\alpha$ -keto acids
KIC	$\alpha$ -ketoisocaproic acid
L-car	L-carnitine
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
INF-	Interferon-gamma
MDA	Malondialdehyde
ROS	Reactive oxygen species

## Introduction

Maple syrup urine disease (MSUD) is an inherited disorder caused by mutation in any of the 4 subunits (E1 $\alpha$ , E1 $\beta$ , E2, E3) of the branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase (BCKAD) enzyme complex. Due to BCKAD deficiency high concentrations of the branched-chain amino acids (BCAA) leucine (Leu), valine and isoleucine as well as the respective branched chain  $\alpha$ -keto acids (BCKA)  $\alpha$ -ketoisocaproic (KIC),  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvaleric and  $\alpha$ -keto acids  $\alpha$ -ketoisovaleric acids accumulate in patients on an unrestricted diet and during episodes of metabolic decompensation crisis (Chuang and Shih 2001; Chuang 1998). The worldwide frequency is approximately 1 in 180,000 newborns and patients can be divided into five phenotypes ranging from the classical form with a neonatal onset to milder variants with later onset (Chuang and Shih 2001).

The clinical features of classic MSUD include poor feeding, convulsions, failure to thrive, ketoacidosis, apnea, hypoglycemia, coma, ataxia, seizures, psychomotor delay and mental retardation. In addition, severe generalized brain edema, cerebral atrophy and hypomyelination are usually seen in MSUD patients, the mechanisms underlying brain damage is poorly known and needs to be exploited further explored (Chuang and Shih 2001; Schönberger et al. 2004). Literature has shown that Leu and its transamination product (KIC) are considered the main toxic metabolites to the central nervous system once their increased concentrations have been associated to the appearance of neurological symptoms (Chuang and Shih 2001; Hoffmann et al. 2006). Also, it has been demonstrated that the metabolites accumulated in MSUD can decrease neurotransmitter metabolism (Zielke et al. 1997; Tavares et al. 2000), leads to neuronal apoptosis (Jouvet et al. 2000), alter energy metabolism in rat brain (Sgaravatti et al. 2003; Ribeiro et al. 2008; Amal et al. 2010), reduce the uptake of essential amino acids by brain tissue (Araújo et al. 2001) and can reduce the ability to also modulate the damage associated to increased free radical production (Bridi et al. 2003, 2005a; b; Fontella et al. 2002).

Therapy for MSUD comprises a lifelong strict and carefully adjusted semi-synthetic diet with widely restricted amounts of protein, with low BCAA supplemented with a formula of essential amino acids, vitamins and minerals (Frazier et al. 2014). The goal of treatment is to protect the brain from functional disturbances and structural damage by keeping the plasma branched-chain metabolites continually close to normal range (Strauss et al. 2010). However, it has been already verified that MSUD patients under treatment present a marked deficiency in antioxidants compounds and this may possibly be secondary to the protein restricted diet that implies in smaller amounts of these micronutrients (Barschak et al. 2007; Sitta et al. 2014). In this context, recently it was

demonstrated that treated MSUD patients have L-carnitine deficiency, which can be obtained mainly from dietary protein supply (Mescka et al. 2013).

L-carnitine (L-car) or 3-hydroxy-4-methylammoniobutanoate regulates the flux substrate and energy balance across cell membranes by modulating both the transport of long-chain fatty acids into mitochondria and the subsequent  $\beta$ -oxidation. Foods of animal origin contain substantial amounts of L-car, but this compound is produced endogenously also in lesser amount using the amino acids lysine and methionine (Foster 2004). It has been demonstrated that L-car shows antioxidant capacity by reducing lipid peroxidation with a degree comparable to that observed with  $\alpha$ -tocopherol and also an antioxidant protective role by scavenging reactive oxygen species as superoxide anion, hydrogen peroxide and by inhibiting hydroxyl radical formation in the Fenton reaction system (Gulcin 2006; Reznick et al. 1992). There has been an increased number of studies reporting interesting effects of L-car on cells of the immune system (Izgüt-Uysal et al. 2003; Pertosa et al. 2005; Szeffel et al. 2012) and there are no data in the literature reporting the inflammatory profile of MSUD patients, much less the L-car role on the inflammatory response in this disorder. Hence, the present study was designed to investigate the effects of L-car supplementation on plasma inflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), and malondialdehyde (MDA), as a marker of oxidative stress, in treated MSUD patients, as well as to establish a possible relation between this parameters.

## Materials and methods

### Patients and controls

The study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil (project n° 140191). Informed consent was obtained according to the guidelines of our committee. Classical MSUD patients were recruited from the Medical Genetic Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Plasma samples were obtained from seven MSUD patients under protein restricted diet protocol (mean age 8.28 $\pm$ 2.87 years) and six healthy individuals (control group) with comparable age and sex (mean age 6.0 $\pm$ 3.12 years). The main features of patients with MSUD at diagnosis were convulsions, ketoacidosis, poor feeding, hypoglycemia and psychomotor delay. Dietary treatment (median 0.95 year – range 15 days to 9.83 years) consisted of a protein-restricted diet supplemented with a semi-synthetic formula of essential amino acids, vitamins and minerals and not containing L-car (MSUD 1 or MSUD 2 Milupa). Furthermore, for this study, MSUD patients were supplemented with L-car capsules, at a dose of 50 mg/kg/day, not exceeding 1.5 g/day for

2 months. Inflammatory cytokines, MDA and free L-car levels were analyzed in blood of MSUD patients before (No L-car) and after one (L-car 1) and 2 months (L-car 2) of L-car supplementation.

#### Biological sample collection and preparation

Blood samples from patients and controls were processed and stored by the same procedure. Blood samples from six age- and gender-matched controls (mean age  $6.0 \pm 3.12$  years) were recruited anonymously from the laboratory of Faculdade de Farmácia da UFRGS, RS, Brazil. After venous puncture and collection in heparinized vials, plasma and cells were separated by centrifugation at 3,000 g for 10 min at 4 °C. Plasma was removed by aspiration and stored at -80 °C until further analysis.

#### Inflammatory cytokines measurement: IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN-

Plasma IL-1 $\beta$ , IL-6 and IFN- were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Mabtech AB, Sweden). The assay utilizes ELISA strip plates pre-coated with a capture monoclonal antibody (mAb), to which samples are added. Captured cytokine is detected by adding a biotinylated mAb followed by streptavidin-horseradish peroxidase. Addition of the enzyme substrate TMB results in a colored substrate product. Intensity of the color is directly proportional to the concentration of cytokine in the sample, which is determined by comparison with a serial dilution of recombinant cytokine standard analyzed in parallel. The results were expressed as pg/mL.

#### MDA content

MDA was measured by following method described by Karatepe (2004). Briefly, 100  $\mu$ L of plasma was mixed with 100  $\mu$ L of 0.1 M perchloric acid and 1 mL of distilled water. The samples then were centrifugated at 1,500 g for 5 min and used for HPLC analysis. The column used was Supelcosil C18 (5  $\mu$ m) 15 cm  $\times$  4.6 mm, the mobile phase was 82.5:17.5 (v/v) 30 mM monobasic potassium phosphate (pH 3.6)-methanol and the flow rate was 1.2 mL/min. The detection was monitored at 250 nm. The system was calibrated with a standard solution of MDA, which was used for quantification. Results were expressed in  $\mu$ mol/L of MDA.

#### Free L-car determination

Free L-car levels were determined in blood spots by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), using the multiple reaction monitoring (MRM) mode (Chace et al. 1997). Results were reported in  $\mu$ mol/L.

#### Statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Comparison between means was analyzed for repeated measures of ANOVA followed by the Tukey multiple range test when the F value was significant. Correlations were carried out using the Pearson correlation coefficient. A p value lower than 0.05 was considered significant.

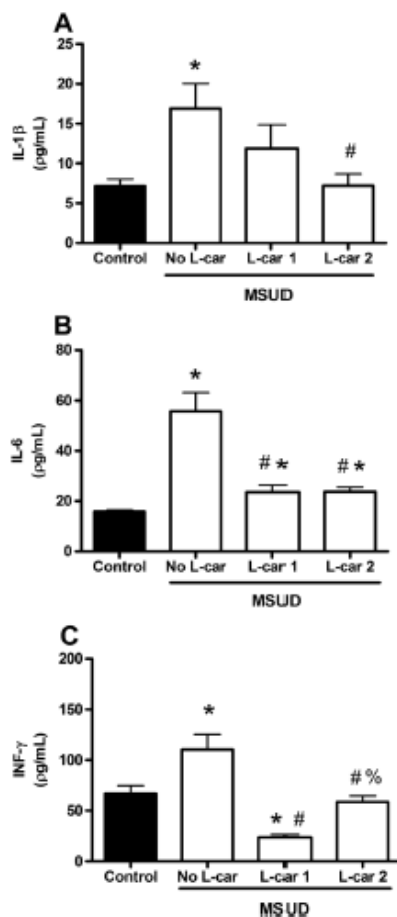
#### Results

In this study we evaluated the L-car supplementation effect on the inflammatory response in plasma from MSUD patients treated with a protein-restricted diet. The MSUD patients were divided into three groups: before supplementation with L-car (Group No L-car), after 1 month of L-car supplementation (L-car 1) and after 2 months of treatment with this compound (L-car 2). The MSUD patients under treatment (Group No L-car) have L-car deficiency compared to control group. After 1 month of L-car supplementation (L-car 1), the concentrations of this micronutrient have reached levels comparable to the control group (Control Group:  $43.85 \pm 8.89$   $\mu$ mol/L; Group No L-car:  $24.28 \pm 10.83$   $\mu$ mol/L; Group L-car 1:  $49.01 \pm 8.60$   $\mu$ mol/L; L-car 2:  $53.18 \pm 10.79$   $\mu$ mol/L) [F (3, 22)=6.253,  $p < 0.05$ ]. The lipid peroxidation levels (measured as plasma malondialdehyde) were significantly elevated compared to controls and a reversal of lipid peroxidation to control levels occurred in 2 months of L-car therapy (Group L-car 2) (Control Group:  $0.027 \pm 0.003$   $\mu$ mol/L; Group No L-car:  $0.087 \pm 0.006$   $\mu$ mol/L; Group L-car 1:  $0.038 \pm 0.003$   $\mu$ mol/L; L-car 2:  $0.035 \pm 0.003$   $\mu$ mol/L) [F (3,29)=19.541,  $p < 0.05$ ] (Mescka et al. 2013).

Thereafter, we examined the L-car supplementation influence on the inflammatory profile in MSUD patients. It was found that MSUD patients (Group No L-car) have significantly increased pro-inflammatory cytokines levels compared to the control group. L-car supplementation (Group L-car 1 and Group L-car 2) induced a reversion of IL-1 $\beta$  [F (3,22)=6.032,  $p < 0.05$ ] and IFN- [F (3,24)=10.84,  $p < 0.05$ ] concentrations to control levels (Fig. 1a and b, respectively) and a reduction of IL-6 close to control levels [F (3,24)=37.69,  $p < 0.05$ ] (Fig. 1c).

As it can be seen in Fig. 2, strongly significant inverse correlations between free L-car levels and IL-1 $\beta$  ( $r = -0.7505$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 2a), IL-6 ( $r = -0.8235$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 2b), and IFN- ( $r = -0.6279$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 2c) concentrations were observed, indicating a possible L-car anti-inflammatory role in the plasma of patients MSUD.

Lastly, we found significant positive correlations between MDA values and IL-1 $\beta$  ( $r = 0.6645$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 3a), IL-6 ( $r = 0.5197$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 3b) and IFN- did not show significant

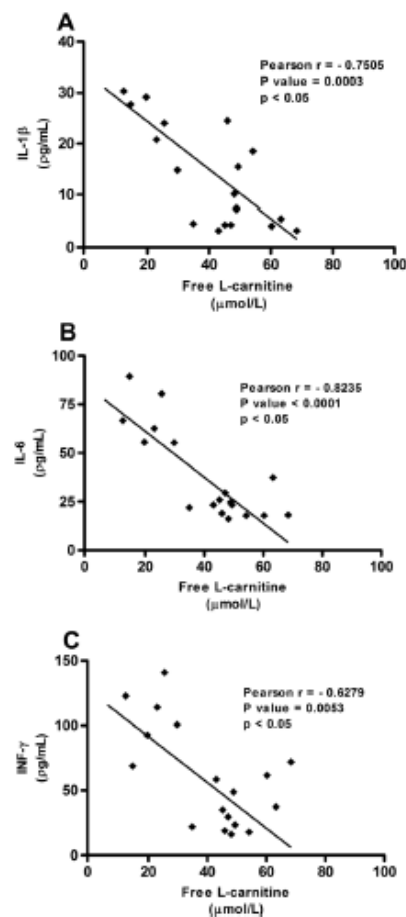


**Fig. 1** a interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), b interleukin-6 (IL-6), c interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) measurements in plasma of MSUD patients and controls. Group No L-car: patients before supplementation with L-car. Group L-car 1: patients after 1 month of L-car supplementation. Group L-car 2: patients after 2 months of L-car supplementation. Data represent the mean $\pm$ SD. Number of MSUD patients=5–7. Number of controls=6. \* $p$ <0.05 compared to controls, # $p$ <0.05 compared to Group No L-car, # $P$ <0.05 compared to Group L-car 1 (Tukey multiple range test)

correlation with MDA concentrations ( $r=0.1616$ ;  $p>0.05$ , Fig. 3c).

## Discussion

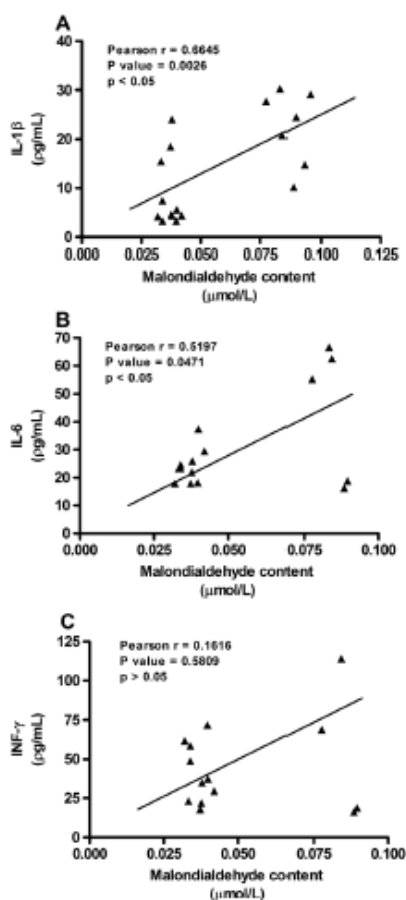
Inflammation occurs in response to any alteration of tissue integrity, in order to restore tissue homeostasis through the induction of various repair mechanisms (Muriach et al. 2014). During this dysregulation of physiological functions, occurs a local and finally a systemic inflammation that is



**Fig. 2** Correlation between a interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), b interleukin-6 (IL-6), c interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) measurement vs. free L-carnitine (L-car) levels in plasma of MSUD patients (Number of MSUD patients samples=14–18). Graphs show the Pearson correlation coefficient and probabilities

characterized by production of high levels of reactive oxygen species (ROS) and can leads to oxidative stress and damage of biomolecules, such as proteins, lipids and DNA (Brüne et al. 2013).

There are few studies that correlate inflammatory processes with MSUD. It has been shown that BCAAs are able to influence the immunological properties of microglia cell culture by changing the responsiveness to pro-inflammatory signals (De Simone et al. 2013). Furthermore, Scaini et al. (2014) suggest that this inflammatory process associated with high levels of BCAA may contribute to a blood brain barrier breakdown in patients MSUD and its can be related to the neurological dysfunction observed in this disorder. Clinically is well described



**Fig. 3** Correlation between **a** interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), **b** interleukin-6 (IL-6) and **c** interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) measurement vs. malondialdehyde (MDA) levels in plasma of MSUD patients (Number of MSUD patients samples=14–18). Graphs show the Pearson correlation coefficient and probabilities

that inflammatory process, such as infection, may often precipitate acute metabolic decompensation with complications in MSUD patients (Chuang and Shih 2001), but in the best of our knowledge there are no studies in the literature reporting the inflammatory profile of MSUD patients, much less the possible L-car role on the inflammatory response in this disorder.

Therefore, in our study, it was observed that MSUD patients in treatment with restricted protein diet and without L-car supplementation have high levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and IFN- $\gamma$  in relation to the control group. After the beginning of L-car treatment, there was a significant decrease in the levels of these cytokines to concentrations similar to the control group, demonstrating that L-car was able

to reverse the inflammatory process modulated by these cytokines. These pro-inflammatory cytokines are increased during immune activation and inflammation and can induce the production of oxidants, prostaglandins, and mitochondrial ROS by macrophages, thus contributing to inflammatory responses (Muralidharan and Mandrekar 2013). Macrophages and monocytes are the major source of IL-1 $\beta$ , molecule able to induce inflammatory and proapoptotic responses mediated by factors such as prostaglandins, ROS, inducible NO synthase, and NO. IL-6 is a pleiotropic cytokine that affects immune responses and antigen-specific inflammatory reactions being a major mediator of the acute phase inflammation and can be produced by several cell types, including T and B cells, monocytes, macrophages, fibroblasts and endothelial cells. The cytokine IFN- $\gamma$  is mainly produced by T helper cell type 1 (Th1) lymphocytes, natural killer (NK) cells, B cells and NK T cells. During Th1-type response, IFN- $\gamma$  is probably the most important trigger for high ROS production in macrophages by phagocytic NADPH oxidase (NOX).

There was also an inverse significant correlation between the inflammatory markers analyzed and the L-car concentrations, showing a possible anti-inflammatory effect of this compound, since L-car supplementation significantly decreased the inflammatory markers tested. Moreover, there was a positive significant correlation in plasma of MSUD patients between pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6 and MDA values, the main marker of lipid peroxidation. These results evidence a possible direct relationship between inflammation and increased oxidative stress in MSUD patients.

Patients with inflammatory diseases usually exhibit antioxidants reduced levels, which might be due to insufficient nutritional intake or caused by an to increased antioxidant demand for oxidation due to continuous high levels ROS production by the activation of immune competent cells (Muñoz and Costa 2013; Mangge et al. 2014). Thus, the finding of an inverse correlation between L-car concentrations and inflammatory cytokines could be related to an insufficient dietetic supply of this compound and an increased requirement for antioxidant molecules during inflammatory episodes and this may contribute to decompensation metabolic crisis in MSUD patients.

L-car is considered nowadays one of the nutraceuticals that has pleiotropic crucial biologic effects. L-car deficiency may cause damage to cellular metabolism, which can be primary, as a result of defects in the specific transport of L-car into the cells, or secondary, as reported in some inborn errors of metabolism and acquired medical conditions such as organic aciduria, mitochondrial respiratory chain defects and methylenetetrahydrofolate reductase deficiency (Famularo and De Simone 1995; Shakeri et al. 2010; Ribas et al. 2014). Various pathological disorders including epilepsy, cirrhosis, malabsorption have been also associated with secondary L-

car deficiency and oral dosage forms are nowadays approved by the US Food and Drug Administration for primary and secondary systemic L-car deficiency. Some unlabeled uses of this compound are for the treatment or prophylaxis of valproate toxicity, Alzheimer's disease, muscle disorders, cardiovascular diseases, HIV infection, and male infertility (Hatamkhani et al. 2013).

The most important recognized functions of the L-car are transport of long-chain fatty acid across the inner mitochondrial membrane, where  $\beta$ -oxidation occurs, and the removal from the mitochondria of potentially toxic end-products of fatty acid metabolism. However, a series of studies have been performed to determine L-car effect on cells of the immune system. Several data indicate that L-car deficiency is a contributing factor to the progression of infection in patients with human immunodeficiency virus, and that L-car therapy in those patients could counteract the unregulated process of lymphocyte apoptosis and improve CD4 counts (Famularo et al. 2004). Izgüt-Uysal and colleagues (2003) demonstrate that L-car is capable to restore the age-related changes in the inflammatory cells functions and play a protective role in the tissue destruction in inflammation by decreasing the superoxide anion production. Other studies have shown that L-car has a therapeutic effect on morbidity and lipid metabolism in cachexia and septic shock rat models, and that these effects could be the result of down-regulation of cytokine production and/or increased clearance of cytokines (Winter et al. 1995). Regular L-car supplementation in hemodialysis patients demonstrated to increase cellular defense against chronic inflammation and oxidative stress, most likely by modulating the specific signal transduction cascade activated by an overproduction of pro-inflammatory cytokines and free radicals action (Pertosa et al. 2005).

Although the L-car actions in the brain are not yet fully established, in the last years studies in animals and cells have demonstrated numerous neuroprotective, neuromodulatory and neurotrophic properties of this compound (Ribas et al. 2014). However, there are no data in the literature showing an improvement in the clinical condition of MSUD patients supplemented with L-car, but there are few and recent reports of clinical improvement in other disorders. For instance, Cuturic et al. (2013) observed in Huntington's disease, that the patients with low serum L-car levels who received low-dose of levocarnitine supplementation, during a mean period of 7.3 months, showed improvement in motor, cognitive and behavioral measures. They speculated that the observed clinical improvement is related with the resolution of reversible metabolic encephalopathy and myopathy associated with secondary carnitine deficiency. In a randomized, double-blind, placebo-controlled study, it was verified an improvement of cognitive deficits, the reduction of ammonia, and the modification of electroencephalogram analysis in treated L-car patients with severe hepatic encephalopathy (Malaguarnera et al.

2011a). The same research group also showed that acetyl-L-carnitine reduces depression and improves life quality in patients with minimal hepatic encephalopathy (Malaguarnera et al. 2011b).

L-car supplementation has been usually considered safe and with low risk of adverse effects, which makes it a promising candidate for the prevention and treatment of oxidative alterations in many diseases. It is important to emphasize that supplementation with L-car in MSUD patients of our study, who were deficient in L-car, was held for a period of 2 months, and perhaps the clinical improvement effects of the administration would be better evaluated in a long-term treatment. Moreover, it was verified a higher excretion of KIC, the major neurotoxic acid accumulated in this disorder, in the urine of MSUD patients treated with L-car, what reinforces the importance of this compound in the elimination of the toxic metabolites in these patients (Guerreiro et al. 2015). These findings may represent a new perspective for the use of L-car as a possible antioxidant adjunct treatment. For this purpose, we intended to do in a future a translational and clinical study to fully explore this potential.

Evidence accumulated over the past decades has pointed to significant connections between inflammation and oxidative stress, both processes contributing to fuel the other one, thereby establishing a vicious cycle able to perpetuate and propagate the inflammatory response (Lugrin et al. 2014). Taken together, these data highlight that the maintenance of normal L-car concentrations in MSUD patients could have an important role in inflammatory process. The L-car system seems to be a relevant endogenous physiologic mediator to protect against damage during the inflammatory response and the unregulated production of ROS can act as a major factor in triggering cell injury. This study showed a possible beneficial influence of L-car supplementation on immune system functions in MSUD patients. Furthermore, we suggest that L-car could be useful in MSUD therapy representing a new approach to the current treatment, which consists of protein-restricted diet. Future studies will examine the mechanism of the reduction of cytokine levels by L-car determining whether L-car lowers its levels by increasing clearance, or by reducing production of cytokines in MSUD.

**Acknowledgments** Very special thanks are dedicated to the physicians at the Medical Genetic Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, families and patients who participated in this study. This work was supported in part by grants from FAPERGS, CNPq and FINEP/HCPA-Brazil.

**Conflict of interest** The authors declare that there are no conflicts of interest.

**Ethical approval** All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.



## References

- Amaral AU, Leipnitz G, Fernandes CG et al (2010) Alpha-ketoglutaric acid and leucine provokes mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Res* 1324:75–84
- Araújo P, Wassermann GF, Tallini K et al (2001) Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem Int* 38:529–537
- Barschak AG, Sitta A, Deon M et al (2007) Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma selenium concentration are reduced in maple syrup urine disease patients during treatment. *Int J Dev Neurosci* 25:335–338
- Bridi R, Araldi J, Sgarbi M et al (2003) Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Dev Neurosci* 21:327–332
- Bridi R, Latini A, Braum CA et al (2005a) Evaluation of the mechanisms involved in leucine-induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic Res* 39:71–79
- Bridi R, Braum CA, Zorzi GK et al (2005b)  $\alpha$ -Keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defenses in cerebral cortex from young rats. *Metab Brain Dis* 20:155–167
- Brüne B, Dehne N, Grossmann N et al (2013) Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid Redox Signal* 19:595–637
- Chace DH, Hillman SL, Van Hove JL, Naylor EW (1997) Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 43:2106–2113
- Chuang DT (1998) Maple syrup urine disease: it has come a long way. *J Pediatr* 132:17–23
- Chuang DT, Shih VE (2001) Maple syrup urine disease (branched-chain ketosiduria). In: Scriver CR, Beaudt AL, Sly WL, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 1971–2005
- Cuticic M, Abramson RK, Moran RR et al (2013) Serum carnitine levels and levocarnitine supplementation in institutionalized Huntington's disease patients. *Neurol Sci* 34:93–98
- De Simone R, Vissicchio F, Mingarelli C et al (2013) Branched-chain amino acids influence the immune properties of microglial cells and their responsiveness to pro-inflammatory signals. *Biochim Biophys Acta* 1832:650–659
- Famularo G, De Simone C (1995) A new era for carnitine? *Immunol Today* 16:211–213
- Famularo G, De Simone C, Trinchieri V, Mosca L (2004) Carnitines and its congeners: a metabolic pathway to the regulation of immune response and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1033:132–138
- Fontella FU, Gassen E, Pultronik V et al (2002) Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 17:47–54
- Foster DW (2004) The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann NY Acad Sci* 1033:1–16
- Frazier DM, Allgeier C, Homer C et al (2014) Nutrition management guideline for maple syrup urine disease: an evidence- and consensus-based approach. *Mol Genet Metab* 112:210–217
- Guerreiro G, Mescka CP, Sitta A et al (2015) Urinary biomarkers of oxidative damage in maple syrup urine disease: the L-carnitine role. *Int J Dev Neurosci* 42:10–14
- Gulcin I (2006) Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci* 78:803–811
- Hatamkhani S, Karimzadeh I, Elyasi S et al (2013) Carnitine and sepsis: a review of an old clinical dilemma. *J Pharm Pharm Sci* 16:414–423
- Hoffmann B, Helbling C, Schadowaldt P, Wendel U (2006) Impact of longitudinal plasma leucine levels on the intellectual outcome in patients with classic MSUD. *Pediatr Res* 59:17–20
- Izgüt-Uysal VN, Ağaç A, Derin N (2003) Effect of L-carnitine on carrageenan-induced inflammation in aged rats. *Gerontology* 49:287–292
- Jouvet P, Rustin P, Taylor DL et al (2000) Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. *Mol Biol Cell* 11:1919–1932
- Karatepe M (2004) Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC–UV. *LCGC N Am* 22:362–365
- Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L (2014) The role of oxidative stress during inflammatory process. *Biol Chem* 395:203–230
- Malaguamara M, Vacante M, Motta M et al (2011a) Acetyl-L-carnitine improves cognitive functions in severe hepatic encephalopathy: a randomized and controlled clinical trial. *Metab Brain Dis* 26:281–289
- Malaguamara M, Bella R, Vacante M et al (2011b) Acetyl-L-carnitine reduces depression and improves quality of life in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Scand J Gastroenterol* 46:750–759
- Mangge H, Becker K, Fuchs D, Gostner JM (2014) Antioxidants: inflammation and cardiovascular disease. *World J Cardiol* 6:462–477
- Mescka CP, Wayhs CA, Vanzin CS (2013) Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: L-carnitine effect. *Int J Dev Neurosci* 31:21–24
- Muñoz A, Costa M (2013) Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation. *Oxidative Med Cell Longev* 2013:610950
- Muralidharan S, Mandrekar P (2013) Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. *J Leukoc Biol* 94:1167–1184
- Muriach M, Flores-Bellver M, Romero FJ, Barcia JM (2014) Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy. *Oxidative Med Cell Longev* 2014:102158
- Pertosa G, Grandaliano G, Simone S et al (2005) Inflammation and carnitine in hemodialysis patients. *J Ren Nutr* 15:8–12
- Reznick AZ, Kagan VE, Ramsey R et al (1992) Antiradical effects in L-propionyl carnitine protection of the heart against ischemia-reperfusion injury: the possible role of iron chelation. *Arch Biochem Biophys* 296:394–401
- Ribas GS, Vargas CR, Wajner M (2014) L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene* 533:469–476
- Ribeiro CA, Sgaravati AM, Rosa RB et al (2008) Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res* 33:114–124
- Scaini G, Morais MO, Galant LS et al (2014) Coadministration of branched-chain amino acids and lipopolysaccharide causes matrix metalloproteinase activation and blood–brain barrier breakdown. *Mol Neurobiol* 50:358–367
- Schönberger S, Schweiger B, Schwahn B et al (2004) Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab* 82:69–75
- Sgaravati AM, Rosa RB, Schuck PF et al (2003) Inhibition of brain energy metabolism by the  $\alpha$ -keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 1639:232–238
- Shakeri A, Tabibi H, Hedayati M (2010) Effects of L-carnitine supplement on serum inflammatory cytokines, C-reactive protein, lipoprotein (a) and oxidative stress in hemodialysis patients with Lp (a) hyperlipoproteinemia. *Hemodial Int* 14:498–504
- Sitta A, Ribas GS, Mescka CP et al (2014) Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. *Cell Mol Neurobiol* 34:157–165
- Strauss KA, Wardley B, Robinson D et al (2010) Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design. *Mol Genet Metab* 99:333–345

- Szefel J, Kruszczyński WJ, Ciesielski M et al (2012) L-carnitine and cancer cachexia. II. Effects of lipid emulsion used in total parenteral nutrition on parameters of hemostasis and inflammatory state in L-carnitine deficiency in myocytes. *Oncol Rep* 28:324–329
- Tavares RG, Santos CE, Tasca CI et al (2000) Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *J Neurol Sci* 181:44–49
- Winter BK, Fiskum G, Gallo LL (1995) Effects of L-carnitine on serum triglyceride and cytokine levels in rat models of cachexia and septic shock. *Br J Cancer* 72:1173–1179
- Zielke HR, Huang Y, Baab PJ et al (1997) Effect of alpha-ketoglutarate and leucine on the in vivo oxidation of glutamate and glutamine in the rat brain. *Neurochem Res* 22:1159–1164

## *ARTIGO IV*

### **URINARY BIOMARKERS OF OXIDATIVE DAMAGE IN MAPLE SYRUP URINE DISEASE: THE L-CARNITINE ROLE**

Artigo publicado na revista International Journal of Developmental Neuroscience

Int J Dev Neurosci. 42:10-14, 2015.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Developmental Neuroscience

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijdevneu](http://www.elsevier.com/locate/ijdevneu)

## Urinary biomarkers of oxidative damage in Maple syrup urine disease: The L-carnitine role



Gilian Guerreiro<sup>a</sup>, Caroline Paula Mescka<sup>c,\*</sup>, Angela Sitta<sup>b</sup>, Bruna Donida<sup>d</sup>, Desirée Marchetti<sup>b</sup>, Tatiane Hammerschmidt<sup>a</sup>, Jessica Faverzani<sup>a</sup>, Daniella de Moura Coelho<sup>b</sup>, Moacir Wajner<sup>b,c</sup>, Carlos Severo Dutra-Filho<sup>c</sup>, Carmen Regla Vargas<sup>a,b,c,d</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 November 2014

Received in revised form 8 February 2015

Accepted 8 February 2015

Available online 10 February 2015

#### Keywords:

Maple syrup urine disease

L-Carnitine

Oxidative stress

Antioxidant

Urine

### ABSTRACT

Maple syrup urine disease (MSUD) is a disorder of branched-chain amino acids (BCAA). The defect in the branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex activity leads to an accumulation of these compounds and their corresponding  $\alpha$ -keto-acids and  $\alpha$ -hydroxy-acids. Studies have shown that oxidative stress may be involved in neuropathology of MSUD. L-carnitine (L-car), which has demonstrated an important role as antioxidant by reducing and scavenging free radicals formation and by enhancing the activity of antioxidant enzymes, have been used in the treatment of some metabolic rare disorders. This study evaluated the oxidative stress parameters, di-tyrosine, isoprostanes and antioxidant capacity, in urine of MSUD patients under protein-restricted diet supplemented or not with L-car capsules at a dose of 50 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>. It was also determined urinary  $\alpha$ -keto isocaproic acid levels as well as blood free L-car concentrations in blood. It was found a deficiency of carnitine in patients before the L-car supplementation. Significant increases of di-tyrosine and isoprostanes, as well as reduced antioxidant capacity, were observed before the treatment with L-car. The L-car supplementation induced beneficial effects on these parameters reducing the di-tyrosine and isoprostanes levels and increasing the antioxidant capacity. It was also showed a significant increase in urinary of  $\alpha$ -ketoisocaproic acid after 2 months of L-car treatment, compared to control group. In conclusion, our results suggest that L-car may have beneficial effects in the treatment of MSUD by preventing oxidative damage to the cells and that urine can be used to monitorize oxidative damage in patients affected by this disease.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Maple syrup urine disease (MSUD) is a metabolic disease caused by a severe deficiency of the branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydro-

genase complex (BCKAD) activity. The blockage of this pathway leads to the accumulation in tissues and body fluids of branched-chain amino acids (BCAA) leucine (Leu), isoleucine and valine and their respective  $\alpha$ -keto-acids,  $\alpha$ -ketoisocaproic acid (KIC),  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvaleric acid and  $\alpha$ -ketoisovaleric acid, as well as the corresponding  $\alpha$ -hydroxy acids, the  $\alpha$ -hydroxyisocaproate,  $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -methylvalerate and the  $\alpha$ -hydroxyisovalerate (Treacy et al., 1992; Chuang and Shih, 2001; Harris et al., 2004).

Based on the clinical presentation and biochemical responses to thiamine administration, MSUD patients can be divided into five phenotypes: classic, intermediate, intermittent, thiamine-responsive and dihydrolipoil dehydrogenase (E3) deficient (Chuang and Shih, 2001). The main signs and symptoms presented by MSUD patients include psychomotor delay and mental retardation, coma, convulsions, poor feeding, apnea, ataxia, ketoacidosis, hypoglycemia, as well as generalized edema and

**Abbreviations:** ABTS, 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate; BCAA, branched-chain amino acids; BCKAD, branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase; Di-tyr, di-tyrosine; ELISA, enzyme-linked immunoassay; GC/MS, gas chromatography–mass spectrometry; HPLC, high-pressure liquid chromatography; HRP, horseradish peroxidase; KIC,  $\alpha$ -ketoisocaproic acid; Leu, leucine; L-car, L-carnitine; LC/MS/MS, liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry; MRM, multiple reaction monitoring; MSUD, Maple syrup urine disease.

\* Corresponding author at: Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33598011; fax: +55 51 33598010.

E-mail address: [carolmescka@yahoo.com.br](mailto:carolmescka@yahoo.com.br) (C.P. Mescka).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.02.003>

0736-5748/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

hypomyelination/demyelination evidenced by magnetic resonance imaging studies of the central nervous system. The MSUD treatment consists of a low protein diet and a semi-synthetic formula poor in BCAA and supplemented by essential amino acids, vitamins and minerals (Chuang and Shih, 2001; Sitta et al., 2014) and the aim of the MSUD treatment is to keep the BCAA plasma concentrations in appropriate levels in order to minimize the brain damage found in MSUD patients without treatment or in metabolic crisis (Chuang and Shih, 2001; Wendel and Ogier de Baulny, 2006). The mechanisms involved in the neurological symptoms presented by MSUD patients are still poorly understood. However, several studies have demonstrated that Leu and/or KIC are the main neurotoxic metabolites in MSUD, and that high concentrations of these metabolites can be associated with the appearance of neurological symptoms (Chuang and Shih, 2001). The metabolites accumulated in this disease provoke convulsions (Coitinho et al., 2001), neuronal apoptosis (Jouvet et al., 2000), impairment of neurotransmitter synthesis (Zielke et al., 1997; Tavares et al., 2000), myelin alteration (Treacy et al., 1992) and affect energy metabolism in rat brain (Sgaravatti et al., 2003).

L-carnitine (L-car) is a highly polar quaternary amine that plays important metabolic functions in the organism, like transport of long-chain fatty acids across the inner mitochondrial membrane for utilization in  $\beta$ -oxidation. Furthermore, this compound has demonstrated antioxidant activity by reducing and scavenging free radicals and by enhancing the activity of enzymes involved in the defense against reactive species (Gulcin, 2006). It was verified that MSUD patients have L-car deficiency, since this compound is obtained mainly from protein food (Mescka et al., 2013; Sitta et al., 2014), which can cause antioxidant defenses impairment (Borglund et al., 1989; Barschak et al., 2006, 2007, 2008). Recent studies have demonstrated an increase of plasma antioxidant status in patients with inborn errors of metabolism supplemented with L-car (Ribas et al., 2010; Mescka et al., 2011, 2013; Sitta et al., 2011). There are no studies in literature focusing urinary amino acids,  $\alpha$ -keto acids,  $\alpha$ -hydroxy acids and oxidative stress parameters in MSUD treated patients. It is important to emphasize that BCAA metabolites are highly excreted in urine in this disease.

Thus, in this study, we extend our previous publication concerning the L-car effect in plasma from MSUD individuals (Mescka et al., 2013), evaluating oxidative stress parameters, as well as  $\alpha$ -keto isocaproic acid concentration in urine of treated MSUD patients, supplemented or not with L-car. Our objective was to investigate a possible association between L-car and oxidative stress in urine, since this biological fluid could be used for monitoring oxidative biomarkers in this disease.

## 2. Material and methods

### 2.1. Patients, controls and biological samples

In this study it was studied seven patients (mean age, at the time of blood collection,  $8.28 \pm 2.87$  years) with late diagnosis of classical MSUD under protein restricted diet following the treatment protocol from Medical Genetic Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil, which were diagnosed by elevated plasma BCAA levels. Whole blood on filter paper was used to evaluate free L-car levels, plasma was used to quantify amino acid and urine samples were used to determine oxidative stress the parameters and to measure KIC concentration.

Dietary treatment (median duration 0.95 year – range from 15 days to 9.83 years) consisted of protein-restricted diet supplemented with a semi-synthetic formula of essential amino acids (except leucine, isoleucine and valine), vitamins and minerals not containing L-car (MSUD 2-Milupa®). The diet contained the

following amounts of Leu (before 12 months of age:  $40\text{--}80\text{ mg kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$ ; after 1 year of age:  $275\text{--}535\text{ mg kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$ ), Ile (before 12 months of age:  $20\text{--}50\text{ mg kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$ ; after 1 year of age:  $165\text{--}325\text{ mg kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$ ) and Val (before 12 months of age:  $20\text{--}60\text{ mg kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$ ; after 1 year of age:  $190\text{--}375\text{ mg kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$ ). In addition, MSUD patients were supplemented for 2 months with L-car capsules, fractionated and mixed with the formula of amino acids, at a dose of  $50\text{ mg kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$ , not exceeding  $1.5\text{ g day}^{-1}$ . Oxidative stress parameters, amino acids, KIC and free L-car levels were analyzed in MSUD patients before (Group A) and after one (Group B) and 2 months (Group C) of L-car supplementation. The control group consisted of samples from six aged-matched healthy children (mean age at the time of blood collection,  $6.0 \pm 3.12$  years). The study was approved by the Ethics Committee of HCPA, RS, Brazil. All parents of the patients included in the present study gave informed consent.

### 2.2. Amino acids determination

Amino acids were determined in plasma by high-pressure liquid chromatography (HPLC) method according to (Joseph and Marsden, 1986). The quantification was performed by relating the chromatographic peak area of each amino acid to those obtained from a known standard solution and to the peak area of the internal standard (homocysteic acid) with known concentration. Results were expressed in  $\mu\text{mol/L}$ .

### 2.3. Alfa-keto isocaproic acid determination

Alfa-keto isocaproic acid (KIC) was determined in urine by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS) according to (Sweetmann, 1995), using hexadecane and heptadecanoic acid as internal standards. The quantification was performed by relating the metabolites chromatographic peak area to those obtained from a known standard solution for each metabolite and to that of internal standard peak area. Results were expressed in  $\mu\text{mol/L}$ . The correction by creatinine was performed at the beginning of analysis, and the volume used for the quantification varied according to creatinine of each sample.

### 2.4. Free L-carnitine determination

Free L-car levels were determined in blood spots by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) using the multiple reaction monitoring (MRM) mode (Chace et al., 1997) and the results were reported in  $\mu\text{mol/L}$ .

### 2.5. 15-F2t-isoprostane determination

15-F2t-isoprostane, a product of arachidonic acid metabolism and a biomarker of lipid peroxidation, was measured by a competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) (Oxford Biomed, EA 85), according to the kit's instructions. First, the urine samples were mixed with dilution buffer. In this assay, the 15-F2t-isoprostane in the urine samples competes with the 15-F2t-isoprostane conjugated to horseradish peroxidase (HRP) for the binding to a specific antibody fixed on the microplate. The concentration of 15-F2t-isoprostane was determined by the intensity of color developed after addition of substrate (wavelength at 630 nm). Results were expressed as nanograms of isoprostanes per mg of urinary creatinine.

### 2.6. Di-tyrosine autofluorescence determination

Di-tyrosine (di-tyr) content, used to analyze in urine the levels of protein oxidation, was measured by autofluorescence, according to Kirschbaum (2002). For di-tyr fluorescence determination,  $50\ \mu\text{L}$

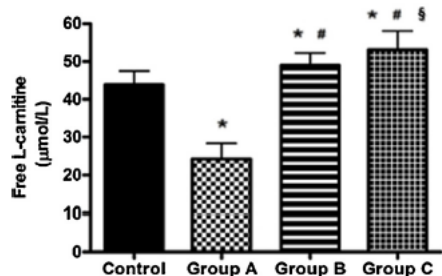


Fig. 1. Free L-carnitine measurement in blood spots from MSUD patients and controls by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Group A represents MSUD patients before treatment with L-car. Group B and C represent MSUD patients after 1 and 2 months of L-car supplementation, respectively. Data represent the mean  $\pm$  SD. Number of MSUD patients = 7–4. Number of controls = 6. \*  $P < 0.05$  compared to controls, #  $P < 0.05$  compared to Group A, §  $P < 0.05$  compared to Group B.

of thawed urine was added to 950  $\mu$ L of 6 mol/L urea in 20 mmol/L sodium phosphate buffer pH 7.4. After 30 min, the concentration was measured using a fluorometer (excitation 315 nm, emission 410 nm). Results were expressed as fluorescence units per mg urine creatinine (Kirschbaum, 2002).

### 2.7. Antioxidant capacity determination

The urinary antioxidant capacity was determined using a chemical assay (Antioxidant Assay Kit Cayman Chemical, 709001). This assay measures the capacity of antioxidants in the urine to inhibit the oxidation of 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate (ABTS) by metmyoglobin. This reaction can be monitored by detecting the absorbance at 750 nm and the inhibition of the oxidation is proportional to antioxidants concentration. A standard curve using Trolox, a water-soluble tocopherol analogue, is used to calculate the capacity of the antioxidants in preventing the ABTS oxidation. Urinary antioxidant status was expressed as micromolar trolox equivalents.

### 2.8. Statistical analyzes

Comparison between means was analyzed by repeated measures ANOVA followed by the Tukey multiple range test for parametric data and Friedman test followed by Dunn's multiple comparison test for nonparametric values when the  $F$  value was significant ( $P < 0.05$ ). Correlations were carried out using the Pearson correlation coefficient.

## 3. Results

Fig. 1 shows the measurement of free L-car in blood spots from MSUD patients, before and after the supplementation, and controls. The results demonstrated that MSUD patients had significantly reduced free L-car levels before the treatment (Group A) compared to control group. The supplementation with L-car was able to reverse this deficiency once it was observed a significant increase of L-car levels after 1 (Group B) and 2 (Group C) months of treatment [ $F(3,19) = 6.253$ ,  $P < 0.05$ ].

It were measured the levels of Leu in plasma from MSUD patients, before and after the treatment, and controls. We found the follow values, expressed in  $\mu$ mol/L: controls =  $130.75 \pm 27.16$ , Group A =  $178.18 \pm 58.59$ , Group B =  $264.57 \pm 136.74$ , Group C =  $278 \pm 105.55$ . Data are represented as mean  $\pm$  SD. There was no significant difference between groups.

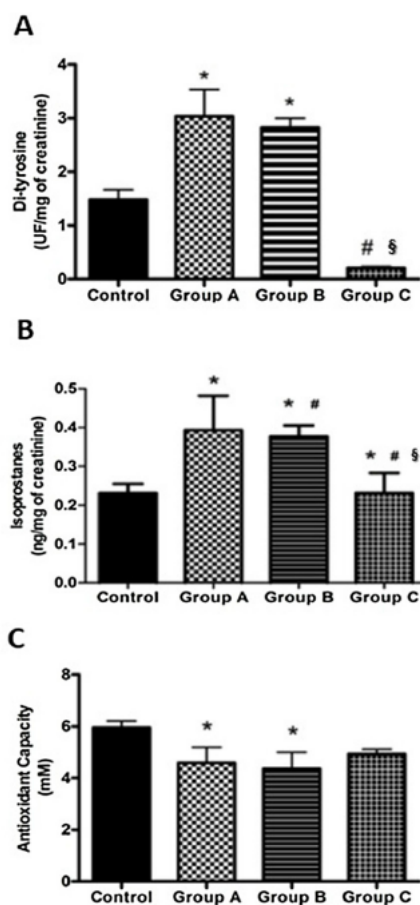


Fig. 2. (A) Di-tyrosine (di-tyr), (B) isoprostanes and (C) antioxidant capacity measurements in urine from MSUD patients and controls. Group A represents MSUD patients before treatment with L-car. Group B and C represent MSUD patients after 1 and 2 months of L-car supplementation, respectively. Data represent the mean  $\pm$  SD. Number of MSUD patients = 7–4. Number of controls = 6. \*  $P < 0.05$  compared to controls, #  $P < 0.05$  compared to Group A, §  $P < 0.05$  compared to Group B.

Fig. 2 shows the evaluation of oxidative stress in urine from MSUD patients. The Fig. 2A exhibits di-tyrosine levels, a biomarker of oxidative damage to proteins. It was verified that di-tyr levels before the supplementation with L-car (Group A) was markedly increased compared to control group, as well as after 1 month of treatment (Group B). L-car therapy was able to reduce the di-tyr levels, only after 2 months of treatment (Group C). Group C was significantly different from groups A and B [ $F(3,15) = 18.45$ ,  $P < 0.05$ ]. It was found a weak significant negative correlation between free L-car levels and di-tyr levels ( $r = -0.557$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 3).

Fig. 2B shows the isoprostanes levels, an end product of arachidonic acid peroxidation. It was observed a significant increase in isoprostanes levels before the treatment (Group A) compared to the control group and the supplementation with L-car was able to reduce the lipid peroxidation. Groups B and C show a significant decrease in the isoprostanes levels compared to the Group A [ $F(3,16) = 4.184$ ,  $P < 0.05$ ].

Fig. 2C shows the results of urinary antioxidant capacity in the groups. It was found that before the treatment (Group A) and after one month (Group B) with L-car supplementation, the patients had

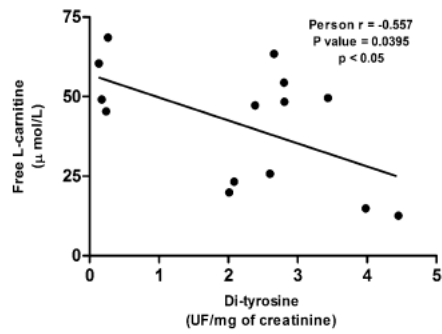


Fig. 3. Correlation between di-tyrosine vs. free L-carnitine levels in MSUD patients. Graphs show the Pearson correlation coefficient and probabilities.

a significant lower urinary antioxidant capacity compared to control group. However, 2 months of the L-car supplementation (Group C) was able to revert this process to control levels [ $F(3,15) = 15.02$ ,  $P < 0.05$ ].

It was measured the urinary KIC levels before and after the treatment in order to evaluate the effects of L-car on this ketoacid. Increased levels of KIC were found, mainly after 2 months of L-car supplementation (Group C) compared to control group. It was found the follow values, expressed in  $\mu\text{mol/L}$ : controls =  $0.00 \pm 0.00$ , Group A =  $8.1 \pm 8.1$ , Group B =  $1.7 \pm 2.5$ , Group C =  $78 \pm 53$ . Data are represented as mean  $\pm$  SD. Group C was different from control and Group B ( $P < 0.05$ ) [ $F(3,18) = 1.018$ ,  $P < 0.05$ ].

#### 4. Discussion

In our study, we demonstrated that the levels of free L-car in MSUD patients before the treatment were significantly reduced and the supplementation with L-car during 1 and 2 months was able to restore to normal levels. Our results corroborate other studies, demonstrating that patients affected by inherited metabolic disorders and treated with protein restrict diet could have carnitine deficiency (Sitta et al., 2011, 2014).

Several studies have shown that some accumulated metabolites in inborn errors of metabolism induce excessive free radical production and reduce the tissue antioxidant defenses (Colome et al., 2000; Barschak et al., 2008; Wajner et al., 2004). In this context, *in vitro* and *in vivo* studies have been developed in MSUD (Bridi et al., 2005, 2006; Barschak et al., 2006, 2007, 2008; Mescka et al., 2011, 2013), but oxidative stress parameters in urine of MSUD patients have not been studied. In other hand, these parameters in urine have been investigated in some metabolic diseases. It has been reported that patients with propionic and methylmalonic acidurias had high urinary isoprostanes levels, which were reversed after the treatment with L-car. Furthermore, patients affected by these acidurias had low urinary antioxidant capacity (Ribas et al., 2012).

In this study, we demonstrated that MSUD patients treated with protein restricted diet, but without L-car supplementation, had significantly increased urinary di-tyr levels compared to control group. After 2 months of L-car supplementation, these patients presented di-tyr concentrations at normal levels. Furthermore, we found a weak significant negative correlation between urinary di-tyr and blood free L-car concentrations in MSUD patients, indicating that L-car treatment can be involved in the prevention of protein oxidative damage. Di-tyr is formed by the oxidation of adjacent protein tyrosine residues leading to the formation of a highly stable inter-phenolic bond that does undergo further metabolism (Kirschbaum, 2002).

Protein oxidation by reactive species can lead enzymes, receptors and transport proteins to malfunction and, eventually, induce alterations of cellular metabolism (Halliwell and Gutteridge, 2007). Our results are in agreement with other studies. It was demonstrated that MSUD patients present higher protein oxidative damage in plasma, measured by protein carbonylation (Mescka et al., 2013). Furthermore, studies in cortex of rats, evaluating carbonyls and sulfhydryl content as markers of protein damage, demonstrated that carbonyls content was significantly enhanced in cerebral cortex in MSUD group while sulfhydryl content was significantly reduced, indicating the occurrence of oxidized proteins. Treatment with L-car in this animal model prevented these effects, reducing this damage to control levels (Mescka et al., 2011). It is known that for other inborn errors of metabolism protein damage has already been verified since the patients with propionic and methylmalonic acidurias presented high levels of di-tyr in urine and the treatment with L-car was able to reduce this damage to control levels (Ribas et al., 2011).

We also demonstrated that treatment with L-car was able to reduce the isoprostanes levels progressively after 1 and 2 months of supplementation, indicating a decrease in the lipid oxidation. Recently, studies showed that L-car proved to be effective in reducing the lipid oxidation since malondialdehyde (Mescka et al., 2013) and thiobarbituric acid-reactive substances (Barschak et al., 2006, 2007) were markedly increased in MSUD patients and the therapy with L-car reversed oxidative damage to lipids in plasma of MSUD patients (Mescka et al., 2013). Furthermore, L-car prevented lipid peroxidation in cerebral cortex of rats in a chemically-induced acute model of MSUD (Mescka et al., 2011). L-car have been described in other studies as an antioxidant able to combat the lipid peroxidation (Abdul and Butterfield, 2007; Miguel-Carrasco et al., 2010).

Altered antioxidant capacity in plasma from MSUD patients was observed in other studies, as demonstrated by a decrease of the total antioxidant status, which represents the quantity of tissue antioxidants, and of the total antioxidant reactivity, which reflects the tissue capacity to react with free radicals (Barschak et al., 2006, 2008). Our results are also in agreement, showing a reduction of urinary antioxidant capacity in patients before L-car supplementation. Possibly, these alterations can occur because of the BCAA restrict diet, normally used in the MSUD therapy, is poor in micronutrients necessary for the antioxidant status (Barschak et al., 2007). Decreased urinary antioxidant capacity may reflect a reduction of antioxidants in the blood, such as uric acid and dietary antioxidants. Otherwise, it was verified in our study that after 2 months of L-car administration this process was reversed to control levels, reinforcing an important antioxidant effect of L-car in MSUD patients.

In this study, we quantified the major accumulated metabolite in urine from MSUD patients. We found an increase in KIC levels, compared to control group after 2 months of treatment. Leu and KIC are considered the main neurotoxic agents in MSUD (Chuang and Shih, 2001). The appearance of KIC in significantly higher concentrations after 2 months of L-car treatment suggests that this supplementation may influence the urinary excretion of this metabolite, decreasing its concentration in the blood and tissues. It should be emphasized that due to because the toxic effects of the accumulating metabolites in MSUD patients, the beneficial effects of L-car supplementation, such as correction of carnitine deficiency and restoration of intramitochondrial acyl-CoA/CoA ratios, may improve the metabolic status of these patients (Ribas et al., 2014). All these factors can be contributing to lower the levels of oxidative damage observed in MSUD patients during treatment with L-car.

It is important to emphasize that di-tyr and antioxidant capacity were reversed only 2 months after L-car treatment. Carnitine supplementation is frequently used in patients with organic acidemias,

as for example, propionic, methylmalonic, isovaleric, 3-hydroxy-3-methylglutaric and glutaric type I acidemias and beneficial effects are well described in these patients (Hoffmann, 1996; Bykov, 2004; Kölker, 2011; Ribas et al., 2014). In these diseases, therapy with L-car is used to promote the reduction of the acyl coenzyme A toxic accumulation, releasing coenzyme A for other essential oxidative pathways and restoring normal concentrations in cases where there is a deficiency (Chalmers et al., 1984).

In conclusion, our results demonstrated that there is damage to proteins and lipids in urine from MSUD patients, corroborating the findings published previously in plasma (Mescka et al., 2013), as well as a deficient antioxidant capacity in these patients. The supplementation with L-car could be involved in the prevention of oxidative damage to proteins and lipids in this disease since it was verified a decrease of di-tyrosine and isoprostanes levels in urine from patients treated with L-car, as well as an improvement on the urinary antioxidant capacity. Furthermore, we suggest that L-car could be useful in MSUD therapy representing a new approach to the current treatment, which consists of protein restrict diet. In addition, the use of urine, easily collected, can be an option for monitoring such patients by evaluating the parameters of oxidative stress.

#### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Acknowledgments

This work was supported in part by grants from FAPERGS, CNPq and FIPE/HCPA-Brazil. We thanks the patients and their families, as well as the physicians of Medical Genetics Service of Clinicas Hospital of Porto Alegre.

#### References

- Abdul, H.M., Butterfield, D.A., 2007. Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 42 (3), 371–384.
- Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., et al., 2007. Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma selenium concentration are reduced in Maple syrup urine disease patients during treatment. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25, 335–338.
- Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., et al., 2008. Oxidative stress in plasma from Maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab. Brain Dis.* 23, 71–80.
- Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., et al., 2006. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with Maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 21, 279–286.
- Borglund, M., Sjoblad, S., Akesson, B., 1989. Effect of selenium supplementation on the distribution of selenium among plasma proteins of a patient with Maple syrup urine disease. *Eur. J. Pediatr.* 148 (8), 767–769.
- Bridi, R., Braum, C.A., Zorzi, G.K., et al., 2005. Alpha-keto acids accumulating in Maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defences in cerebral cortex from young rats. *Metab. Brain Dis.* 20, 155–167.
- Bridi, R., Fontella, F.U., Pulronik, V., et al., 2006. A chemically-induced acute model of Maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies. *J. Neurosci. Methods* 155, 224–230.
- Bykov, I.L., 2004. Effect of L-carnitine on metabolic disorders in rats with experimental acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Eksp Klin Farmakol.* 67 (6), 48–52.
- Chace, D.H., Hillman, S.L., Van Hove, J.L., Naylor, E.W., 1997. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 43, 2106–2113.
- Chalmers, R.A., Roe, C.R., Stacey, T.E., Hoppel, C.L., 1984. Urinary excretion of L-carnitine and acylcarnitines by patients with disorders of organic acid metabolism: evidence for secondary insufficiency of L-carnitine. *Pediatr. Res.* 18 (12), 1325–1328.
- Chuang, D.T., Shih, V.E., 2011. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver, C.R., Beaudt, A.L., Sly, W.L., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 1971–2005.
- Coitinho, A.S., de Mello, C.F., Lima, T.T., de Bastiani, J., Figuera, M.R., Wajner, M., 2001. Pharmacological evidence that alpha-ketoisovaleric acid induces convulsions through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *Brain Res.* 89, 68–73.
- Colome, C., Sierra, C., Vilaseca, M.A., 2000. Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? *Med. Clin.* 115, 111–117.
- Gulcin, I., 2006. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci.* 78, 803–811.
- Halliwell, B., Gutteridge, M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press Inc., New York.
- Harris, R.A., Joshi, M., Jeoung, N.H., 2004. Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 391–396.
- Hoffmann, G.F., 1996. Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics* 27, 115–123.
- Joseph, M.H., Marsden, C.A., 1986. Amino acids and small peptides. In: Lim, C.F. (Ed.), *HPLC of Small Peptides*. Oxford, pp. 13–27.
- Jouvet, P., Rustin, P., Taylor, D.L., 2000. Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: implications for neurological impairment associated with Maple syrup urine disease. *Mol. Biol. Cell* 11, 1919–1932.
- Kirschbaum, B., 2002. Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicators. *Clin. Nephrol.* 58, 344–349.
- Kölker, S., 2011. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I – revised recommendations. *J. Inher. Metab. Dis.* 34, 677–694.
- Mescka, C., Moraes, T., Rosa, A., et al., 2011. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in Maple syrup urine disease. *Meta. Brain Dis.* 26, 21–28.
- Mescka, C.P., Wayhs, C.A., Vanzin, C.S., 2013. Protein and lipid damage in Maple syrup urine disease patients: L-carnitine effect. *Int. J. Dev. Neurosci.* 31, 21–24.
- Miguel-Carrasco, J.L., Monserrat, M.T., Mate, A., Vázquez, C.M., 2010. Comparative effects of captopril and L-carnitine on blood pressure and antioxidant enzyme gene expression in the heart of spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 632, 65–72.
- Ribas, G.S., Biancini, G.B., Mescka, C.P., et al., 2012. Oxidative stress parameters in urine from patients with disorders of propionate metabolism: a beneficial effect of L-carnitine supplementation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32, 77–82.
- Ribas, G.S., Manfredini, V., De Mari, J.F., 2010. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28, 127–132.
- Ribas, G.S., Sitta, A., Wajner, M., Vargas, C.R., 2011. Oxidative stress in phenylketonuria: what is the evidence? *Cell. Mol. Neurobiol.* 31, 653–662.
- Ribas, G.S., Vargas, C.R., Wajner, M., 2014. L-Carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic diseases. *Gene* 533, 469–476.
- Sgaravatti, A.M., Rosa, R.B., Schuck, P.F., et al., 2003. Inhibition of brain energy metabolism by the alpha-keto acids accumulating in Maple syrup urine disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1639, 232–238.
- Sitta, A., Ribas, G.S., Mescka, C.P., Barschak, A.G., Wajner, M., Vargas, C.R., 2014. Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. *Cell. Mol. Neurobiol.* 34, 157–165.
- Sitta, A., Vanzin, C.S., Vargas, C.R., 2011. Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell. Mol. Neurobiol.* 31, 429–436.
- Sweetmann, L., 1995. Organic acid analysis. In: Hommes, F.A. (Ed.), *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*. Wiley-Liss, New York.
- Tavares, R.G., Santos, C.E., Tasca, C.I., Wajner, M., Souza, D.O., Dutra-Filho, C.S., 2000. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in Maple syrup urine disease. *J. Neurol. Sci.* 181, 44–49.
- Treacy, E., Clow, C.L., Reade, T.R., Chitayat, D., Mamer, O.A., Scriver, C.R., 1992. Maple syrup urine disease: interrelationship between branched-chainamino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *J. Inher. Metab. Dis.* 15, 121–135.
- Wajner, M., Latini, A., Wyse, A.T., Dutra-Filho, C.S., 2004. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J. Inher. Metab. Dis.* 27, 427–448.
- Wendel, U., Ogier de Baulny, H., 2006. Branched-chain organic acidurias/acidemias. In: Fernandes, J., Saudubray, J.-M., van den Berghe, G., Walter, J.H. (Eds.), *Inborn Metabolic Diseases*, fourth ed. Springer, Heidelberg, pp. 245–262.
- Zielke, H.R., Huang, Y., Baab, P., Collins, R.M.J., Zielke, C.L., Tildon, J.T., 1997. Effect of alpha-ketoisocaproate and leucine on the in vivo oxidation of glutamate and glutamine in the rat brain. *Neurochem. Res.* 22, 1159–1164.



*ARTIGO V*

**L-CARNITINE PREVENTS OXIDATIVE STRESS IN THE BRAINS OF RATS  
SUBJECTED TO A CHEMICALLY INDUCED CHRONIC MODEL OF MSUD**

Artigo submetido à revista Molecular Neurobiology

**L-carnitine prevents oxidative stress in the brains of rats subjected to a chemically induced chronic model of MSUD**

*Caroline Paula Mescka<sup>2</sup>, Andrea Pereira Rosa<sup>2</sup>, Gabriel Schirmbeck<sup>1</sup>, Thales Hein da Rosa<sup>1</sup>, Felipe Catarino<sup>1</sup>, Laila Oliveira de Souza<sup>1</sup>, Gilian Guerreiro<sup>4</sup>, Angela Sitta<sup>4</sup>, Carmen Regla Vargas<sup>2,3,4</sup>, Carlos Severo Dutra-Filho<sup>1,2\*</sup>*

*Affiliations:*

<sup>1</sup>*Departamento de Bioquímica (ICBS), UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-000, Porto Alegre, RS, Brazil.*

<sup>2</sup>*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-000, Porto Alegre, RS, Brazil.*

<sup>3</sup>*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brazil*

<sup>4</sup>*Serviço de Genética Médica, HCPA, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.*

**\* Corresponding Author:**

**Carlos Severo Dutra-Filho**

*Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil*

*Phone: +55 51 3308 5573; Fax: +55 51 3308 5535*

*E-mail: dutra@ufrgs.br*

## **ABSTRACT**

Maple syrup urine disease (MSUD), or branched-chain  $\alpha$ -keto aciduria, is an inherited disorder that is caused by a deficiency in branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex (BCKAD) activity. Blockade of this pathway leads to the accumulation of the branched-chain amino acids (BCAAs) leucine, isoleucine and valine and their respective ketoacids in tissues. The main clinical symptoms presented by MSUD patients include ketoacidosis, hypoglycemia, opisthotonos, poor feeding, apnea, ataxia, convulsions, coma, psychomotor delay and mental retardation. Although increasing evidence indicates that oxidative stress is involved in the pathophysiology of this disease, the mechanisms of the brain damage caused by this disorder remain poorly understood. L-carnitine (L-car) is considered an efficient antioxidant and may be involved in the reduction of oxidative damage observed in some inherited neurometabolic diseases. In the present study, we investigated the effect of BCAAs on some oxidative stress parameters and evaluated the efficacy of L-car against these possible pro-oxidant effects in the cerebral cortex and cerebellum of rats in a chronic MSUD chemical induction model. Our results showed that chronic BCAA administration was able to promote both lipid and protein oxidation, impair brain antioxidant defenses and increase reactive species production, particularly in the cerebral cortex, and that L-car was able to prevent these effects. Taken together, the present data indicate that chronic BCAA administration significantly increased oxidative damage in the brains of rats subjected to a chronic model of MSUD and that L-car may be an efficient antioxidant in this disorder.

**Keywords:** Maple Syrup Urine Disease – L-carnitine - Branched-Chain Amino Acids - Oxidative Stress – Neuroprotection – Antioxidant.

## INTRODUCTION

Maple syrup urine disease (MSUD) is an inborn error of metabolism associated with acute and chronic brain dysfunction that is caused by severe deficiency in the activity of the branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex (E.C. 1.2.4.4), a mitochondrial enzyme involved in the branched-chain amino acid (BCAA) degradation pathway. Due to this blockage, high concentrations of the BCAAs leucine (Leu), valine (Val) and isoleucine (Ile) as well as the respective branched-chain  $\alpha$ -keto acids (BCKAs) accumulate in patients when on an unrestricted diet and during episodes of metabolic decompensation during intercurrent illness [1, 2].

MSUD usually presents with a heterogeneous clinical phenotype, ranging from the severe classical form to mild variants, possibly due to distinct residual enzyme activity. Patients affected by the classical form of this disorder present encephalopathy characterized by episodes of ketoacidosis, hypoglycemia, apnea, convulsions and coma. The chronic clinical features include failure to thrive, poor feeding, ataxia, psychomotor delay and mental retardation [3]. Newborns with classic MSUD are asymptomatic at birth but may develop lethargy and poor feeding within days. Untreated patients fall into a coma within the first 10 d of life [4]. Alterations in magnetic resonance imaging show, in addition to generalized cerebral edema, a characteristic pattern of localized intense edema involving the cerebellar white matter (hypomyelination), the dorsal part of the brainstem, the cerebral peduncles, the posterior limb of the internal capsule, and the posterior aspect of the centrum semiovale, areas which are already myelinated at birth [3,5].

In spite of the predominance of severe neurological sequelae in MSUD, the mechanisms underlying the brain damage are still poorly understood. In addition, metabolite accumulation in MSUD has been demonstrated to affect brain uptake of essential amino acids [6], brain energy metabolism [7,8], the induction of apoptosis [9], and demyelination [10], which also contribute to brain injury. Indeed, oxidative stress has been demonstrated to be an underlying pathophysiological process in animal models and in MSUD patients [11-16], which makes it attractive for the study of antioxidants as an additional therapeutic approach to those currently employed for MSUD patients.

Therapy for MSUD consists of a protein-restricted diet with a low BCAAs content, supplemented with a BCAA-free amino acid mixture enriched with vitamins and minerals [1]. Although the benefits of dietary treatment for MSUD patients are undeniable, natural protein restriction may increase the risk of nutritional deficiencies and may result in a low total antioxidant status that can predispose and/or contribute to oxidative stress [12,17,18]. In this context, treated MSUD patients were recently observed to have reduced levels of L-carnitine (L-car), a quaternary amine that is primarily supplied by the diet, particularly by red meat and milk, and is indispensable for the transport of fatty acids across the inner mitochondrial membrane for subsequent  $\beta$ -oxidation [19,20]. Furthermore, studies have reported that L-car may protect cells against oxidative damage in important neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease and some inherited neurometabolic disorders [21-23]. Moreover, Mescka et al. [24] showed that acute intraperitoneal injection of L-car reduces lipid and protein oxidation and increases the activity of antioxidant enzymes in the cerebral cortex in chemically induced MSUD rats. Therefore, in the present study we extended this work, evaluating

the possible neuroprotective effects of L-car against the pro-oxidative effects of BCAA in the cerebral cortex and cerebellum of rats in a chemically induced chronic model of MSUD to examine whether these compounds could be involved in the oxidative stress present in this disorder.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Materials and equipment**

All of the chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). A spectrofluorometer (SpectraMax Gemini XPS; Molecular Devices) and a Wallac 1409 Scintillation Counter were used for the measurements. An Eppendorf 5417R and Eppendorf 5403 were used for centrifugation procedures.

### **Animals**

Five-day-old Wistar rats bred in the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS were used. Rats were kept with dams until they were sacrificed. The dams had free access to water and to a 20% (w/w) protein commercial chow (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil). They were maintained on a 12:12 h light/dark cycle (lights on 07:00–19:00 h) in an air-conditioned colony room maintained at a constant temperature ( $22 \pm 1$  °C). The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication number 80-23, revised 1996) were followed throughout the experiments.

### **Chronic administration of BCAA pool with or without L-car treatment**

A chemically induced chronic model of MSUD was adapted according to Bridi et al. [25]. Five-day-old Wistar rats received three subcutaneous administrations (at 1 h

intervals from each other) of BCAA pool (15.8  $\mu\text{L/g}$  body weight) containing 190 mmol/L Leu, 59 mmol/L Ile, and 69 mmol/L of Val for a period of fifteen days. On the day of the experiment, the BCAA solution was prepared in saline solution (0.85% NaCl) and 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. L-car was administered intraperitoneally (100 mg/kg body weight) concomitantly until the last injection of the BCAA pool. Animals were divided into four groups: a control group (saline solution); MSUD group (BCAA pool); L-car group (L-car) and MSUD+L-car group (L-car and BCAA pool).

### **Tissue preparation**

Sixty minutes after the last injection, the rats were killed by decapitation without anesthesia, and the brain was rapidly removed and kept on an ice-plate. The olfactory bulb, pons and medulla were discarded, and the cerebral cortex and cerebellum were dissected, weighed and kept chilled until homogenization. These procedures lasted up to 3 min. The cerebral cortex and cerebellum were homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at 750 g for 10 min at 4°C to discard nuclei and cell debris. The pellet was discarded, and the supernatant was immediately separated and used for the measurements.

### **Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)**

TBA-RS were measured according to Ohkawa et al. [26]. Briefly, samples and reagents were added to glass tubes in the following order: 500  $\mu\text{L}$  of tissue supernatant;

50  $\mu\text{L}$  of 8.1% SDS; 1500  $\mu\text{L}$  of 20% acetic acid in aqueous solution (v/v), pH 3.5; 1500  $\mu\text{L}$  of 0.8% thiobarbituric acid; and 700  $\mu\text{L}$  of distilled water. The mixture was vortexed, and the reaction was carried out in a boiling water bath for 1 h. After cooling, the mixture was centrifuged at 1000 g for 10 min. The resulting pink-stained TBA-RS were quantified in a spectrophotometer at 532 nm. The results are presented as nmol of TBA-RS/mg protein.

#### **Protein carbonyl content**

Protein carbonyl formation, a marker of protein oxidative damage, was measured spectrophotometrically according to Reznick and Packer [27]. Two-hundred microliters of the aliquots of the pre-treated supernatants (containing approximately 0.3 mg of protein) was treated with 400  $\mu\text{L}$  of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) dissolved in 2 M HCl, left in the dark for 1 h, and vortexed every 15 min. Samples were then precipitated with 500  $\mu\text{L}$  20% trichloroacetic acid and centrifuged at 20,000 g for 3 min. The supernatant was discarded, and the pellet was re-suspended in 600  $\mu\text{L}$  of 6 M guanidine (prepared in a 20 mM potassium phosphate solution, pH 2.3). The sample was vortexed and incubated at 60°C for 15 min. Subsequently, it was centrifuged at 20,000 g for 3 min, and the absorbance was measured at 370 nm (UV) in a quartz cuvette using a Hitachi U-2001 double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi High Technologies America, Inc., Life Sciences Division, Pleasanton, CA, USA). The results are presented as protein carbonyl content (nmol/mg protein).

#### **Reduced glutathione (GSH) content**



This method is based on the reaction of GSH with the fluorophore o-phthalaldehyde (OPT) after deproteinizing the samples, and GSH levels were measured according to Browne and Armstrong [28]. Initially, metaphosphoric acid was used to deproteinize the samples, which were then centrifuged at 1000 g for 10 min. Briefly, 2 mL of sodium phosphate buffer (pH 8.0) and 100  $\mu$ L 1 mg/mL OPT (prepared in methanol) were added to 100  $\mu$ L of each supernatant. The mixture was vortexed and allowed to stand in the dark for exactly 15 min. After that, the fluorescence was measured at emission = 420 nm and excitation = 350 nm using an F-2500 Hitachi (Hitachi High Technologies America, Inc., Life Sciences Division, Pleasanton, CA, USA). A calibration curve was also performed with a commercial GSH solution, and the results are expressed as  $\mu$ mol GSH/mg protein.

#### **2'7'-dichlorofluorescein oxidation assay (DCF)**

Reactive oxygen/nitrogen species production was measured following the method of Lebel et al. [29] based on 2'7'-dichlorofluorescein (H<sub>2</sub>DCF) oxidation. Samples (30  $\mu$ L) were incubated with 30  $\mu$ L of 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4 with 140 mM KCl) and 240  $\mu$ L of 100  $\mu$ M 2'7'-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) solution in a 96-well plate for 30 min at 37 °C in the dark. H<sub>2</sub>DCF-DA is cleaved by cellular esterases, and the H<sub>2</sub>DCF formed is eventually oxidized by reactive species present in the samples. The last reaction produces the fluorescent compound DCF, which was measured at 488 nm excitation and 525 nm emission. The results are presented as nmol DCF/mg protein.

#### **Catalase (CAT) activity**

CAT activity was assayed using a SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). The method used is based on the disappearance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), and 0.1–0.3 mg protein/mL [30]. One CAT unit is defined as 1 μmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed per minute, and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

#### **Superoxide dismutase (SOD) activity**

SOD activity was assayed according to the method of Marklund [31], which is based on the capacity of pyrogallol to auto-oxidize, a process highly dependent on superoxide radical. Inhibition of the autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, the activity of which can be then indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm using a SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). The reaction medium contained 50 mM Tris buffer/1 mM EDTA (pH 8.2), 80 U/mL catalase, 0.38 mM pyrogallol and approximately 1 μg of protein. A calibration curve was performed with purified SOD as the standard to calculate the activity of SOD present in the samples. The results were calculated as U/mg protein.

#### **Glutathione peroxidase (GPx) activity**

GPx activity was measured according to Wendel [32] using tert-butylhydroperoxide as the substrate. The enzyme activity was determined by monitoring the disappearance of NADPH at 340 nm in a medium containing 100 mM potassium

phosphate buffer/1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (pH 7.7), 2 mM GSH, 0.1 U/mL GR, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl-hydroperoxide, and 0.1 mM NADPH using a SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). One GPx unit (U) is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute. The specific activity was calculated as U/mg protein.

#### **Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) assay**

G6PD activity was measured according to Leong and Clark [33] using a SpectraMax M5/ M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). The method is based on the formation of NADPH at 340 nm in a reaction medium containing 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 10 mM magnesium chloride, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM NADPH, 1 mM glucose 6-phosphate, and 0.1–0.3 mg protein/ml. One G6PD unit is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH produced per minute, and the specific activity is expressed as G6PD units/mg protein.

#### **BCAA quantification**

The concentrations of BCAAs in plasma and in the cerebral cortex and cerebellum were determined by HPLC according to the method of Joseph and Marsden [34]. The analysis was performed using a reverse-phase column (ODS 25 cm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5  $\mu$ m) and fluorescent detection after pre-column derivatization with OPA (5.4 mg OPA in 1 mL 0.2 M sodium borate, pH 9.5) plus 4% mercaptoethanol. The flow rate was adjusted to 1.4 mL/min in a gradient of the mobile phase of methanol and 0.5 M sodium phosphate buffer, pH 5.5 (buffer A, 80% methanol; buffer B, 20% methanol). Each sample run

lasted 45 min. Amino acids were identified by their retention time and were quantitatively determined by correlating their chromatographic peak area with the peak area of the internal standard (homocysteic acid). A known amino acid standard mixture was used for calibration.

#### **L-car quantification**

Cerebral cortex and cerebellum free L-car levels were determined based on the method of De Sousa et al. [35]. Initially, 50  $\mu\text{L}$  of potassium hydroxide 0.20 mol/L was added to 50  $\mu\text{L}$  of sample, and the mixture was incubated at 37°C for 45 min. The solution to be assayed was added to 50  $\mu\text{L}$  of HEPES 0.5 mol/L, 20  $\mu\text{L}$  of N-ethylmaleimide 40 mmol/L, and 100  $\mu\text{L}$  of [1- $^{14}\text{C}$ ] acetyl coenzyme A 10  $\mu\text{mol/L}$ . Then, 30  $\mu\text{L}$  of L-carnitine acyltransferase (0.5 mg/ml) was added, and the mixture was passed down through a column of Dowex. The total column effluent was collected, the scintillation fluid was added, and the isotope content was determined using a liquid scintillation counter. Free L-car was determined by the same protocol, but without incubation with potassium hydroxide. Results were expressed as  $\mu\text{mol/L}$ .

#### **Protein determination**

Protein concentration was determined in the cerebral cortex and cerebellum supernatants using bovine serum albumin as a standard [36].

#### **Statistical analysis**

The results are presented as the mean  $\pm$  standard deviation. Assays were performed in duplicate, and the mean was used for statistical analysis. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons when the F value was significant. A value of  $P < 0.05$  was considered to be significant. All of the analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software on a PC-compatible computer.

## RESULTS

Initially, we measured plasma and cortical levels of BCAA after subcutaneous injection of BCAA pool (15.8  $\mu\text{L/g}$  body weight) for a period of fifteen days. Average BCAA levels (reported for plasma and brain, respectively) determined by HPLC were 592  $\mu\text{mol/L}$  and 135  $\mu\text{mol/L}$  for Leu, 235  $\mu\text{mol/L}$  and 78  $\mu\text{mol/L}$  for Ile and 378  $\mu\text{mol/L}$  and 96  $\mu\text{mol/L}$  for Val, data of five animals. Control Wistar rats that received an equal volume of saline showed plasma levels of 111  $\mu\text{mol/L}$  Leu, 65  $\mu\text{mol/L}$  Ile and 109  $\mu\text{mol/L}$  Val, whereas concentrations in the brain were 62  $\mu\text{mol/L}$  Leu, 45  $\mu\text{mol/L}$  Ile and 57  $\mu\text{mol/L}$  Val.

Table 1 lists the free L-car concentrations in the cerebral cortex and cerebellum supernatants of the four studied groups: the control group (saline solution); MSUD group (BCAA pool); L-car group (L-car) and MSUD+L-car group (L-car and BCAA pool). The results show that L-car levels were significantly higher in the L-car group and MSUD+L-car group compared with the control and MSUD groups, indicating that after intraperitoneal injection, L-carnitine was able to cross the blood-brain barrier for subsequent analysis of its action in the central nervous tissue.

Figure 1 (a and b) shows that chronic administration of BCAA pool significantly increased TBA-RS levels in the cerebral cortex and cerebellum compared with the controls and that these effects were prevented by L-car treatment ( $[F(3,27) = 8,136; P<0.05]$  and  $[F(3,25) = 27.82; P<0.05]$  for the cerebral cortex and cerebellum, respectively). Chronic administration of BCAA did not induce protein damage in the cerebral cortex, as shown by the absence of significant alterations in carbonyl content (Fig. 1c)  $[F(3,39) = 1.837; P>0.05]$ . However, this treatment significantly increased carbonyl levels in the cerebellum (Fig. 1d) of MSUD rats, and these levels were significantly decreased by L-car injections  $[F(3,29) = 11.32; P<0.05]$ . Next, our results showed that L-car treatment also prevented the decrease of GSH content caused by BCAA accumulation in the cerebral cortex  $[F(3,29) = 11.68; P<0.05]$  (Figure 1e), and no changes were observed in GSH content in the cerebellum in any of the tested groups (Figure 1f)  $[F(3,28) = 2.92; P>0.05]$ . Compared to control group, DCF production in the cerebral cortex (Figure 1g) was also increased by BCAA administration  $[F(3,24)=30.48, P<0.05]$ , and L-car was able to reduce the reactive species produced by the MSUD model back to the control level. However, no effect was observed in the cerebellum using this assay (Figure 1h)  $[F(3,28) = 1.74; P>0.05]$ .

Last, we studied the effect of chronic BCAA administration on enzymatic antioxidant defenses in the brain. The activity of the antioxidant enzymes CAT, SOD and GPx were assayed, as well as the activity of G6PD. The chronic chemical induction of MSUD significantly increased the activity of CAT in the cerebral cortex (Fig. 2a), and L-car prevented the enhancement of CAT activity due to BCAA administration  $[F(3,32) = 39.07; P<0.05]$ . However, the MSUD induction had no effect on the activity of this

enzyme in the cerebellum [ $F(3,33) = 1.970$ ;  $P > 0.05$ ] (Fig. 2b). In the cerebral cortex, L-car also prevented the inhibition of SOD activity caused by the chronic model of MSUD (Fig. 2c) [ $F(3,32) = 8.09$ ;  $P < 0.05$ ]; however, this activity was not altered in the cerebellum [ $F(3,27) = 0.96$ ;  $P > 0.05$ ] (Fig. 2d). Likewise, the activity of GPx (Fig. 2e) was also inhibited by BCAA and restored by L-car in the cerebral cortex [ $F(3,35) = 4.88$ ;  $P < 0.05$ ] but not in the cerebellum (Fig. 2f) [ $F(3,29) = 1.12$ ;  $P > 0.05$ ]. The activity of G6PD was inhibited in the MSUD model only in the cerebral cortex, and this effect was prevented by L-car administration [ $F(3,34) = 3.26$ ;  $P < 0.05$ ] (Fig. 2g). No alterations were observed in the cerebellum [ $F(3,32) = 0.26$ ;  $P > 0.05$ ] (Fig. 2h).

## DISCUSSION

Free radicals are physiologically produced in organisms, but an excess of these compounds due to their overproduction and/or by diminished antioxidant defenses leads to damage of cellular constituents or of important biomolecules, such as DNA, proteins and lipids [37]. Moreover, the crucial role of reactive species in inducing oxidative stress has been extensively demonstrated in many neurological disorders, including inborn errors of metabolism [38-40].

The pathophysiology of the neurological symptoms and brain damage of MSUD patients seems to involve multiple mechanisms and remains poorly known, but it has been postulated that high concentrations of Leu and its transamination product ( $\alpha$ -ketoisocaproic acid) produce direct and/or indirect effects and seem to be the main neurotoxic metabolites in the disease [1,41]. Furthermore, several studies have demonstrated that oxidative stress contributes to this damage, showing that the main

metabolites accumulated in the disease induce morphological alterations in glial cells through the generation of reactive species [42, 43]. Additionally, markers of lipid, protein and DNA oxidative damage and reduced antioxidant status have been reported in experimental models and patients with MSUD [11,12,14,15,45,46], probably secondary to the high production of free radicals. In addition, the protein-restricted diet used to treat MSUD has been postulated to possibly contribute to the compromised antioxidant status of these patients [11, 20, 40], thereby highlighting the need for concomitant antioxidant strategies in addition to the restricted dietary treatment.

In this respect, Mescka et al. [24] showed that L-car may be an efficient antioxidant, protecting against the oxidative stress promoted by BCAAs in acute, chemically induced models of MSUD. To continue the work already underway, in this study, we evaluated the possible protective role of L-car against the chronic toxicity of BCAAs by analyzing a wide range of oxidative stress parameters in the cerebral cortex and cerebellum of rats, to evaluate L-car efficacy against BCAA pro-oxidative effects in the central nervous system.

We first observed that a chemically induced chronic model of MSUD significantly increased plasma and brain Leu, Ile and Val concentrations compared with the controls and that these levels were similar to the concentrations reported in MSUD patients in the literature [1, 46], ensuring that our chronic model could be further used to study the long-term effects of BCAAs on oxidative stress parameters. Additionally, it is well known that L-car is actively transported through the blood–brain barrier by the organic cation transporter OCTN2 and accumulates in neural cells, especially as acetyl-L-carnitine [23]. Further, as shown in Table 1, we observed that the L-car intraperitoneal



injections were effective in significantly increasing the concentration of this compound in the rat brain.

Subsequently, the influence of BCAA pool chronic administration on lipid peroxidation in cerebral cortex and cerebellum of rats was investigated. Considering that TBA-RS reflects mainly the content of malondialdehyde formation, an end product of membrane fatty acid peroxidation [26], we observed that BCAA administration significantly enhanced TBA-RS levels in cerebral cortex and cerebellum compared with the control group, indicating that BCAA pool promotes lipid oxidative damage in these tissues in the MSUD chronic model and that L-car treatment prevented the lipid peroxidation elicited by these metabolites. These results corroborate with previous findings showing that BCAA increases TBA-RS levels in the brains of rats [13-16] and in the plasma of MSUD patients [11,12]. In our experiment, the generation of non-specific reactive species was measured by DCF oxidation assay. DCF levels in the cerebral cortex were significantly increased in the MSUD group compared with the controls, and chronic L-car treatment decreased these levels. In addition, DCF levels in the cerebellum did not differ significantly between the studied groups. Furthermore, previous studies have shown that L-car supplementation causes a dramatic reduction in malondialdehyde formation and increases overall antioxidant enzyme status, thus decreasing the levels of free radicals available for lipid peroxidation in the brains of old rats [47]. Additionally, L-car directly scavenges free radicals and chelates metal ions that participate in reactive species reactions [19, 23]; therefore, it is plausible that L-car can inhibit the lipid peroxidation and DCF oxidation that are triggered by reactive species.

Therefore, the level of protein oxidation expressed as carbonyl content was

determined in the brain areas studied. Interestingly, BCAA administration did not significantly alter cerebral cortex carbonyl content, but increased the measurement of this parameter in the cerebellum; L-car was not able to prevent this damage. These results corroborate with previous findings in the plasma of MSUD patients, as carbonyl content was significantly enhanced in MSUD patients, and the treatment with L-car was not able to change carbonyl content [20]. Carbonyl groups are mainly produced by the oxidation of protein side chains (Pro, Arg, Lys, and Thr) by the oxidative cleavage of proteins. Carbonyl groups can also be produced from the reduction of sugars or their oxidation products with lysine residues in proteins [48,49]. Although protein carbonyls are usually caused by ROS-mediated protein damage, we also cannot exclude the possibility that aldehydes resulting from lipid peroxidation may also induce carbonyl generation [48,49]. Although the exact mechanisms by which BCAAs cause protein oxidative damage are currently unknown, it is reasonable to speculate that these metabolites-induced reactive species may interact directly or indirectly with protein groups, leading to protein oxidation in the cerebellum.

GSH, the major non-enzymatic antioxidant defense in organisms, was also evaluated. Its well-known functions of scavenging reactive species and acting as a cofactor of antioxidant enzymes protect cells against oxidative damage [37]. Statistically significant differences in GSH levels were not observed in the cerebellar tissue; however, the chronic administration of BCAAs reduced GSH levels in the cerebral cortex, suggesting that this powerful antioxidant was used in the scavenging of the increased production of free radicals elicited by the high levels of DCFH oxidation in the MSUD group. The prevention of the decrease of GSH by the co-administration of L-car plus

BCAA pool reinforces this interpretation. The reduction of GSH levels may compromise reactive species detoxification and may exacerbate the inhibition of GPx activity by BCAAs because this enzyme uses GSH as a cofactor [37].

We also evaluated the activity of the antioxidant enzymes CAT, SOD and GPx. CAT converts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into water and molecular oxygen. SOD is the enzyme responsible for removing superoxide anion by accelerating the rate of its dismutation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and water, and GPx removes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and organic hydroperoxide by coupling its reduction to water to the oxidation of GSH [37]. In the cerebral cortex, CAT activity increased after BCAA administration, possibly as a consequence of increased production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [50,51]. On the other hand, SOD and GPx activities were inhibited, possibly caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation [50,52]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and SOD inhibition can favor the Fenton/Haber–Weiss reaction, which generates hydroxyl radical (OH<sup>•</sup>), the most toxic reactive species [53]. In this context, it should be emphasized that hydroxyl radical readily initiate the process of lipid peroxidation [54]. Therefore, it may be presumed that the increased levels of superoxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and other reactive species caused by BCAA-mediated SOD and GPx inhibition could lead to the lipid peroxidation and GSH reduction found in the cerebral cortex in the MSUD group. However, further experiments should be carried out to clarify this matter. Previous results have already shown that BCAAs inhibit GPx [24] and that erythrocyte GPx activity is reduced in MSUD patients during treatment [18]. In addition, investigators have demonstrated that L-car has the ability to increase the levels of GSH [21], which is an essential cofactor of GPx. On the other hand, because MSUD patients under treatment may present selenium deficiency [18], it may be presumed that the restoration of GPx activity by L-car may be very

important for their treatment. We demonstrated that chronic L-car administration restores CAT, SOD and GPx activity to the levels found in the control group, and these results agree with previous data from our research group [24]. It has been shown that L-car is an effective scavenger of reactive species such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide anion [55,56], which could help return the activity of these enzymes to normal levels. On the other hand, we did not observe alterations in the activity of these enzymes in the cerebellum in any of the tested groups.

The last antioxidant enzyme evaluated in the cerebral cortex and cerebellum supernatants from rats subjected to the chronic administration of BCAAs in this study was G6PD, the key regulatory enzyme of the pentose phosphate pathway. As such, G6PD controls the flow of carbon through the oxidative phase of this pathway and produces reducing equivalents in the form of NADPH to meet cellular needs for reductive biosynthesis and maintenance of the cellular redox state [57]. In the present study, we observed that chronic BCAA administration was able to inhibit G6PD activity in the cerebral cortex of MSUD rats, which could promote impairment of the production of NADPH and a disruption of the cellular redox balance. This observation is likely in line with the observed inhibition of activity because the activity of GPx depends on the regeneration of GSH by glutathione reductase, which in turn relies on NADPH, which is dependent on normal G6PD activity [58]. It has also been reported that G6PD is strongly inactivated by 4-hydroxy-2-nonenal, a toxic product of membrane lipid peroxidation [59]. We also demonstrated that L-car treatment was able to return G6PD activity to normal levels. Therefore, the preservation of G6PD activity by L-car may be an important factor in the maintenance of proper enzymatic and non-enzymatic functioning of the GSH

antioxidant system. Moreover, the reduction of G6PD activity in the MSUD group could elicit a deficit in the production of NADPH, which is used to produce GSH from GSSG.

It should be emphasized that compared with other tissues, the brain has relatively low antioxidant defenses, a high levels of peroxidizable unsaturated fatty acids, high levels of key ingredients for lipid peroxidation (iron and ascorbate), lower activity of antioxidant enzymes, reduced levels of non-enzymatic antioxidants and high oxygen consumption relative to tissue weight, making it extremely susceptible to oxidative stress [37]. However, the present study showed more important alterations of oxidative stress parameters in the cerebral cortex than in the cerebellum, suggesting that the cerebral cortex may be more susceptible to oxidative stress. This hypothesis is strengthened by reports showing higher reductive potential (calculated as NADPH/NADP<sup>+</sup> and GSH/GSSG ratios) [60] and greater antioxidant enzyme activity [61] in the cerebellum compared with the cerebral cortex, which suggests a greater resistance of the cerebellum to oxidative stress [58]. Oxidant factors that directly or indirectly induce reactive species generation also differ among brain structures. For instance, the levels of iron, which catalyzes OH<sup>•</sup> formation from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through the Fenton reaction, are higher in the cerebral cortex than in the cerebellum [62]. Therefore, the higher iron levels along with increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content may contribute to the higher susceptibility of the cerebral cortex to the oxidative stress promoted by BCAAs.

L-car and acylcarnitine supplementation have resulted in beneficial effects in the treatment of various neurological diseases. Recent data indicate new, multifactorial roles for L-car and acylcarnitine in neuroprotection. Brain carnitines can function in the synthesis of lipids, by altering and stabilizing membrane composition, by modulating

genes and proteins, by improving mitochondrial function, by increasing antioxidant activity, and by enhancing cholinergic neurotransmission. In summary, L-car is not merely a cofactor in  $\beta$ -oxidation; rather, it has many known and yet-to-be-discovered functions in physiology [63].

The chemically induced chronic model of MSUD used in this study demonstrated that BCAAs induce oxidative stress in the brains of Wistar rats, corroborating previous reports of an involvement of oxidative damage in the neuropathophysiology of this disease. Because treatment with L-car was effective in improving the activity of antioxidant enzymes, increasing the non-enzymatic antioxidant defenses and diminishing the lipid and protein damage and reactive species production, an antioxidant treatment might be useful in avoiding the oxidative stress promoted by the main metabolites that accumulate in this disease. Considering that the current treatment of MSUD involves a BCAA-restricted diet, which is low in antioxidants and L-car [18,20,40], supplementation with antioxidants, especially L-car, may be considered a suitable adjuvant therapy for these patients because it can improve their redox homeostasis.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## REFERENCES

- [1] Chuang DT, Shih VE (2001) Maple syrup urine disease (branched chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudt AL, Sly WL, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 1971–2005
- [2] Chuang DT, Chuang JL, Wynn RM (2006) Lessons from genetic disorders of branched-chain amino acid metabolism. *J Nutr* 136:243S-9S
- [3] Schönberger S, Schweiger B, Schwahn B, Schwarz M, Wendel U (2004) Dismyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab* 82:69–75
- [4] Hoffmann B, Helbling C, Schadewaldt P, Wendel U (2006) Impact of longitudinal plasma leucine levels on the intellectual outcome in patients with classic MSUD. *Pediatr Res* 59:17-20
- [5] Klee D, Thimm E, Wittsack HJ, Schubert D, Primke R, Pentang G, Schaper J, Mödler U, Antoch A, Wendel U, Cohnen M (2013) Structural white matter changes in adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 36:945-53
- [6] Araújo P, Wassermann GF, Tallini K, Furlanetto V, Vargas CR, Wannmacher CMD, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M (2001) Reduction of large neutral amino acid level in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem Int* 38:529–537
- [7] Pilla C, Cardozo RFD, Dutra CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CMD (2003) Effect of leucine administration on creatine kinase activity in rat brain. *Metab Brain Dis* 18:17–25
- [8] Ribeiro CA, Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Grando V, Schmidt AL, Ferreira GC, Perry MLS, Dutra-Filho CS, Wajner M (2008) Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Int* 33:114–124
- [9] Jouvét P, Rustin P, Taylor DL, Pocock JM, Felderhoff-Mueser U, Mazarakis ND, Sarraf C, Joashi U, Koszma M, Greenwood K, Edwards AD, Mehmet H (2000) Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. *Mol Biol Cell* 11:1919–1932

- [10] Treacy E, Clow CL, Reade TR, Chitayat D, Mamer OA, Scriver CR (1992) Maple syrup urine disease: interrelationship between branched chain amino-, oxo- and hydroxylacids implications for treatment association with CNS dysmyelination. *J Inherit Metab Dis* 15:121–135
- [11] Barschak AG, Sitta A, Deon M, Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR (2006) Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with Maple Syrup Urine Disease. *Metab Brain Dis* 21:279–286
- [12] Barschak AG, Sitta A, Deon M, Barden AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR (2008) Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab Brain Dis* 23:71–80
- [13] Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Wajner M, Dutra-Filho CS (2003) Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Dev Neurosci* 21:327–332
- [14] Bridi R, Braum CA, Zorzi GK, Wannmacher CM, Wajner M, Lissi EG, Dutra-Filho CS (2005a) Alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defenses in cerebral cortex from young rats. *Metab Brain Dis* 20:155–167
- [15] Bridi R, Latini A, Braum CA, Zorzi GK, Moacir W, Lissi E, Dutra-Filho CS (2005b) Evaluation of the mechanism involved in leucine-induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic Res* 39:71–79
- [16] Fontella FU, Gassen E, Pulrolnik V, Wannmacher CMD, Klein AB, Wajner M, Dutra CS (2002) Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 17:47–54
- [17] Frazier DM, Allgeier C, Homer C, Marriage BJ, Ogata B, Rohr F, Splett PL, Stembridge A, Singh RH (2014) Nutrition management guideline for maple syrup urine disease: an evidence- and consensus-based approach. *Mol Genet Metab* 112:210–7
- [18] Barschak AG, Sitta A, Deon M, Barden AT, Schmitt GO, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR (2007) Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma selenium concentration are reduced in maple syrup urine disease patients during treatment. *Int J Dev Neurosci* 25:335–338
- [19] Gulcin I (2006) Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci* 78: 803–811
- [20] Mescka CP, Wayhs CA, Vanzin CS, Biancini GB, Guerreiro G, Manfredini V, Souza C, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas CR (2013) Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: l-carnitine effect. *Int J Dev Neurosci* 31:21–4



- [21] Abdul HM, Butterfield DA (2007) Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 42:371-84
- [22] Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 7:65-74
- [23] Ribas GS, Vargas CR, Wajner M (2014) L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene* 533:469-76
- [24] Mescka C, Moraes T, Rosa A, Mazzola P, Piccoli B, Jacques C, Dalazen G, Coelho J, Cortes M, Terra M, Regla Vargas C, Dutra-Filho CS (2011) In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 26:21-8
- [25] Bridi R, Fontella FU, Pulrolnik V, Braun C, Zorzi GK, Coelho D, Wajner M, Vargas CR, Dutra-Filho CS (2006) A chemically induced acute model of maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies. *J Neurosci Meth* 155:224–230
- [26] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
- [27] Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth Enzymol* 233:357–363
- [28] Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Enzymol* 108:347–52
- [29] Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227–31
- [30] Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126
- [31] Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, pp 243–247
- [32] Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 77:325–333
- [33] Leong SF, Clark JB (1984) Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem J* 218:131–8
- [34] Joseph MH, Marsden CA (1986) Amino acids and small peptides. In: Lim CF (ed) *HPLC of small peptides*. IRL Press, Oxford, pp 13–27

- [35] De Sousa C, English NR, Stacey TE, Chalmers RA (1990) Measurement of L-carnitine and acylcarnitines in body fluids and tissues in children and in adults. *Clin Chim Acta* 187:317–328
- [36] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- [37] Halliwell B, Gutteridge MC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4<sup>th</sup> edn. Oxford University Press Inc., New York
- [38] Mc Guire PJ, Parikh A, Diaz GA (2009) Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab* 98:173-80
- [39] Shichiri M (2014) The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *J Clin Biochem Nutr* 54:151-60
- [40] Sitta A, Ribas GS, Mescka CP, Barschak AG, Wajner M, Vargas CR (2014) Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. *Cell Mol Neurobiol* 34:157-65
- [41] Danner DJ, Elsas JL (1989) Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: Scriver CR, Beaudt AL, Sly WL, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 671–692
- [42] Funchal C, Latini A, Jacques-Silva MC, Dos Santos AQ, Buzin L, Gottfried C, Wajner M, Pessoa-Pureur R (2006) Morphological alterations and induction of oxidative stress in glial cells caused by branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Int* 49:640-50
- [43] de Lima Pelaez P, Funchal C, Loureiro SO, Heimfarth L, Zamoner A, Gottfried C, Latini A, Wajner M, Pessoa-Pureur R (2007) Branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease induce morphological alterations in C6 glioma cells probably through reactive species. *Int J Dev Neurosci* 25:181-9
- [44] Mescka CP, Wayhs CA, Guerreiro G, Manfredini V, Dutra-Filho CS, Vargas CR (2014) Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro. *Gene* 548:294-8
- [45] Scaini G, Jeremias IC, Morais MO, Borges GD, Munhoz BP, Leffa DD, Andrade VM, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL (2012) DNA damage in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab* 106:169-74
- [46] Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, Puffenberger EG, Kelley RI (2002) Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics* 109:999-1008

- [47] Rani PJ, Panneerselvam C (2002) Effect of L-carnitine on brain lipid peroxidation and antioxidant enzymes in old rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 57:B134-7
- [48] Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 9:169-76
- [49] Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10: 389–406
- [50] Gemelli T, de Andrade RB, Rojas DB, Bonorino NF, Mazzola PN, Tortorelli LS, Funchal C, Filho CS, Wannmacher CM (2013) Effects of  $\beta$ -alanine administration on selected parameters of oxidative stress and phosphoryltransfer network in cerebral cortex and cerebellum of rats. *Mol Cell Biochem* 380:161-70
- [51] Rojas DB, Gemelli T, de Andrade RB, Campos AG, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2012) Administration of histidine to female rats induces changes in oxidative status in cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res* 37:1031-6
- [52] Moraes TB, Zanin F, da Rosa A, de Oliveira A, Coelho J, Petrillo F, Wajner M, Dutra-Filho CS (2010) Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *J Neurol Sci* 292:89-95
- [53] Lushchak VI (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 224C:164-175
- [54] Lipinski B (2012) Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2012:809696
- [55] Li JL, Wang QY, Luan HY, Kang ZC, Wang CB (2012) Effects of L-carnitine against oxidative stress in human hepatocytes: involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biomed Sci.* 21:19-32
- [56] Ye J, Li J, Yu Y, Wei Q, Deng W, Yu L (2010) L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. *Regul Pept.*161:58-66
- [57] Ho HY, Cheng ML, Chiu DT (2007) Glucose-6-phosphate dehydrogenase-from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Rep* 12:109-18
- [58] Pederzoli CD, Mescka CP, Zandoná BR, de Moura Coelho D, Sgaravatti AM, Sgarbi MB, de Souza Wyse AT, Duval Wannmacher CM, Wajner M, Vargas CR, Dutra-Filho CS (2010) Acute administration of 5-oxoproline induces oxidative damage to lipids and proteins and impairs antioxidant defenses in cerebral cortex and cerebellum of young rats. *Metab Brain* 25:145-54

[59] Ninfali P, Ditroilo M, Capellacci S, Biagiotti E (2001) Rabbit brain glucose-6-phosphate dehydrogenase: biochemical properties and inactivation by free radicals and 4-hydroxy-2-nonenal. *Neuroreport*. 12:4149-53

[60] Yang MS, Chan HW, Yu LC (2006) Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology* 226:126–130

[61] Campese VM, Sindhu RK, Ye S, Bay Y, Vaziri ND, Jabbari B (2007) Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain. *Brain Res* 1134:27–32

[62] Beard JL, Connor JR, Jones BC (1993) Iron in the brain. *Nutr Rev* 51:157–170

[63] Jones LL, McDonald DA, Borum PR. Acylcarnitines: role in brain (2010) *Prog Lipid Res* 49:61-75

**TABLE I**

Free L-carnitine (L-car) concentrations in the cerebral cortex and cerebellum supernatants of rats subjected to a chemically induced chronic model of MSUD.

	Control	MSUD	L-car	MSUD + L-car
Cerebral cortex ( $\mu\text{mol/L}$ )	54.42 $\pm$ 8.45	47.11 $\pm$ 8.52	71.85 $\pm$ 4.32 <sup>*#</sup>	65.78 $\pm$ 7.24 <sup>#</sup>
Cerebellum ( $\mu\text{mol/L}$ )	55.68 $\pm$ 2.78	54.27 $\pm$ 7.68	75.21 $\pm$ 7.50 <sup>*#</sup>	92.07 $\pm$ 7.35 <sup>*#</sup>

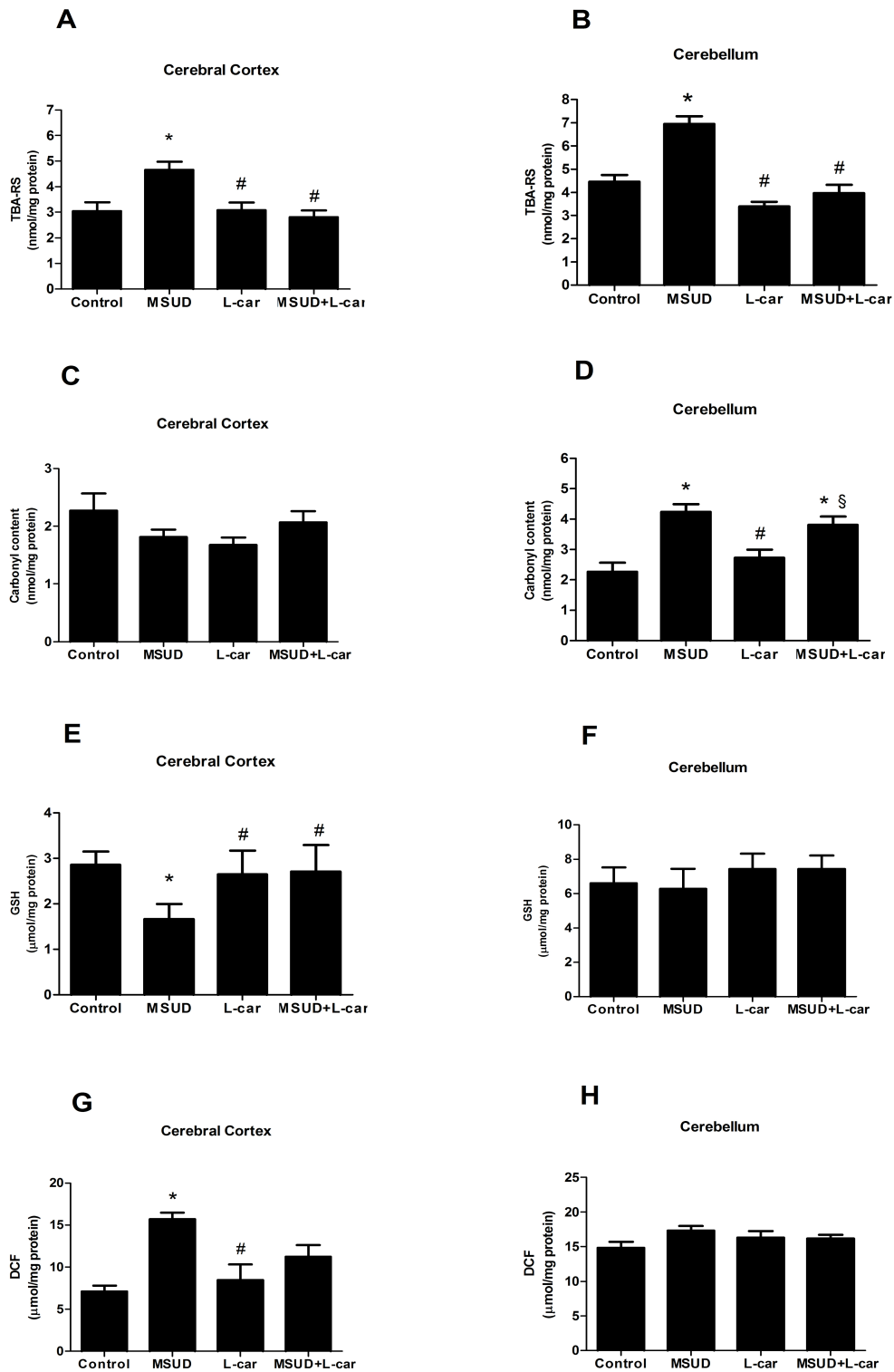
Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 5). \*P < 0.05, compared with controls; # compared with the MSUD group (Tukey's multiple-range test).

## FIGURE LEGENDS

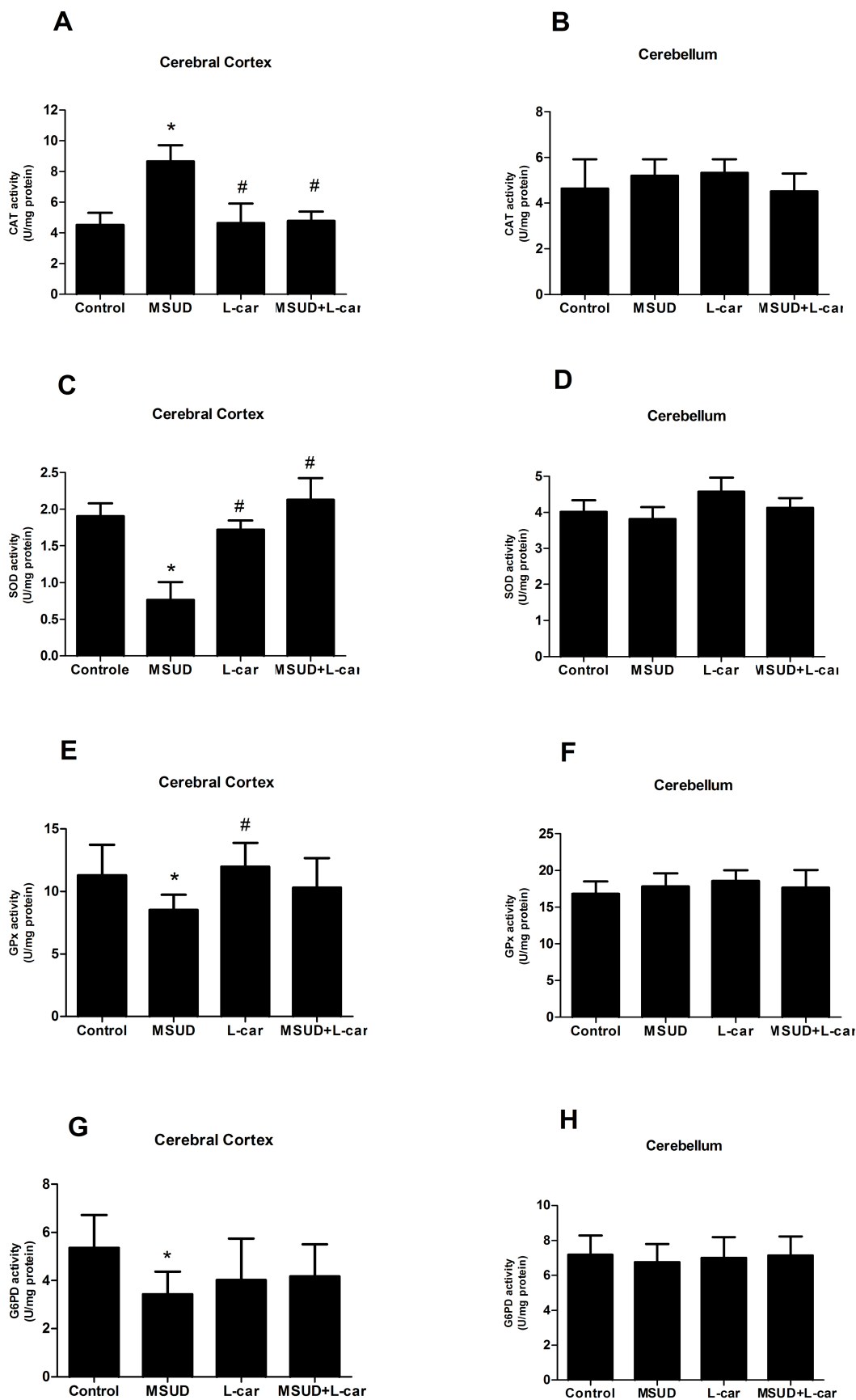
Figure 1. Effect of the chronic administration of BCAA pool (MSUD), with or without L-carnitine (L-car) treatment, on thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) (A and B), carbonyl content (C and D), reduced glutathione (E and F) and DCF oxidation (G and H). The results are the mean  $\pm$  SD (n=7–12) of independent experiments performed in duplicate. \* P<0.05 compared with control; # compared with the MSUD group; § compared with the L-car group (Tukey's multiple-range test).

Figure 2. Effect of the chronic administration of BCAA pool (MSUD), with or without L-carnitine (L-car) treatment, on catalase (CAT) activity (A and B), superoxide dismutase (SOD) activity (C and D), glutathione peroxidase (GPx) activity (E and F), and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity (G and H). The results are the mean  $\pm$  SD (n=7–12) of independent experiments performed in duplicate. \* P<0.05 compared with the control group; # compared with the MSUD group (Tukey's multiple-range test).

**FIGURE 1.**



**FIGURE 2.**





***PARTE 3***

## DISCUSSÃO

A MSUD é considerada uma das mais graves doenças genéticas do metabolismo dos aminoácidos, caracterizada bioquimicamente por um acúmulo nos tecidos e líquidos biológicos dos aminoácidos de cadeia ramificada, dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (principalmente de KIC, correspondente a Leu) e, em menor extensão, dos  $\alpha$ -hidroxiácidos de cadeia ramificada. A elevada concentração destes metabólitos resulta em numerosos e sérios efeitos neurológicos, como atraso no desenvolvimento psicomotor e retardo mental, além de hipomielinização/desmielinização evidenciadas por estudos de imagem do sistema nervoso central (Chuang e Shih, 2001).

Mesmo após quase cinquenta anos da publicação do primeiro tratamento proposto para MSUD, ainda não foi descoberto um manejo terapêutico ideal para melhorar a qualidade de vida destes pacientes, apesar dos avanços já alcançados. Igualmente, depois de décadas de estudos *in vitro*, em modelos animais e também em pacientes (Sgaravatti et al., 2003; Ribeiro et al., 2008; Pilla et al., 2003; Jouvét et al., 2000; Coitinho et al., 2001; Zielke et al., 1996; Tavares et al., 2000; Treacy et al., 1992; Tribble e Shapira, 1983; Amaral et al.; 2010; Araújo et al., 2001), os mecanismos responsáveis pela neurotoxicidade observada na doença ainda precisam ser melhor elucidados, embora esteja bem estabelecido que a Leu e o KIC sejam os principais metabólitos tóxicos ao tecido cerebral, já que o aumento da concentração plasmática destes compostos está associado com o aparecimento de sintomas neurológicos na MSUD (Chuang e Shih, 2001; Snyderman et al. 1964). Além disso, a disfunção neurológica (que é irreversível) está essencialmente relacionada com a idade do início da terapia, à quantidade e a duração dos períodos de descompensação metabólica e ao estrito cumprimento de um tratamento adequado (Chuang e Shih, 2001).

Estudos em animais e em pacientes já demonstraram o envolvimento do estresse oxidativo na MSUD, sugerindo um aumento na produção de radicais livres e/ou uma

diminuição das defesas antioxidantes na doença (Bridi et al., 2005a,b; Barschak et al., 2006, 2007, 2008). Assim, o estudo do possível efeito protetor de uma terapia antioxidante na MSUD pode levar a resultados promissores na terapêutica de portadores desta patologia. Neste intuito, Mescka e colaboradores (2013) verificaram que pacientes MSUD tratados com dieta de restrição protéica possuem deficiência de L-car, um composto amplamente conhecido por sua ação no metabolismo energético e com descoberta recente de um interessante papel antioxidante e anti-inflamatório em diversas patologias (Gulcin, 2006; Hoppel, 2003). A suplementação deste composto por um período de dois meses (50 mg/kg/dia) foi capaz de suprir sua deficiência e de reverter a níveis de controle os danos oxidativos lipídicos observados nesses pacientes. Ainda, a L-car preveniu a inibição da atividade de importantes enzimas detoxificadoras de espécies reativas e impediu a atuação de radicais livres que causam danos a membranas lipídicas e estruturas protéicas em um modelo animal agudo da MSUD (Mescka et al., 2011). Estes resultados prévios mostram que a L-car pode desempenhar um possível papel neuroprotetor como adjuvante na terapia de pacientes afetados pela MSUD, tornando interessante o estudo da L-car sobre o dano a outras biomoléculas, sua ação anti-inflamatória e protetora a longo prazo em modelo animal e em pacientes com esta doença.

Desta forma, esse trabalho teve por objetivo ampliar a investigação sobre o possível efeito sobre o estresse oxidativo, bem como avaliar o papel antioxidante e anti-inflamatório da L-car na fisiopatologia e neurotoxicidade da MSUD a fim de estimar o envolvimento de radicais livres e do processo inflamatório nos mecanismos responsáveis pela disfunção neurológica observada nos pacientes com esta desordem.

Assim, uma vez que já foi demonstrado que o acúmulo de BCAA e BCKA pode estimular a oxidação protéica e lipídica *in vitro* e *in vivo* (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003;

Mescka et al., 2013), nós objetivamos no Artigo 1 deste trabalho, complementar um estudo realizado anteriormente de indução ao dano oxidativo a biomoléculas pelos metabólitos acumulados na MSUD, verificando o possível papel antioxidante da L-car sobre dano ao DNA *in vitro*, através da metodologia do ensaio cometa.

O Ensaio Cometa é uma técnica eletroforética sensível, reprodutível, simples e rápida para quantificar as lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas *in vitro* e *in vivo* (Singh et al., 1988). Essa metodologia apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre as quais a utilização de um pequeno número de células que não necessariamente estejam em divisão. As células, englobadas em gel e espalhadas sobre uma lâmina, são submetidas a uma corrente elétrica que proporciona a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano detectável ao DNA e as células lesadas são classificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. As lesões ao DNA mais comumente detectadas são as quebras de fitas simples e duplas, *crosslinks*, danos alcali-lábeis e os fragmentos resultantes de reparo por excisão (Collins, 2014). Assim, esta técnica é utilizada amplamente na genética médica, na genética toxicológica, em diagnósticos e tratamentos médicos, na medicina ocupacional, no biomonitoramento ambiental, além de outras aplicações para verificação de compostos genotóxicos (Tice et al., 2000).

Assim, inicialmente incubamos leucócitos de indivíduos saudáveis tratados com uma curva de valores de Leu (100, 250, 500, 1000, 2500 e 3000  $\mu\text{M}$ ) e de KIC (30, 60, 150, 600, 1200 e 2000  $\mu\text{M}$ ), considerados os principais metabólitos neurotóxicos na MSUD. As concentrações foram escolhidas com o objetivo de englobar desde valores observados em pacientes MSUD bem tratados e aderentes à terapia dietética, até níveis mais elevados, encontrados em crises de descompensação metabólica na doença. Constatamos que em todas

as concentrações analisadas de Leu e KIC houve um aumento do índice de dano (DI) ao DNA quando comparados ao grupo controle, e com uma tendência maior de lesão ao DNA com o aminoácido Leu. Não podemos excluir a possibilidade de uma interconversão entre a Leu e seu  $\alpha$ -cetoácido correspondente (KIC) durante a incubação *in vitro*, uma vez que os resultados demonstram um perfil de dano ao DNA bem semelhante entre os dois metabólitos, com um platô de DI ao DNA a partir da concentração de 500  $\mu\text{M}$  até 3000  $\mu\text{M}$  para Leu e um efeito semelhante de 150  $\mu\text{M}$  a 2000  $\mu\text{M}$  com KIC. Nosso resultados estão de acordo com Scaini et al. (2012) que verificaram lesões ao DNA em hipocampo e estriado de ratos submetidos a um modelo crônico de indução à MSUD e prevenção deste dano por uma terapia antioxidante com N-acetilcisteína e deferoxamina. Nós avaliamos também o efeito da L-car (30, 60, 90, 120 e 150  $\mu\text{M}$ ) sobre danos ao DNA nas concentrações de 250 e 500  $\mu\text{M}$  (concentrações plasmáticas observadas em pacientes MSUD com boa adesão terapêutica) e de 3000  $\mu\text{M}$  de Leu (valor alcançado no diagnóstico e em crises de descompensação metabólica). Foi observado que as concentrações de 90, 120 e 150  $\mu\text{M}$  foram capazes de prevenir parcialmente os níveis de DI ao DNA em todas as concentrações testadas quando comparadas com o grupo controle. Quando analisada a mesma curva de valores de L-car para os danos ao DNA observados com o KIC (60 e 150  $\mu\text{M}$  (pacientes MSUD bem-tratados)) e 2000  $\mu\text{M}$  (diagnóstico e em crises metabólicas graves), a partir de 120  $\mu\text{M}$  houve uma prevenção total ao nível de controle do DI ao DNA. A partir da avaliação destes resultados, pode-se concluir que a Leu parece ser mais genotóxica no modelo *in vitro* de MSUD e que estas lesões são parcial ou totalmente prevenidas pela L-car.

O tratamento convencional dos pacientes com MSUD (formulação semi-sintética de aminoácidos isenta de BCAA, hipercalórica e com restrição protéica) objetiva a manutenção da Leu plasmática em níveis aceitáveis clinicamente (100 a 300  $\mu\text{M}$ ) com o propósito de evitar os graves danos neurológicos da doença (Chuang e Shih, 2001; Snyderman et al.,

1964). Entretanto, conforme observado no ensaio cometa *in vitro*, mesmo dentro do limite plasmático de Leu preconizado, os pacientes já estariam sofrendo maiores lesões ao DNA comparativamente a indivíduos controles. Ainda, é importante ressaltar que a concentração de 30  $\mu\text{M}$  de L-car, comumente observada em pacientes MSUD em tratamento e sem suplementação deste composto, não causou alterações na diminuição do DI ao DNA *in vitro* pelos metabólitos Leu e KIC, demonstrando que se o dano ao DNA também estiver presente nos pacientes MSUD, a suplementação com L-car como adjuvante no tratamento preconizado pode ser relevante.

Desta maneira, após a constatação de um possível efeito dos principais metabólitos acumulados na MSUD sobre o dano ao DNA *in vitro* e sabendo que não existiam dados na literatura verificando a existência de lesões ao DNA em pacientes MSUD, avaliamos no segundo artigo científico do presente trabalho a indução ao dano ao DNA em leucócitos de pacientes MSUD, suplementados ou não com a L-car e a correlação com estresse oxidativo. Averiguamos que os pacientes MSUD tratados com dieta de restrição protéica apresentam deficiência de L-car, possuem altos níveis de lipoperoxidação plasmática e exibem DI ao DNA estatisticamente elevados comparados ao grupo controle. Após 1 e 2 meses de suplementação de L-car (50 mg/kg/dia), as concentrações plasmáticas deste composto foram reestabelecidas a valores normais, assim como os níveis de dano oxidativo a lipídios nestes pacientes. Além disso, a L-car foi capaz de diminuir o dano ao DNA comparativamente aos pacientes sem suplementação antioxidante, mas não estatisticamente igual aos controles. Também, foi observada uma correlação negativa estatisticamente significativa entre o dano ao DNA e as concentrações de L-car e uma correlação positiva entre o dano ao DNA e a lipoperoxidação, representada pelo conteúdo de MDA.

Através da técnica de ensaio cometa não é possível discriminar quais são as causas do dano ao DNA. Entretanto, existe uma série de relatos na literatura demonstrando que

processos oxidativos podem lesar esta biomolécula (Ravanat et al., 2012; Collins 2014), e pelos resultados obtidos, é provável que as lesões ao DNA observadas nos pacientes MSUD possam ser causadas direta ou indiretamente pelos principais metabólitos acumulados na doença (Leu e KIC) via aumento da produção de radicais livres, como verificado pela correlação entre DI ao DNA e dosagem de MDA. Estes dados estão de acordo também com outros estudos que mostram que o dano oxidativo a outras biomoléculas, como lipídios e proteínas (Barschak et al., 2008; Mescka et al., 2013) são igualmente verificados em pacientes com esta doença metabólica.

Neste particular, a lesão oxidativa ao DNA é considerada o dano mais significativo oriundo do metabolismo, representando, portanto, um fator determinante de disfunção e morte celular. Estima-se que aproximadamente  $2 \times 10^4$  lesões oxidativas ao DNA ocorram no genoma humano por dia (Ames e Shigenaga, 1992). Desta maneira, acredita-se que o reparo destes danos possua um papel central na prevenção do aumento de mutações nos organismos vivos (Fontes et al., 2015). Muitas evidências sugerem que os danos cumulativos ao DNA causados por espécies reativas contribuam para diversas situações clínicas como o câncer (Dizdaroglu, 2015), a esquizofrenia (Okusaga, 2013) e a doença de Alzheimer (Chakrabarti et al., 2013). Baseados nestes resultados, nós reforçamos o envolvimento do estresse oxidativo na MSUD e sugerimos que a L-car é capaz de prevenir e/ou remediar o dano ao DNA, lesão que pode ser secundária a um desequilíbrio redox na doença. Os nossos estudos estão em conformidade com o de outros autores que apontam que a L-car reduz o dano oxidativo ao DNA por mecanismos como o sequestro de ROS, por quelar metais de transição (capazes de catalisar as reações de Fenton/Haber-Weiss), por impulsionar a produção energética celular e a fosforilação de proteínas envolvidas na síntese e processamento de ácidos nucleicos e por estimular mecanismos de reparo ao DNA, como a enzima poli (ADP ribosil) polimerase (Boerighter et al., 1993; Gulcin 2006; Thangasamy et al., 2009).

No terceiro artigo científico do nosso estudo, avaliamos o perfil inflamatório preliminar dos pacientes MSUD em tratamento submetidos ou não à suplementação com L-car (50 mg/kg/dia) por um período de dois meses, através da dosagem das citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e interferon gama (INF- $\gamma$ ), além da correlação destes marcadores com níveis de MDA, para avaliar dano oxidativo a lipídios. Foi verificado um aumento significativo nas concentrações de IL-1 $\beta$ , IL-6 e INF- $\gamma$  nos pacientes MSUD apenas com a dieta de restrição protéica, sem a administração de L-car. A terapia com L-car reverteu os valores de IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$  a níveis de controle e de IL-6 próximos a esse. Além disso, foi constatada uma correlação negativa entre todas as citocinas testadas e as concentrações de L-car e uma correlação positiva entre os níveis de MDA e os valores de IL-1 $\beta$  e IL-6. Estes resultados demonstram pela primeira vez na literatura um perfil inflamatório de pacientes MSUD em tratamento e que a suplementação com L-car pode auxiliar as defesas celulares contra inflamação e o estresse oxidativo nesses pacientes.

A inflamação pode ocorrer em resposta a qualquer alteração da integridade tissular, com o objetivo de restaurar a homeostase através de mecanismos de reparo (Muriach et al., 2014). Durante esse processo, ocorre uma produção aumentada de espécies reativas com um papel fundamental para o desenvolvimento e perpetuação da inflamação (Brüne et al., 2013; Lugin et al., 2014) e que pode contribuir para a fisiopatologia de diversas doenças, inclusive degenerativas (Urrutia et al., 2014). O estresse oxidativo também é capaz de gerar modificações em genes nucleares, potencializando a indução da resposta inflamatória por alterar a síntese de citocinas pró-inflamatórias (como as interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ , testadas nesse trabalho), prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e moléculas de adesão (Janmey et al., 2013).

Sabe-se que processos inflamatórios, como infecções, podem resultar em crises de descompensação metabólica em erros inatos do metabolismo. Pacientes com MSUD



apresentam reduzidos níveis de antioxidantes, como de L-car e de selênio (Barschak et al., 2007; Mescka et al., 2013) devido a uma ingesta nutricional deficiente em consequência ao tratamento preconizado ou por um aumento da demanda antioxidante em função da ativação de células imunocompetentes, tal como também relatado em pacientes com doenças inflamatórias crônicas (Muñoz e Costa, 2013; Mangge et al., 2014). Estes dados são reforçados pelas correlações inversas entre as concentrações de L-car e as citocinas pró-inflamatórias observadas nos pacientes MSUD neste trabalho.

Neste sentido, uma série de estudos tem verificado um papel anti-inflamatório da L-car, como uma diminuição do progresso de infecções em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana com a suplementação deste composto (Famularo et al., 2004), restauração de modificações celulares inflamatórias relacionadas ao envelhecimento por sua ação antioxidante à produção de radicais superóxido (Izgüt-Uysal et al., 2003) e uma atividade terapêutica na morbidade e no metabolismo lipídico em modelos animais de caquexia e choque séptico, com efeitos resultantes de uma regulação negativa na produção de citocinas e/ou um aumento na depuração das mesmas (Winter et al., 1995).

Considerando que não existem evidências na literatura demonstrando dano oxidativo urinário em pacientes com MSUD, muito menos a atuação de antioxidantes, como a L-car, sobre este processo, objetivamos no artigo científico 4 desta tese avaliar biomarcadores urinários de dano oxidativo a proteínas (dosagem de di-tirosina, formada a partir de resíduos de tirosina adjacentes de proteínas) e a lipídios (pelos níveis de isoprostanos, produzidos pela oxidação do ácido araquidônico), assim como a capacidade antioxidante de pacientes MSUD antes a após a suplementação de L-car (50 mg/kg/dia) por um período de dois meses. Observamos que a terapia com L-car foi capaz de reduzir os níveis de di-tirosina e isoprostanos além de aumentar a capacidade de reação urinária frente à produção exacerbada de radicais livres nestes pacientes quando comparados ao início da suplementação deste

composto. Estes dados corroboram com outros resultados descritos na literatura, que demonstram um aumento de lipoperoxidação, de dano oxidativo a proteínas e uma diminuição da capacidade antioxidante no plasma de pacientes MSUD durante o tratamento preconizado (dieta restrita em proteínas) e que a suplementação com L-car foi capaz de reverter a níveis de controle os valores de MDA (principal produto da cascata de peroxidação lipídica) no plasma desses pacientes (Barschak et al., 2008; Mescka et al., 2013). Igualmente, a baixa defesa antioxidante observada nos pacientes MSUD é constatada também em outros erros inatos do metabolismo, como na Fenilcetonúria, e pode ser devida a dieta altamente restritiva e com déficit de micronutrientes importantes a que estes pacientes são submetidos (Sitta et al., 2006; Barschak et al., 2007; Sitta et al., 2014). Além disso, Ribas et al. (2012) observaram que a L-car reverteu a valores de indivíduos saudáveis a baixa capacidade antioxidante e os altos níveis de isoprostanos e de di-tirosina na urina de pacientes com acidemia propiônica e metilmalônica. Outro dado interessante encontrado no nosso estudo foi o aumento da excreção de KIC após dois meses de suplementação de L-car, sugerindo um decréscimo plasmático e em outros tecidos deste metabólito neurotóxico. É importante enfatizar que devido aos efeitos tóxicos do acúmulo de BCKA em pacientes MSUD, os efeitos benéficos da suplementação da L-car, como a correção da sua deficiência e a restauração das razões intramitocondriais de acil-CoA/CoA, podem auxiliar na melhora do *status* metabólico e diminuição dos níveis de dano oxidativo observado nos pacientes durante o tratamento. Estes resultados enfatizam um possível papel protetor da L-car sobre o estresse oxidativo observado nos pacientes MSUD e demonstram que a urina pode ser uma opção menos invasiva e eficiente para o monitoramento de dano oxidativo em pacientes afetados por esta doença.

Modelos animais de indução química de desordens metabólicas não mimetizam completamente doenças humanas em toda a sua complexidade, entretanto, têm sido amplamente utilizados pela vantagem de poder isolar cada substância conhecidamente

acumulada em determinada disfunção para estudo dos seus efeitos comparados a controles adequados. Ainda, modelos animais são essenciais para a investigação de mecanismos fisiopatológicos de doenças, especialmente no que tange o metabolismo cerebral, auxiliando na sugestão de medidas preventivas e/ou novas estratégias de tratamento (Skvorak, 2009; de Andrade et al., 2012).

Neste sentido, a fim de avaliar o efeito neuroprotetor da L-car contra efeitos pró-oxidativos crônicos dos metabólitos acumulados na MSUD, no artigo científico 5 desta tese utilizamos um modelo crônico de indução química da doença em córtex e cerebelo de ratos jovens.

Tendo em vista que o cérebro é particularmente suscetível ao dano oxidativo lipídico, seja pela sua baixa defesa antioxidante, alto consumo de oxigênio aliado a elevadas concentrações de lipídios poliinsaturados, avaliamos este tipo de dano através da medida de TBA-RS. Verificou-se que a L-car foi capaz de reverter o aumento significativo deste parâmetro comparado ao grupo controle, em córtex cerebral e cerebelo dos ratos do grupo MSUD, indicando, então, uma possível produção exacerbada de radicais livres. O aumento de MDA, produto final da peroxidação de lipídios de membrana medido pelo TBA-RS, foi detectado anteriormente tanto *in vitro* (Fontella et al. 2002; Bridi et al. 2003; 2005b), quanto no plasma de pacientes com MSUD (Barschak et al. 2006; 2008; Mescka et al., 2013).

Observamos uma reversão total da diminuição no conteúdo de GSH, da atividade das enzimas SOD, GPx e G6PD e do aumento da atividade da enzima CAT, assim como uma reversão parcial do aumento de espécies reativas (dosado pela técnica da oxidação de DCF) pela L-car em córtex cerebral de ratos MSUD em comparação ao grupo controle. Alterações oxidativas foram menos observadas em cerebelo, com a indução aumento do conteúdo de carbonilas pelos BCAA, porém sem reversão total do dano protéico pela L-car. Este achado reitera hipóteses de outros estudos que demonstram que o cerebelo detém um maior conteúdo

de enzimas antioxidantes e de potencial redutor (estimado pelas razões NADPH/ NADP<sup>+</sup> e GSH/GSSG) em comparação ao córtex cerebral (Yang et al., 2006; Campese et al., 2007) sugerindo uma maior resistência do cerebelo ao estresse oxidativo.

Estudos prévios mostraram que a suplementação de L-car causou redução na formação de MDA e um aumento do status antioxidante, com a conseqüente diminuição de radicais livres disponíveis para lipoperoxidação em cérebro de ratos idosos (Rani e Panneerselvam, 2002) e com um efeito semelhante em córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo agudo de MSUD (Mescka et al., 2011). Adicionalmente, já foi verificado que a L-car possui propriedade *scavenger* de radicais livres e quelante de íons metálicos participantes das reações de iniciação e propagação do estresse oxidativo (Muthuswamy et al. 2006; Gulcin, 2006). Então, é possível que a L-car tenha auxiliado na inibição da lipoperoxidação e da oxidação de DCF causadas por espécies reativas como constatado no nosso trabalho.

Verificamos, como dito anteriormente, que a L-car não foi capaz de inibir o aumento da formação de carbonilas em cerebelo de ratos MSUD. Este achado foi semelhante ao encontrado em pacientes MSUD suplementados com este composto (Mescka et al., 2013), em que a L-car não reverteu o aumento de dano oxidativo proteico, dosado pelo conteúdo de carbonilas. Danos proteicos podem alterar de forma significativa o metabolismo celular por inativar irreversivelmente enzimas, transportadores e receptores. Os grupamentos carbonilas são formados por uma ampla variedade de processos, principalmente por reações catalisadas por íons metálicos em resíduos específicos de aminoácidos e por adução de lipídios oxidados (Requena et al., 2003), sendo um índice de comprometimento da viabilidade protéica de mais difícil reversão, em função da formação de agregados de alto peso molecular (Dalle-Donne et al., 2003; Dalle-Donne et al., 2006). Embora a formação de carbonilas normalmente seja causada por danos a proteínas induzidos por espécies reativas, não podemos excluir a possibilidade de que aldeídos resultantes da peroxidação lipídica também possam induzir sua

produção (Dalle-Done et al., 2003; Dalle-Done et al., 2006), potencializando o efeito observado no nosso modelo crônico de MSUD.

A GSH, o antioxidante não enzimático mais abundante, também teve seus níveis diminuídos após a administração crônica de BCAA em córtex cerebral de ratos Wistar. Esta alteração pode estar correlacionada com a sua conhecida ação *scavenger* de espécies reativas, que estão aumentadas no grupo MSUD, conforme demonstrado pela medida de oxidação de DCF. O tratamento com L-car no nosso trabalho foi capaz de aumentar o conteúdo de GSH, em concordância com o que já foi descrito anteriormente na literatura (Rani e Panneerselvam, 2002; Abdul e Butterfield, 2007).

Nós também demonstramos que a administração de L-car restaurou as atividades das enzimas CAT, SOD e GPx em córtex cerebral de ratos com MSUD. Esses achados estão consoantes com resultados prévios do nosso grupo de pesquisa em um modelo agudo de indução da MSUD (Mescka et al., 2011). Já foi sugerido que a L-car possui um efeito sequestrador de espécies reativas como o  $H_2O_2$  e radical superóxido (Li et al. 2012; Ye et al. 2010; Derin et al., 2006; Gulcin, 2004) e esta ação *scavenger* pode ter auxiliado para o retorno das atividades enzimáticas testadas a níveis normais. Também, tanto o acúmulo de  $H_2O_2$  como a inibição da SOD podem favorecer as reações de Fenton/Haber-Weiss com a consequente geração de radical hidroxila, considerado a ROS mais tóxica (Lushchak, 2014) e que pode rapidamente desencadear processos de lipoperoxidação (Lipinski, 2012). Com isso, presume-se que o aumento da produção de espécies reativas mediado pela administração crônica dos aminoácidos de cadeia ramificada, assim como a inibição das atividades das enzimas SOD e GPx pode contribuir para os altos níveis de peroxidação lipídica e redução de GSH observada no córtex cerebral dos ratos MSUD.

Já foi relatado também que a L-car é capaz de aumentar a atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase, como foi observado no nosso estudo, e que esta enzima pode

ser inativada por 4-hidróxi-2-nonenal, produto tóxico formado pela peroxidação de lipídios de membrana (Muthuswamy et al. 2006; Ninfali et al. 2001). Os presentes resultados também mostraram que o modelo crônico de MSUD inibe a atividade da GPx, responsável por degradar o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos utilizando selênio e GSH como cofatores e, novamente, a L-car foi capaz de impedir esta inibição. Além disso, o decréscimo dos níveis de GSH pode comprometer a detoxificação de espécies reativas por exacerbar a inibição da atividade da GPx, já que o mesmo é um cofator dessa enzima (Halliwell e Gutteridge, 2007). Foi demonstrado que os BCAA, *in vitro* e em modelo agudo de MSUD, são capazes de inibir a atividade da GPx em córtex cerebral de ratos (Bridi et al. 2005b; Mescka et al., 2011) e que pacientes MSUD sob tratamento dietético possuem deficiência de selênio, e consequente diminuição da atividade eritrocitária da GPx (Barschak et al., 2007). Portanto, a ação restauradora da L-car sobre a atividade da GPx pode ser muito importante para a manutenção do *status* antioxidante dos pacientes portadores de MSUD.

Através da utilização de um modelo crônico de indução química da doença MSUD, os resultados por nós obtidos corroboram os dados anteriores da literatura demonstrando que o estresse oxidativo contribui, ao menos em parte, para a disfunção neurológica observada na doença (Scaini et al., 2012; Mescka et al., 2011, 2013). De forma eficiente, a L-car atuou como um potente antioxidante neste modelo animal, prevenindo a inibição da atividade de importantes enzimas detoxificadoras de espécies reativas, além de impedir a atuação de radicais livres que causam danos a membranas lipídicas. Estes resultados em conjunto mostram que a L-car pode desempenhar um papel neuroprotetor como um potente adjuvante na terapia de pacientes afetados pela MSUD. Além disso, estes dados contribuem para a compreensão dos mecanismos responsáveis pela neurotoxicidade decorrente do acúmulo dos metabólitos envolvidos na doença.

Para manter a Leu dentro dos níveis considerados seguros, é recomendado aos pacientes MSUD o seguimento de uma dieta especial, com baixa quantidade de proteínas, o que exclui quase que completamente produtos de origem animal e inclui porções controladas de cereais, frutas e vegetais. A baixa ingestão de proteínas com alto valor biológico, diminui, conseqüentemente, a biodisponibilidade de diversos nutrientes, dentre eles substâncias com ação antioxidante, como selênio (Barschak et al., 2007) e a L-car (Mescka et al., 2013), cuja principal fonte é essencialmente dietética (cerca de 75%), proveniente de alimentos como leite, derivados e carne vermelha (Agarwal e Said 2004; Derin et al., 2004; Gulcin, 2006). Cabe salientar que pacientes fenilcetonúricos, bem como os portadores de acidemia propiônica e metilmalônica também apresentam deficiência nos níveis de carnitina livre e que a administração deste composto teve um efeito protetor sobre o dano oxidativo a lipídios, a proteínas e ao DNA (Sitta et al., 2011; Ribas et al., 2010 a,b).

Nos últimos anos, diversos estudos têm investigado o papel da L-car no organismo, sendo que diversas e importantes funções já foram atribuídas a ela (Figura 9). A L-car é uma substância altamente polar e hidrofílica, cujo papel mais conhecido no metabolismo é o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para dentro da matriz mitocondrial e conseqüente oxidação para a produção de energia (Bahl e Bressler, 1987). Além disso, a L-car possui um papel modulatório da função neural por mediar a transferência de grupamentos acetila para a síntese de acetilcolina, bem como influenciar vias de transdução de sinal e expressão gênica (Binienda e Ali, 2001). Ela também atua como cofator na oxidação peroxissomal de ácidos graxos de cadeia muito longa, estimulando a respiração celular e é frequentemente utilizada como um suplemento alimentar por, supostamente, aumentar o desempenho físico e promover a perda de peso. Também tem sido atribuído à L-car um papel na melhora das funções imunológicas e ela tem sido sugerida como um agente terapêutico para diversas desordens neurodegenerativas (Solarska et al., 2010).

Os efeitos benéficos da L-car parecem ser mediados, pelo menos em parte, por suas propriedades antioxidantes. A L-car tem sido descrita como um sequestrador de radicais superóxido (Gulcin, 2006). Por sua vez os radicais superóxido desempenham um importante papel na formação de outros ROS, como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, os quais induzem dano oxidativo a lipídios, proteínas e DNA (Pietta, 2000). Também tem sido descrito que a L-car seria capaz de sequestrar o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (considerados os mais deletérios ao organismo) e também inibir a produção dos mesmos (Derin et al., 2004; Gulcin, 2006). Além disso, a L-car apresenta um efeito antiperoxidativo que está relacionado à sua ação como quelante de metais que leva a uma diminuição na concentração de íons metálicos e, conseqüentemente, na geração de radicais livres (Muthuswamy et al., 2006).

A atividade antioxidante da L-car também se relaciona ao seu papel de proteção aos antioxidantes teciduais, tanto enzimáticos quanto não enzimáticos. Esse papel inclui a regulação dos níveis de GSH e a elevação na atividade das enzimas antioxidantes (Tanghasamy et al., 2009; Calabrese et al., 2006). Assim, os efeitos *in vivo* da L-car podem ser mediados pela ação direta da L-car ou, então, pela biossíntese de enzimas antioxidantes e outras proteínas (Solarska et al., 2010).

Por outro lado, é importante considerar a possibilidade de que este efeito pode também ser devido a função da L-car em promover a excreção de metabólitos secundários tóxicos acumulados na MSUD, como o ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico, ácido  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalérico e ácido  $\alpha$ -ceto isovalérico. A L-car normalmente está presente no plasma na forma de carnitina livre. Entretanto, nas doenças em que ocorre acúmulo de ácidos orgânicos (como na MSUD), a L-car se conjuga com estes ácidos formando ésteres de carnitina (acilcarnitinas), aumentando a excreção desses metabólitos e conseqüentemente, diminuindo sua toxicidade (Hoppel, 2003). Desta forma, a diminuição da oxidação de biomoléculas observada no nosso estudo pode estar



relacionada, ao menos em parte, com a redução das concentrações intracelulares dos BCAA e seus derivados. A L-car também pode reduzir os níveis de MDA por facilitar o transporte de ácidos graxos diminuindo assim a disponibilidade dos mesmos para a peroxidação (Rajasekov et al., 2005).

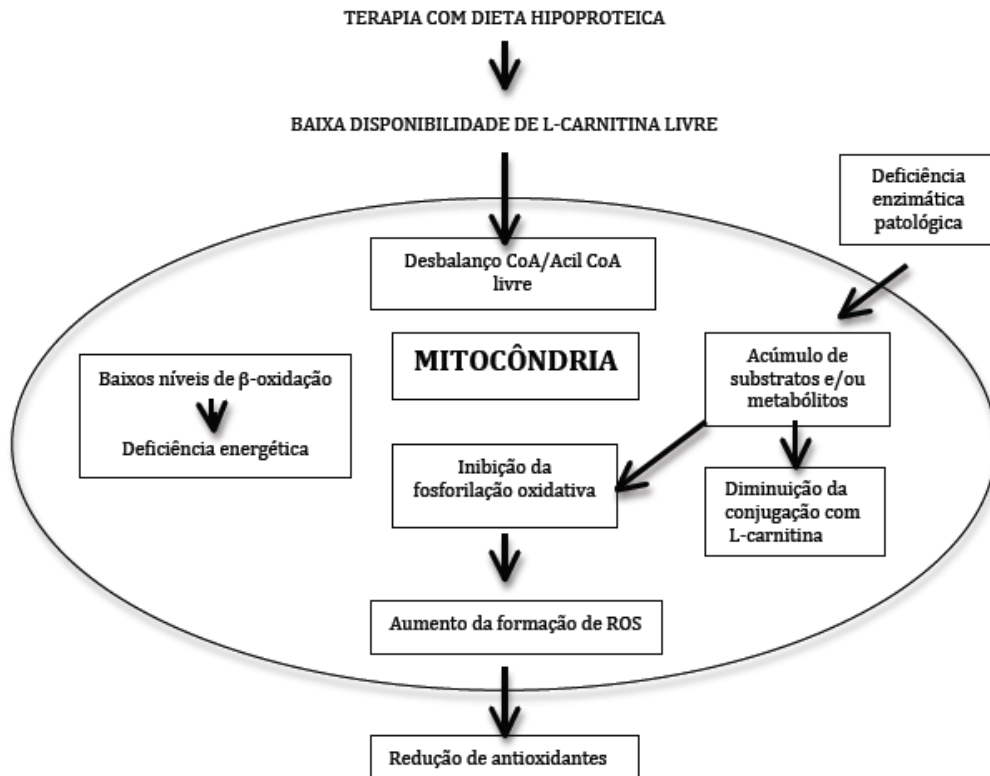


Figura 9. Possíveis atividades da L-carnitina em desordens neurometabólicas com terapias baseadas em restrição proteica (Adaptado de Ribas et al., 2014).

É necessário comentar que estes resultados foram obtidos com uma suplementação de L-car por um período de dois meses e que talvez com um tratamento de longo prazo, outros efeitos antioxidantes poderiam fortalecer os encontrados neste estudo. Ainda, cabe salientar que estes são os primeiros resultados de que temos conhecimento de que a administração de um antioxidante, como a L-car, modulou eficientemente o estresse oxidativo em pacientes com MSUD, abrindo novas perspectivas à abordagem terapêutica realizada atualmente, que é essencialmente dietética, e, portanto, de difícil manejo.

## CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que:

- **ARTIGO N° 1:**

- Verificou-se pela técnica de ensaio cometa *in vitro* que a Leu (100, 250, 500, 1000, 2500 e 3000  $\mu\text{M}$ ) e o seu  $\alpha$ -cetoácido correspondente, o KIC (30, 60, 150, 600, 1200 e 2000  $\mu\text{M}$ ), considerados os principais metabólitos neurotóxicos na MSUD, são capazes de causar danos ao DNA em leucócitos humanos saudáveis quando comparados a controles, e com uma tendência maior de dano ao DNA pelo aminoácido Leu.

- A L-car, nas concentrações de 90, 120 e 150  $\mu\text{M}$ , foi capaz de diminuir as lesões causadas pela Leu, quando comparada com o grupo controle;

- A partir de 120  $\mu\text{M}$  de L-car houve uma prevenção total dos índices de dano ao DNA causados pelo KIC.

- **ARTIGO N° 2:**

- Os pacientes MSUD tratados com dieta de restrição protéica e com deficiência de L-car, possuem altos níveis de lipoperoxidação plasmática e apresentam índices de dano ao DNA estatisticamente elevados comparados ao grupo controle.

- Após 1 e 2 meses de suplementação de L-car (50 mg/kg/dia), as concentrações plasmáticas deste composto foram reestabelecidas aos valores normais, assim como os níveis de dano oxidativo a lipídios nestes pacientes.

-A L-car foi capaz de diminuir o dano ao DNA comparativamente aos pacientes sem suplementação antioxidante.

- Foi observada uma correlação negativa estatisticamente significativa entre o dano ao DNA e as concentrações de L-car e uma correlação positiva entre o dano ao DNA e a lipoperoxidação, representado pelo conteúdo de MDA.

- **ARTIGO N° 3:**

- Foi verificado um aumento significativo nas concentrações de IL-1 $\beta$ , IL-6 e INF- $\gamma$  nos pacientes MSUD apenas com a dieta de restrição protéica, sem a suplementação de L-carnitina.

- A terapia com L-car (50 mg/kg/dia) reverteu os valores de IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$  aos níveis do controle e de IL-6 próximos a estes.

- Foi verificada uma correlação negativa entre todas as citocinas testadas e as concentrações de L-car e uma correlação positiva entre os níveis de MDA e os valores de IL-1 $\beta$  e IL-6.

- **ARTIGO N° 4:**

- Constatou-se que os parâmetros di-tirosina (dano oxidativo a proteínas) e isoprostanos (dano de lipoperoxidação) estavam aumentados e a capacidade antioxidante total diminuída na urina de pacientes MSUD sem terapia com L-car;

- A suplementação de L-car (50 mg/kg/dia) reduziu os níveis de di-tirosina e isoprostanos e aumentou a capacidade antioxidante urinária.

- Foi também observado um aumento de KIC urinário após dois meses de tratamento com L-car, quando comparado com o grupo controle, demonstrando um incremento da excreção deste metabólito tóxico.

- **ARTIGO N° 5:**

- A administração crônica de BCAA estimulou a lipoperoxidação, o dano oxidativo protéico, o aumento de espécies reativas e a diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, especialmente em córtex cerebral de ratos Wistar submetidos ao modelo crônico de MSUD. O tratamento com L-car foi capaz de prevenir esses efeitos, com exceção do dano oxidativo a proteínas.

É importante enfatizar que os resultados apresentados neste trabalho devem ser interpretados com cautela e devem ser confirmados em outros estudos, mas é possível sugerir que a suplementação com L-carnitina possa ser usada como um eficiente adjuvante na terapia dos pacientes MSUD.

## PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho, pretende-se:

- Dosar as concentrações plasmáticas de aloisoleucina em pacientes MSUD no momento do diagnóstico e durante o tratamento e correlacionar com os níveis dos principais metabólitos acumulados na doença;
- Avaliar o dano oxidativo ao DNA (bases oxidadas) em leucócitos dos pacientes, correlacionando com os níveis de aloisoleucina e com os principais metabólitos acumulados na doença;
- Avaliar os efeitos *in vitro* da aloisoleucina, na presença ou na ausência de L-carnitina, sobre o dano ao DNA em leucócitos periféricos através do ensaio de cometa, bem como investigar o possível reparo do dano ao DNA.
- Realizar o estudo molecular da MSUD em pacientes com diagnóstico dessa doença. Identificar a mutação no gene BCKAD associada à MSUD nesses pacientes, correlacionando com marcadores de estresse oxidativo e níveis de aloisoleucina.

## REFERÊNCIAS

Abdul, H.M.; Butterfield, D.A. Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 42:371-84, 2007.

Agarwal, A.; Said, T.M. Carnitines and male infertility. *Reprod. Biomed. Online.* 8:376–384, 2004.

Amaral, A.U.; Leipnitz, G.; Fernandes, C.G.; Seminotti, B.; Schuck, P.F.; Wajner, M. Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Res.* 1324:75-84, 2010.

Ames, B.N.; Shigenaga, M.K. Oxidants are a major contributor to aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 663:85-96, 1992.

Araújo, P.; Wassermann, G.F.; Tallini, K.; Furlanetto, V.; Vargas, C.R.; Wannmacher, C.M.D.; Dutra-Filho, C.S.; Wyse, A.T.S.; Wajner, M. Reduction of large neutral amino acid level in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem. Int.* 38:529-537, 2001.

Bahl, J.J.; Bressler, R. The pharmacology of carnitine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 27:257-77, 1987.

Barschak, A.G.; Sitta, A.; Deon, M.; Oliveira, M.H.; Haeser, A.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M.; Vargas, C.R. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with Maple Syrup Urine Disease. *Metab. Brain Dis.* 21:279–286, 2006.

Barschak, A.G.; Sitta, A.; Deon, M.; Barden, A.T.; Schmitt, G.O.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M.; Vargas, C.R. Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma selenium concentration are reduced in maple syrup urine disease patients during treatment. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25:335–338, 2007.

Barschak, A.G.; Sitta, A.; Deon, M.; Barden, A.T.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M.; Vargas, C.R. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab Brain Dis.* 23:71-80, 2008.

Binienda, Z.K.; Ali, S.F. Neuroprotective role of L-carnitine in the 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity. *Toxicol. Lett.* 125:67-73, 2001.

Boerrigter, M.E.; Franceschi, C.; Arrigoni-Martelli, E.; Wei, J.Y.; Vijg, J. The effect of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on the disappearance of DNA single-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis.* 14:2131-6, 1993.

Bremer, H. J.; Duran, M.; Karmeling, J. P.; Przyrembel, H.; Wadman, S.K. Disturbances of amino acids metabolism: Clinical chemistry and diagnosis. Munchen: Urban & Schwarzenberg, 1981.

- Bridi, R.; Araldi, J.; Sgarbi, M.B.; M.B., Testa; C.G., Durigon, K.; Wajner, M.; Dutra-Filho, C.S. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21:327-332, 2003.
- Bridi, R.; Braum, C.A.; Zorzi, G.K.; Wannmacher, C.M.; Wajner, M.; Lissi, E.G.; Dutra-Filho, C.S. Alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defenses in cerebral cortex from young rats. *Metab. Brain Dis.* 20:155-167, 2005a.
- Bridi, R.; Latini, A.; Braum, C.A.; Zorzi, G.K.; Moacir, W.; Lissi, E.; Dutra-Filho, C.S. Evaluation of the mechanism involved in leucine-induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic. Res.* 39:71-79, 2005b.
- Brüne, B.; Dehne, N.; Grossmann, N. et al. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid. Redox Signal.* 19:595-637, 2013.
- Burton, B. Inborn errors of metabolism in infancy: a guide to diagnosis. *Pediatrics.* 102:69-77, 1998.
- Calabrese, V.; Giuffrida, Stella, A.M.; Calvani, M.; Butterfield, D.A. Acetylcarnitine and cellular stress response: roles in nutritional redox homeostasis and regulation of longevity genes. *J. Nutr. Biochem.* 17:73-88, 2006.
- Campese, V.M.; Sindhu, R.K.; Ye, S.; Bay, Y.; Vaziri, N.D.; Jabbari, B. Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain. *Brain. Res.* 1134:27-32, 2007.
- Chakrabarti, S.; Sinha, M.; Thakurta, I.G.; Banerjee, P.; Chattopadhyay, M. Oxidative stress and amyloid beta toxicity in Alzheimer's disease: intervention in a complex relationship by antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 20:4648-64, 2013.
- Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A.C. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59:527-605, 1979.
- Chuang, D.T. Maple syrup urine disease: It has come a long way. *J. Pediat.* 132:S17-S23, 1998.
- Chuang, D.T.; Shih, V.E. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR., Beaudt AL, Sly WL, Valle D, 8<sup>a</sup> ed. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill. p. 1971-2005, 2001.
- Coitinho, A.S.; de Mello, C.F.; Lima, T.T.; de Bastiani, J.; Figuera, M.R.; Wajner, M. Pharmacological evidence that alpha-ketoisovaleric acid induces convulsions through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *Brain Res.* 894:68-73, 2001.
- Collins, A.R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim. Biophys. Acta.* 1840:794-800, 2014.
- Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Milzani, A.C.; Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.* 329:23-38, 2003.

Dalle-Donne, I.; Aldini, G.; Carini, M.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.*10: 389-406, 2006.

Dancis, J.; Levitz, M.; Miller, S.; Westall, R.G. Maple Syrup Urine Disease. *Brit Am J.* 10:91-93, 1959.

Dancis, J.; Hutzler, J.; Levitz, M. Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine disease. *Biochim Biophys Acta.* 43:342-343, 1960.

Danner, E.; Lemmon, S.K.; Besharse, J.C.; Elsas, L.J. Purification and characterization of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 254:5522-5526, 1979.

De Andrade, R.B.; Gemelli, T.; Rojas, D.B.; Funchal, C.; Dutra-Filho, C.S.; Wannmacher, C.M. Tyrosine impairs enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of rats. *Mol. Cell. Biochem.* 364:253-61, 2012.

Derin, N.; Izgut-Uysal, V.N.; Agac, A.; Aliciguzel, Y.; Demir, N. L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia –reperfusion induced lipid peroxidation. *J. Phys. Pharm.* 55:595–606, 2004, 2006.

Dizdaroglu, M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 763:212-245, 2015.

Famularo, G.; De Simone, C.; Trinchieri, V.; Mosca, L. Carnitines and its congeners: a metabolic pathway to the regulation of immune response and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1033:132-8, 2004.

Ferreira, A.L.; Matsubara, L.S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Rev. Associ. Med. Bras.* 43:61-68, 1997.

Fontella, F.U.; Gassen, E.; Pulrolnik, V.; Wannmacher, C.M.D.; Klein, A.B.; Wajner, M.; Dutra, C.S. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 17:47-54, 2002.

Fontes, F.L.; Pinheiro, D.M.; Oliveira, A.H.; Oliveira, R.K.; Lajus, T.B.; Agnez-Lima, L.F. Role of DNA repair in host immune response and inflammation. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 763:246-257, 2015.

Fridovich, I. Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* 44:147-157, 1975.

Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64:97-112, 1995.

Giugliani, R. Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. *Pediatria Moderna.* 23:29-40, 1998.

Gulcin, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci.* 78:803–811, 2006.



Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet*. 344:721-724, 1994.

Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem*. 97:1634-1658, 2006.

Halliwell, B., Gutteridge, M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4<sup>th</sup> ed. New York: Oxford University Press Inc, 2007.

Herber, S.; Schwartz, I.V.; Nalin, T.; Oliveira Netto, C.B.; Camelo Junior, J.S.; Santos, M.L.; Ribeiro, E.M.; Schüler-Faccini, L.; de Souza, C.F. Maple Syrup Urine Disease in Brazil: a panorama of the last two decades. *J. Pediatr (Rio J)*. 12: S0021-7557(14)00166-1, 2014.

Hoppel, C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am. J. Kidney Dis*. 41:S4-12, 2003.

Izgut-Uysal, V.N.; Agac, A.; Derin, N. Effect of carnitine on stress-induced lipid peroxidation in rat gastric mucosa. *J. Gastroenterol*. 36:231-236, 2001.

Janmey, P.A.; Wells, R.G.; Assoian, R.K.; McCulloch. From tissue mechanics to transcription factors. *Differentiation*. 86:112-20, 2013.

Jardim, L.B.; Martins, C.S.; Pires, R.S.; Sanseverino, M.T.; Refosco, L.; Vieira, R.C.; Trotta, E.A.; Vargas C.R.; Neto, E.C.; Giugliani, R. Uma experiência terapêutica no manejo da doença da urina do xarope do bordo. *Jornal de Pediatria*. 71:279-284, 1995.

Jimenez-Sanchez, G.; Childs, B.; Valle, D. The effect of mendelian disease on human health. In: Scriver C.R., Beaudt A.L., Sly W.L., Valle D. (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8ed, New York: McGraw-Hill, 2001.

Jouvet, P.; Rustin, P.; Taylor, D.L.; Pocock, J.M.; Felderhoff-Mueser, U.; Mazarakis, N.D.; Sarraf, C.; Joashi, U.; Koszma, M.; Greenwood, K.; Edwards, A.D.; Mehmet, H. Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. *Mol. Biol. Cell*. 11:1919-1932, 2000.

Lee, B.J.; Lin, J.S.; Lin, Y.C.; Lin, P.T. Effects of L-carnitine supplementation on oxidative stress and antioxidant enzymes activities in patients with coronary artery disease: a randomized, placebo-controlled trial. *Nutr. J*. 4;13:79, 2014.

Li, J.L.; Wang, Q.Y.; Luan, H.Y.; Kang, Z.C.; Wang, C.B. Effects of L-carnitine against oxidative stress in human hepatocytes: involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J. Biomed. Sci*. 21:19-32, 2012.

Lipinski, B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2012:809696, 2012.

Lugrin, J.; Rosenblatt-Velin, N.; Parapanov, R.; Liaudet, L. The role of oxidative stress during inflammatory process. *Biol. Chem*. 395:203-30, 2014.

Lushchak, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224C:164-175, 2014.

Mangge, H.; Becker, K.; Fuchs, D.; Gostner, J.M. Antioxidants: Inflammation and cardiovascular disease. *World J Cardiol* 6:462-77, 2014.

Maxwell, R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs.* 49:345-361, 1995.

Mena, N.P.; Urrutia, P.J.; Lourido, F.; Carrasco, C.M.; Núñez, M.T. Mitochondrial iron homeostasis and its dysfunctions in neurodegenerative disorders. *Mitochondrion.* 21C:92-105, 2015.

Menkes, J.H.; Hurst, P.L.; Craig, J.M. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics.* 14:462-467, 1954.

Mescka, C.; Moraes, T.; Rosa, A.; Mazzola, P.; Piccoli, B.; Jacques, C.; Dalazen, G.; Coelho, J.; Cortes, M.; Terra, M.; Regla Vargas, C.; Dutra-Filho, C.S. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 26:21-8, 2011.

Mescka, C.P.; Wayhs, C.A.; Vanzin, C.S.; Biancini, G.B.; Guerreiro, G.; Manfredini, V.; Souza, C.; Wajner, M.; Dutra-Filho, C.S.; Vargas, C.R. Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: l-carnitine effect. *Int. J. Dev. Neurosci.* 31:21-4, 2013.

Muñoz, A.; Costa, M. Nutritionally Mediated Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013:610950, 2013.

Morton, D.H.; Strauss, K.A.; Robinson, D.L.; Puffenberger, E.G.; Kelley, R.I. Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics.* 109:999-1008, 2002.

Muelly, E.R.; Moore, G.J.; Bunce, S.C.; Mack, J.; Bigler, D.C.; Morton, D.H.; Strauss, K.A. Biochemical correlates of neuropsychiatric illness in maple syrup urine disease. *J. Clin. Invest.* 123:1809-20, 2013.

Muriach, M.; Flores-Bellver, M.; Romero, F.J.; Barcia, J.M. Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014:102158, 2014.

Muthuswamy, A.D.; Vedagiri, K.; Ganesan, M.; Chinnakannu, P. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: role of L-carnitine and DL-alpha-lipoic acid. *Clin. Chim. Acta.* 368:84-92, 2006.

Ninfali, P.; Ditroilo, M.; Capellacci, S.; Biagiotti, E. Rabbit brain glucose-6-phosphate dehydrogenase: biochemical properties and inactivation by free radicals and 4-hydroxy-2-nonenal. *Neuroreport.* 12:4149-53, 2001.

Ogier de Baulny, H.; Saudubray, J.M. Branched-chain organic acidurias. *Semin. Neonatol.* 7:65-74, 2002.

Okusaga, O.O. Accelerated aging in schizophrenia patients: the potential role of oxidative stress. *Aging Dis.* 5:256-62, 2013.

Pederzoli, C.D.; Mescka, C.P.; Magnusson, A.S.; Deckmann, K.B.; Streck, E.; Sgaravatti, A.M.; Sgarbi, M.B.; Wyse, A.T.; Wannmacher, C.M.; Wajner, M.; Dutra-Filho, C.S. N-acetylaspartic acid impairs enzymatic antioxidant defenses and enhances hydrogen peroxide concentration in rat brain. *Metab. Brain Dis.* 25:251-259, 2010.

Peinemann, F.; Danner, D.J. Maple syrup urine disease 1954 to 1993. *J. Inherit. Metab. Dis.* 17:3-15, 1994.

Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63:1035-42, 2000.

Pilla, C.; Cardozo, R.F.; Dutra-Filho, C.S.; Wyse, A.T.; Wajner, M.; Wannmacher, C.M. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem. Res.* 28:675-9, 2003.

Quental, S.; Macedo-Ribeiro, S.; Matos, R.; Vilarinho, L.; Martins, E.; Teles, E.L.; Rodrigues, E.; Diogo, L.; Garcia, P.; Eusébio, F.; Gaspar, A.; Sequeira, S.; Furtado, F.; Lança, I.; Amorim, A.; Prata, M.J. Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. *Mol. Genet. Metab.* 94:148-56, 2008a.

Quental, S.; Martins, E.; Vilarinho, L.; Amorim, A.; João Prata, M. Maple syrup urine disease due to a new large deletion at BCKDHA caused by non-homologous recombination. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2:S457-60, 2008b.

Rajasekov, P.; Kaviarashn, S.; Anuradha, C.V. L-carnitine administration prevents oxidative stress in high fructose-fed insulin resistant rats. *Diabetologia Croatica.* 34:21-28, 2005.

Rani, P.J.; Panneerselvam, C. Effect of L-carnitine on brain lipid peroxidation and antioxidant enzymes in old rats. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 57:B134– B137, 2002.

Ravanat, J.L.; Cadet, J.; Douki, T. Oxidatively generated DNA lesions as potential biomarkers of in vivo oxidative stress. *Curr. Mol. Med.* 12:655-71, 2012.

Requena, J.R.; Levine, R.L.; Stadtman, E.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids.* 25:221–226, 2003.

Resnick, A.Z.; Packer, L. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. *Free Radicals: from Basic Science to Medicine.* Basel: Birkhäuser Verlag, p. 425-437, 1993.

Ribas, G.S.; Manfredini, V.; De Mari, J.F.; Wayhs, C.Y.; Vanzin, C.S.; Biancini, G.B.; Sitta, A.; Deon, M.; Wajner, M.; Vargas, C.R. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of l-carnitine supplementation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28:127–132, 2010a.

Ribas G.S.; Manfredini, V.; De Marco, M.G.; Vieira, R.B.; Wayhs, C.Y.; Vanzin, C.S.; Biancini, G.B.; Wajner, M.; Vargas, C.R. Prevention by l-carnitine of DNA damage induced

by propionic and l-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. *Mut. Res.* 702:123–128, 2010b.

Ribas, G.S.; Biancini, G.B.; Mescka, C.; Wayhs, C.Y.; Sitta, A.; Wajner, M.; Vargas, C.R. Oxidative stress parameters in urine from patients with disorders of propionate metabolism: a beneficial effect of L:-carnitine supplementation. *Cell. Mol. Neurobiol.*32:77-82, 2012.

Ribeiro, C.A.; Sgaravatti, A.M.; Rosa, R.B.; Schuck, P.F.; Grando, V.; Schmidt, A.L.; Ferreira, G.C.; Perry, M.L.S.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M. Inhibition of Brain Energy Metabolism by the Branched-chain Amino Acids Accumulating in Maple Syrup Urine Disease. *Neurochem. Res.* 33:114–124, 2008.

Salminen, L.E.; Paul, R.H. Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review. *Rev. Neurosci.* 25:805-19, 2014.

Sanseverino, M.T.V.; Wajner, M.; Guigliani, R. Aplicação de um protocolo clínico-laboratorial para identificação de erros inatos do metabolismo em crianças gravemente enfermas. *J Peds.* 76:375-382, 2000.

Saudubray, J.M.; Charpentier, C. Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. 8<sup>a</sup> ed. *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* New York: MacGraw-Hill, 2001.

Scaini, G.; Jeremias, I.C.; Morais, M.O.; Borges, G.D.; Munhoz, B.P.; Leffa, D.D.; Andrade, V.M.; Schuck, P.F.; Ferreira, G.C.; Streck, E.L. DNA damage in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol. Genet. Metab.* 106:169-74, 2012.

Scaini, G.; Mello-Santos, L.M.; Furlanetto, C.B.; Jeremias, I.C.; Mina, F.; Schuck, P.F.; Ferreira, G.C.; Kist, L.W.; Pereira, T.C.; Bogo, M.R.; Streck, E.L. Acute and chronic administration of the branched-chain amino acids decreases nerve growth factor in rat hippocampus. *Mol. Neurobiol.* 48:581-9, 2013.

Scaini, G.; Comim, C.M.; Oliveira, G.M.; Pasquali, M.A.; Quevedo, J.; Gelain, D.P.; Moreira, J.C.; Schuck, P.F.; Ferreira, G.C.; Bogo, M.R.; Streck, E.L. Chronic administration of branched-chain amino acids impairs spatial memory and increases brain-derived neurotrophic factor in a rat model. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36:721-30, 2013.

Scaini, G.; Morais, M.O.; Furlanetto, C.B.; Kist, L.W.; Pereira, T.C.; Schuck, P.F.; Ferreira, G.C.; Pasquali, M.A.; Gelain, D.P.; Moreira, J.C.; Bogo, M.R.; Streck, E.L. Acute Administration of Branched-Chain Amino Acids Increases the Pro-BDNF/Total-BDNF Ratio in the Rat Brain. *Neurochem. Res.* 40:885-93, 2015.

Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. 8<sup>a</sup> ed. *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* New York: MacGraw-Hill, 2001.

Serra, J.D.; Sánchez, F.A.; Visus, F.S.D. Enfermedades de orina de jarabe arce. In: Saunjurjo, P.; Baldellou, A. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias.* Madrid: Eddiciones Ergon, p 487-498.

Sierra, C.; Vilaseca, M.A.; Moyano, D.; Brandi, N.; Campistol, J.; Lambruschini, N.; Cambra,

F.J.; Deulofeu, R.; Mira, A. Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin. Chim. Acta.* 276:1-9, 1998.

Simon, E.; Fingerhut, R.; Baumkötter, J.; Konstantopoulou, V.; Ratschmann, R.; Wendel, U. Maple syrup urine disease: favourable effect of early diagnosis by newborn screening of the neonatal course of the disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29:532-537, 2006.

Singh, N.; McCoy, M.; Tice, R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp. Cell. Res.* 175:184–191, 1988.

Sitta, A.; Barschak, A.G.; Deon, M.; Terroso, T.; Pires, R.; Giugliani, R.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M.; Vargas, C.R. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab. Brain Dis.* 21:287-296, 2006.

Sitta, A.; Barschak, A.G.; Deon, M.; Mari, J.; Barden, A.T.; Vanzin, C.S.; Biancini, G.B.; Schwartz, I.V.; Wajner, M.; Vargas, C.R. L-Carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. *Cell. Mol. Neurobiol.* 29:211-218, 2009.

Sitta, A.; Vanzin, C.S.; Biancini, G.B.; Manfredini, V.; de Oliveira, A.B.; Wayhs, C.A.; Ribas, G.O.; Giugliani, L.; Schwartz, I.V.; Bohrer, D.; Garcia, S.C.; Wajner, M.; Vargas, C.R. Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell. Mol. Neurobiol.* 31:429-36, 2011.

Sitta, A.; Ribas, G.S.; Mescka, C.P. et al. Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. *Cell. Mol. Neurobiol.* 34:157-65, 2014.

Sgaravatti, A.M.; Rosa, R.B.; Schuck, P.F. Inhibition of brain energy metabolism by the a-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochem. Biophys. Acta.* 1639:232–238, 2003.

Shigematsu, Y.; Kikuchi, K.; Momoi, T.; Sudo, M.; Kikawa, Y.; Nosaka, K.; Kuriyama, M.; Haruki, S.; Sanada, K.; Hamano, N. Organic acids and branched-chain amino acids in body fluids before and after multiple exchange transfusions in maple syrup urine disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 6:183-189, 1983.

Snyderman, S.E.; Norton, P.M.; Roitman, E. Maple syrup urine disease with particular reference to diet therapy. *Pediatrics.* 34:454-472, 1964.

Skvorak, K.J.; Paul, H.S.; Dorko, K.; Marongiu, F.; Ellis, E.; Chace, D.; Ferguson, C.; Gibson, K.M.; Homanics, G.E.; Strom, SC. Hepatocyte transplantation improves phenotype and extends survival in a murine model of intermediate maple syrup urine disease. *Mol. Ther.* 17:1266-73, 2009.

Solarska, K.; Lewińska, A.; Karowicz-Bilińska, A.; Bartosz, G. The antioxidant properties of carnitine in vitro. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 15:90-7, 2010.

Stadtman, E.R.; Levine, R.L. Free-radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 25:207–218, 2003.

Stadtman, E.R. Cyclic oxidation and reduction of methionine residues of proteins in antioxidant defense and cellular regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 423:2-5, 2004.

Tashian, R.E. Inhibition of brain glutamic acid decarboxylase by phenylalanine, valine, and leucine derivatives: a suggestion concerning the etiology of the neurological defect in phenylketonuria and branched-chain ketonuria. *Metabolism*. 10:393-402, 1961.

Tavares, R.G.; Santos, C.E.S.; Tasca, C.; Wajner, M.; Souza, D.O.; Dutra-Filho, C.S. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *J. Neurol. Sci.* 181:44-49, 2000.

Thangasamy, T.; Jeyakumar, P.; Sittadjody, S.; Joyee, A.G.; Chinnakannu, P. L-carnitine mediates protection against DNA damage in lymphocytes of aged rats. *Biogerontology*. 10:163-72, 2009.

Tice, R.R.; Agurell, D.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.C.; Sasaki, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221, 2000.

Treacy, E.; Clow, C.L.; Reade, T.R.; Chitayat, D.; Mamer, O.A.; Scriver, C.R. Maple syrup urine disease: interrelationship between branched chain amino-, oxo- and hydroxyacids implications for treatment association with CNS dysmyelination. *J. Inherit. Metab. Dis.* 15:121-135, 1992.

Tribble, D.; Shapira, R. Myelin proteins: degradation in rat brain initiated by metabolites causative of maple syrup urine disease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 114:440-446, 1983.

Urrutia, P.J.; Mena, N.P.; Núñez, M.T. The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders. *Front. Pharmacol.* 10;5:38, 2014.

Wajner, M.; Latini, A.; Wyse, A.T.; Dutra-Filho, C.S. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27:427-448, 2004.

Walsh, K.S.; Scott, M.N. Neurocognitive profile in a case of maple syrup urine disease. *Clin. Neuropsychol.* 24:689-700, 2010.

Wendel, A. Glutathione peroxidase. *Method. Enzymol.* 77:325-332, 1981.

Winter, B.K.; Fiskum, G.; Gallo, L.L. Effects of L-carnitine on serum triglyceride and cytokine levels in rat models of cachexia and septic shock. *Br. J. Cancer* 72:1173-9, 1995.

Wu, C.; Gopal, K.V.; Moore, E.J.; Gross, G.W. Antioxidants L-carnitine and D-methionine modulate neuronal activity through GABAergic inhibition. *J. Neural. Transm.* 121:683-93, 2014.

Yang, M.S.; Chan, H.W.; Yu, L.C. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology*. 226:126-130, 2006.

Ye, J.; Li, J.; Yu, Y.; Wei, Q.; Deng, W.; Yu, L. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. *Regul. Pept.* 161:58-66, 2010.

Yudkoff, M.; Daikhin, Y.; Nissim, I.; Pleasure, D.; Stern, J.; Nissim, I. Inhibition of astrocyte glutamine production by alpha ketoisocaproic acid. *J. Neurochem.* 63:1508-15, 1994.

Zablocka, A.; Janusz, M. The two faces of reactive oxygen species. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* 26:118-124, 2008.

# ANEXOS

## ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

### COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 140191

Data da Versão do Projeto:

**Pesquisadores:**

CARMEN REGLA VARGAS

MARION DEON

CAROLINE PAULA MESCKA

GILIAN BATISTA BALBUENO GUERREIRO

BRUNA DONIDA

**Título:** Papel da L-carnitina e do fator de transcrição nuclear kappa B na modulação do estresse oxidativo na Doença da Urina do Xarope do Bordo

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 22 de abril de 2014.

Prof. Eduardo Pandolfi Passos  
Coordenador GPPG/HCPA



## **ANEXO 2 - SOLICITAÇÃO DE INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DIRIGIDA PARA PACIENTES:**

**Nome completo do Paciente:**

**Data de Nascimento:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (DD/MM/AAAA)

**Sexo:** ( ) masc. ( ) fem ( ) obs.

**Nome do médico solicitante:**

**Nome de outro médico ou pessoa para contato:**

**Serviço de origem:**

**Data da solicitação:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (DD/MM/AAAA)

**Amostras Enviadas:**

( ) urina

( ) plasma

( ) sangue heparinizado

( ) sangue em papel filtro

( ) outra (descrever)

**Exames Solicitados:**

**Motivo principal da solicitação:**

**Resumo da história clínica:**

**Sinais e sintomas selecionados:**

hepatomegalia

( ) não ( ) sim

retardo de crescimento

( ) não ( ) sim

retardo neuropsicomotor

( ) não ( ) sim

deficit cognitivo

( ) não ( ) sim

regressão neurológica

( ) não ( ) sim

vômitos

( ) não ( ) sim

dificuldade alimentação

( ) não ( ) sim

dismorfias

( ) não ( ) sim

convulsões

( ) não ( ) sim

hipotonia

( ) não ( ) sim

coma

( ) não ( ) sim

macrocefalia

( ) não ( ) sim

outro:

( ) não ( ) sim

**Principais resultados de exames relevantes anteriores:**

**Dados laboratoriais selecionados:**

hiperamoniemia  não  sim:  
hipoglicemia  não  sim:  
acidose metabólica  não  sim  
cetonúria  não  sim  
acidemia láctica  não  sim

**Neuroimagem:**

tomografia computadorizada  não  sim  
 normal  anormal  
ressonância magnética  não  sim  
 normal  anormal

**Medicamentos em uso:**  não  sim

**Dieta especial?**  não  sim

**Consangüinidade entre os pais:**  não  sim  
**Outros casos na família?**  não  sim

**Hipóteses diagnósticas:**

**Alguma informação relevante adicional?**

## ANEXO 3 - FICHA DE DADOS DE INDIVÍDUOS CONTROLE

1. Data da coleta:

2. Nome completo:

3. Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (DD/MM/AAAA)

4. Idade:

5. Sexo: ( ) masc. ( ) fem.

6. Motivo da solicitação do exame:

7. Apresenta doenças já diagnosticadas?

diabete melito	( ) não ( ) sim
hipotireoidismo	( ) não ( ) sim
hipertireoidismo	( ) não ( ) sim
hipertensão arterial sistêmica (HAS)	( ) não ( ) sim
acidente vascular cerebral (AVC)	( ) não ( ) sim
cardiopatia isquêmica	( ) não ( ) sim
insuficiência cardíaca	( ) não ( ) sim
insuficiência hepática	( ) não ( ) sim
insuficiência renal	( ) não ( ) sim
outras: _____	

8. Está usando medicamento? ( ) não ( ) sim: \_\_\_\_\_

9. Doenças na família biológica:

dislipidemia	( ) não ( ) sim
hipertensão arterial sistêmica (HAS)	( ) não ( ) sim
cardiopatia isquêmica	( ) não ( ) sim
acidente vascular cerebral (AVC)	( ) não ( ) sim
diabete melito	( ) não ( ) sim
outra doença crônica: _____	

10. Fuma? ( ) não ( ) sim

## **ANEXO 4 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PACIENTES MSUD**

Projeto de Pesquisa: Papel da L-carnitina e do fator de transcrição nuclear kappa B na modulação do estresse oxidativo na Doença da Urina do Xarope do Bordo

Investigador Responsável: Carmen Regla Vargas

Colaboradores: Caroline Paula Mescka, Bruna Donida, Desiree Padilha Marchetti, Gilian Batista Balbueno Guerreiro, Marion Deon.

O menor pelo qual você é responsável está sendo convidado(a) a participar de um estudo realizado pelo Grupo de Pesquisa de Erros Inatos do Metabolismo e Estresse Oxidativo do Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA). A participação neste projeto deve-se ao fato do paciente ter altos níveis plasmáticos dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina. Esta característica está associada a uma doença genética chamada Doença da Urina do Xarope do Bordo (MSUD).

Recentemente foi demonstrado que pessoas com esta doença apresentam um aumento do estresse oxidativo. Esta é uma característica metabólica relacionada a um aumento na quantidade dos radicais livres produzidos que podem causar alguns danos ao nosso organismo e participar de outras doenças. Além disso, também foi descoberto que os pacientes MSUD possuem deficiência de um antioxidante chamado L-carnitina, que pode ser capaz de diminuir a atuação dos radicais livres.

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar o efeito da substância antioxidante L-carnitina sobre o estresse oxidativo encontrado em indivíduos com MSUD mutações em comparação com indivíduos sem esta doença. Já é bem entendido que a L-carnitina esta pode corrigir e diminuir a quantidade dos radicais livres e essa substância é hoje utilizada para tratamento em diferentes situações clínicas. A participação nessa pesquisa é voluntária. Se você aceitar que o menor participe, o paciente MSUD vai receber gratuitamente a suplementação de L-carnitina na dose 50 mg/kg/dia, não excedendo 1,5g/dia por 60 dias. Cabe salientar que não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante não terá nenhum custo com os procedimentos envolvidos. Além da administração de L-carnitina, será coletado sangue periférico e urina em três momentos diferentes em frascos específicos (total de 10 ml, equivalente a duas colheres de chá) de cada fluido. A primeira coleta será realizada antes do início do tratamento, a segunda coleta após um mês de tratamento com L-carnitina e a terceira após dois meses. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. As coletas de urina serão feitas pelo próprio paciente ou com o auxílio de profissionais treinados. Potenciais efeitos adversos relacionados à medicação são sintomas gastrointestinais como diarreia, cólicas ou vômitos, no entanto estes não são frequentes. Não são esperados casos de hipersensibilidade. Esta medicação é de livre comércio e aprovada por agências reguladoras nacionais e internacionais. Após o término do estudo os materiais biológicos (sangue periférico e urina) que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos

para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome e do paciente pelo qual você é responsável não serão revelados. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os registros médicos do paciente a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa.

Sua participação no estudo é voluntária. **Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o tratamento do paciente que você é responsável no hospital.** A participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, não terá penalização (a).

Cabe salientar que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o tratamento e/ou acompanhamento médico do paciente no qual você é responsável. Este estudo pode, entretanto, contribuir no futuro, para um tratamento mais efetivo para os pacientes MSUD e melhor entendimento das consequências do estresse oxidativo.

Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados do estudo, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis.

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar o pesquisador responsável, no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-8011 ou poderá contatar o Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-7640 de segunda à sexta, das 8 às 17h.

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por \_\_\_\_\_ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de decisão sobre participar ou não do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

**Data:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**Nome do Paciente:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Nome do responsável legal:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Pesquisador que aplica o termo: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **ANEXO 5 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PACIENTES CONTROLES**

Projeto de Pesquisa: Papel da L-carnitina e do fator de transcrição nuclear kappa B na modulação do estresse oxidativo na Doença da Urina do Xarope do Bordo

Investigador Responsável: Carmen Regla Vargas.

Colaboradores: Caroline Paula Mescka, Bruna Donida, Desiree Padilha Marchetti, Gilian Batista Balbueno Guerreiro, Marion Deon.

O menor pelo qual você é responsável está sendo convidado(a) a participar de um estudo realizado pelo Grupo de Pesquisa de Erros Inatos do Metabolismo e Estresse Oxidativo do Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA). Este projeto procura investigar uma doença genética chamada de Doença da Urina do Xarope do Bordo (MSUD). Recentemente foi demonstrado que pessoas com esta doença apresentam um aumento do estresse oxidativo. Esta é uma característica metabólica relacionada a um aumento na quantidade dos radicais livres produzidos que podem causar alguns danos ao nosso organismo e participar de outras doenças. Além disso, também foi descoberto que os pacientes MSUD possuem deficiência de um antioxidante chamado L-carnitina, que pode ser capaz de diminuir a atuação dos radicais livres. Essa substância é hoje utilizada para tratamento em diferentes situações clínicas

Para que este estudo seja realizado, é necessária uma comparação entre um grupo de pacientes que apresentam a doença MSUD com um grupo de pacientes que não apresentam. A participação neste projeto deve-se ao fato de que a criança que você é responsável legal pode participar do grupo controle, ou seja, como não portador de MSUD. A participação nessa pesquisa é voluntária. Se você aceitar que o menor participe, ele irá coletar sangue periférico e urina uma única vez (total de 10 ml, equivalente a duas colheres de chá) de cada fluido, juntamente com as coletas solicitadas rotineiramente pelo médico realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS (LAC- FacFar). Cabe salientar que não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante não terá nenhum custo com os procedimentos envolvidos. Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de um questionário realizado com você a respeito da criança que você é responsável legal e da coleta de sangue periférico e de urina que serão realizadas. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. As coletas de urina serão feitas pelo próprio paciente ou com o auxílio de profissionais treinados. Após o término do estudo os materiais biológicos (sangue periférico e urina) que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

( ) autoriza o armazenamento.

( ) não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

A participação neste estudo não trará benefício direto ao menor, porém, os dados advindos com a doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novos tratamentos para esta doença, bem como para o melhor entendimento desta patologia.

Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados do estudo, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis.

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome e do paciente pelo qual você é responsável legal não serão revelados. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os registros médicos do paciente a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa.

Sua participação no estudo é voluntária. **Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o tratamento do paciente que você é responsável.** A participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, não terá penalização (a).

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar o pesquisador responsável, no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-8011 ou poderá contatar o Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-7640 de segunda à sexta, das 8 às 17h.

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por \_\_\_\_\_ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de decisão sobre participar ou não do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

**Data:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**Nome do Paciente:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Nome do responsável legal:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_



Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Pesquisador que aplica o termo: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

# ANEXO 6 - CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE DOUTORADO – PRÓ-REITORIA DE PESQUISA DA UFRGS / COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**U F R G S**

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



## **CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 23799

**Título:**

Papel da L-carnitina e do fator de transcrição nuclear kappa B na modulação do estresse oxidativo na Doença da Urina do Xarope do Bordo

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

CARLOS SEVERO DUTRA FILHO - coordenador de 01/08/2013 até 31/07/2017

CARMEN REGLA VARGAS - coordenador de 01/08/2013 até 31/07/2017

Caroline Paula Mescka - Aluno de Doutorado de 01/08/2013 até 31/07/2017

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 96 ratos Wistar de 15 dias e 120 ratos Wistar de 5 a 7 dias (machos e fêmeas), de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.***

Porto Alegre, Quarta-Feira, 8 de Maio de 2013

STELA MARIS KUZE RATES  
Coordenador da comissão de ética