

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DEFICIÊNCIA DE SULFITO
OXIDASE**

FÁBRIA CHIARANI

ORIENTADORA

Prof^a. Dr^a. Angela Teresinha de Souza Wyse

CO-ORIENTADOR

Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2008

Dedicação

Dedico esta dissertação de mestrado a
uma pessoa muito especial, Leonardo,
pelo apoio, companheirismo e dedicação.

Agradecimentos

- À professora orientadora Angela T. S. Wyse pela orientação, oportunidade e incentivo.
- Ao professor Carlos Alexandre Netto pela co-orientação
- Aos colegas e professores dos laboratórios 34, 36 e 38 , em especial ao professor Clóvis M. D. Wannmacher pela amizade e ensinamentos e às doutorandas Caren S. Bavaresco, Cristiane Matté, Daniela Delwing e Débora Delwing.
- Ao curso de Pós-graduação
- Aos funcionários, professores e amigos do departamento de Bioquímica.
- Aos meus pais, Ivo Chiarani e Marisa T. Chiarani.
- Aos colegas de trabalho da farmácia do Hospital Nossa Senhora da Conceição pelo incentivo.
- À todos os amigos que torceram por mim.
- *À Deus por ter me dado forças para alcançar meus objetivos.*

Resumo

A deficiência de sulfito oxidase é uma doença autossômica recessiva que afeta o metabolismo da metionina e cisteína. Os indivíduos afetados comumente apresentam, no período neonatal, convulsões refratárias, retardo mental e desordens do movimento cuja fisiopatologia é desconhecida. Os distúrbios no desenvolvimento e o dano cerebral podem ocorrer como resultado do acúmulo tecidual de sulfito no cérebro. Os objetivos deste estudo foram verificar os efeitos *in vitro* e *in vivo* do sulfito sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo (avaliação de lipoperoxidação e capacidade antioxidante tecidual) e sobre a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos. Primeiramente, verificamos o efeito *in vitro* do sulfito sobre o estresse oxidativo e a Na⁺, K⁺-ATPase em cérebro de ratos de 10 e 60 dias. Posteriormente, nos estudos *in vivo*, investigamos o efeito da administração intracerebroventricular de sulfito sobre os parâmetros estudados *in vitro*. Os estudos *in vitro* demonstraram uma ação direta do sulfito (500µM) na indução de estresse oxidativo verificada pela redução na atividade da catalase e aumento da peroxidação lipídica, enquanto que nos estudos *in vivo* o sulfito não alterou a atividade das enzimas antioxidantes, TRAP ou TBARS. Tanto nos estudos *in vitro* como *in vivo*, o sulfito mostrou-se incapaz de alterar a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase. Nossos resultados, em conjunto, não excluem o potencial efeito neurotóxico do sulfito na fisiopatologia da doença. O conhecimento dos níveis deste composto no cérebro pode evidenciar além da condição de estresse oxidativo, o comprometimento de outras vias metabólicas importantes no funcionamento cerebral e podem apontar estratégias terapêuticas na prevenção dos efeitos neurológicos da deficiência de sulfito oxidase.

Abstract

The sulfite oxidase deficiency is a rare autosomal recessive disorder affecting the metabolism of methionine and cysteine. Affected individuals commonly present in the neonatal period intractable seizures, mental retardation and movement disorder which the physiopathology is unknown. The disturbed development and damage to the brain might occur as a result of tissue accumulation of sulfite in the cerebro. The objectives of this study was to investigate the *in vitro* and *in vivo* effects of sulfite on some parameters of oxidative stress (lipoperoxidation and antioxidant capacity) and on Na⁺, K⁺-ATPase activity in cerebral cortex, striatum and hippocampus from rats. Firstly, we verified the *in vitro* effects of sulfite on oxidative stress and Na⁺, K⁺-ATPase in brains from 10 and 60 days old rats. In the subsequent events, in the *in vitro* studies, we investigated the effect of intracerebroventricular injection of sulfite on the same parameters studied *in vitro*. The *in vitro* studies showed a direct action of sulfite (500 μM) in the induction of oxidative stress through the decrease of catalase activity and increase of peroxidation lipid, while the *in vivo* studies didn't alter the antioxidants enzyme activity, TRAP or TBARS. Both *in vitro* and *in vivo* studies, showed that sulfite was incapable to disturb the Na⁺,K⁺-ATPase activity. Our results, together, don't exclude the potencial neurotoxic effect of sulfite in the physiopathology of disease. The knowledge of levels from this compound in the brain can show over there the oxidative stress, the compromise of others metabolic pathways important to the brain function and can to lead to strategies therapeutics in the prevention of neurologic effects on sulfite oxidase deficiency.

Lista de Abreviaturas

ATP - Adenosina trifosfato

CAT - Catalase

Cys - Cisteína

DNA - ácido desoxirribonucléico

EIM - Erros inatos do metabolismo

GSH - Glutathiona

GSH-Px - Glutathiona peroxidase

Met - Metionina

NO - Óxido nítrico

ROS - espécies reativas de oxigênio

SNC - sistema nervoso central

SOD - Superóxido dismutase

SOX - Sulfito oxidase

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRAP - capacidade antioxidante tecidual não enzimática

Sumário

Pág.

1. Introdução.....	3
1.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	3
1.2 Erros Inatos do Metabolismo dos Aminoácidos.....	4
1.2.1 Metabolismo dos Aminoácidos Sulfurosos	5
1.3 Deficiência de sulfito Oxidase.....	7
1.3.1 Conceitos.....	7
1.3.2 Sinais e Sintomas.....	7
1.3.3 Achados Laboratoriais.....	8
1.3.4 Patogênese.....	9
1.3.5 Tratamento.....	10
1.4 Sulfito.....	10
1.5 Sulfito e danos cerebrais.....	11
1.6 Proteína Na ⁺ , K ⁺ - ATPase.....	15
1.7 Estresse Oxidativo.....	17
2. Objetivos Gerais.....	19
3. Capítulo I – Artigo	20
4. Capítulo II – Resultados não submetidos à publicação.....	30
4.1 Objetivos.....	30
4.2 Materiais e Métodos.....	30
4.2.1 Preparação Tecidual.....	31
4.2.2 Preparação da membrana plasmática sináptica.....	31
4.2.3 Dosagem da atividade da Na ⁺ , K ⁺ - ATPase.....	31
4.2.4 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	32
4.2.5 Capacidade Antioxidante Total não-enzimática (TRAP).....	32
4.2.6 Determinação das enzimas antioxidantes.....	33
4.2.7 Determinação das proteínas.....	34

4.2.8	Análise estatística.....	34
4.3	Resultados.....	34
5.	Discussão.....	37
6.	Conclusões.....	42
7.	Perspectivas.....	43
8.	Referências Bibliográficas.....	44
9.	Lista de Figuras e Tabelas.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

O termo Erros Inatos do Metabolismo (EIM) foi introduzido em 1908 por Achibald Garrot. Os EIM representam um subgrupo de doenças genéticas de herança autossômica recessiva caracterizadas por disfunção de uma proteína, geralmente uma enzima, envolvida no metabolismo celular. Até o momento, aproximadamente 500 doenças diferentes foram identificadas, representando um terço das doenças genéticas (El Husny & Fernandes-Caldato, 2006). Os EIM apresentam-se relativamente freqüentes em seu conjunto, podendo atingir 1 em 100 nascidos vivos (Scriver et al., 2001). Estes números podem representar não só a raridade dos distúrbios, mas também, a subestimação dos diagnósticos. Estas doenças podem afetar muitos órgãos, incluindo fígado, rim, coração e músculo, entretanto, na maioria dos casos envolvem o sistema nervoso central e podem apresentar desordens neurológicas. Os primeiros sintomas clínicos normalmente se manifestam na infância, mas em alguns casos podem aparecer na adolescência ou idade adulta (Giugliani, 1988).

Os EIM podem ser classificados em três grupos:

Grupo I – Erros inatos do metabolismo intermediário que culminam com intoxicação aguda ou crônica. Neste grupo estão incluídos os erros inatos do catabolismo dos aminoácidos e as acidúrias orgânicas.

Grupo II – Deficiência na produção e utilização de energia pelos tecidos. Este grupo pode ser dividido em defeito da cadeia respiratória mitocondrial e acidemias lácticas congênitas.

Grupo III – Distúrbios de síntese e catabolismo de moléculas complexas. Todas as doenças de armazenamento lisossomal, doenças peroxissomais são enquadradas neste grupo (Saudubray et al., 2006)

O tratamento dos EIM pode ser abordado de diferentes formas:

- reposição enzimática para substituir a enzima deficiente;
- estimulação da atividade enzimática residual ou caminhos alternativos através de cofatores ou sobrecarga de substratos;
- redução da concentração do composto tóxico através de restrição dietética ou por inibição da síntese deste composto ou ainda pelo uso de quelantes ou drogas;
- reposição do composto metabólico deficiente (Sedel et al., 2007).

1.2 Erros Inatos do Metabolismo dos Aminoácidos

As aminoacidopatias são distúrbios do metabolismo dos aminoácidos que repercutem na sua degradação, síntese ou transporte. Estes distúrbios são causados pelo funcionamento deficiente de uma enzima envolvida na conversão de um aminoácido em outro ou na via catabólica desse aminoácido. Como consequência, há aumento da concentração do precursor situado antes do bloqueio da via metabólica e diminuição da concentração do produto após o bloqueio. Os mecanismos de produção das doenças podem ser devido ao acúmulo de substrato ou à falta do produto. Essas doenças quando não diagnosticadas e tratadas precocemente causam seqüelas graves (Scriver et al., 2001).

Dentre as aminoacidopatias, encontram-se as desordens metabólicas dos aminoácidos contendo enxofre, que compreendem defeitos relacionados à rota de metabolização da metionina.

1.2.1 Metabolismo dos Aminoácidos Sulfurosos

Os aminoácidos contendo enxofre, metionina (Met) e cisteína (Cys), são normalmente consumidos como componentes da dieta protéica. Esses aminoácidos são utilizados para síntese de proteínas e glutathione (GSH) ou catabolizados a taurina e sulfato. A quantidade de aminoácidos sulfurosos catabolizados diariamente é essencialmente equivalente a ingesta diária (Stipanuk, 2004).

O metabolismo da Met envolve duas vias: remetilação e transsulfuração. A via da remetilação utiliza metilenotetrahidrofolato ou betaína como doadores de metila formando o ciclo da metionina que tem a função de manter os níveis de metionina. Entretanto, a seqüência de transsulfuração - cistationina sintase e cistationase - serve para catabolizar irreversivelmente a metionina sintetizando cisteína. Os mecanismos de regulação dessas vias dependem das propriedades cinéticas e do conteúdo tecidual enzimático, bem como da concentração dos substratos e de outros efetores metabólicos (Finkelstein, 2007).

Várias doenças metabólicas da via de transsulfuração são conhecidas, entre elas hipermetioninemia, homocistinúria, cistationinúria, beta-mercaptolactato cisteína dissulfideúria e deficiência de sulfito oxidase (Haraguchi, 1992).

Este trabalho enfoca um EIM de aminoácidos sulfurosos denominado **deficiência de sulfito oxidase**.

A sulfito oxidase (EC 1.8.2.1) (SOX) catalisa a reação de sulfito a sulfato, reação terminal na degradação oxidativa dos aminoácidos contendo enxofre. A sulfito oxidase é uma enzima intracelular localizada no espaço intermembrana da mitocôndria. O gene da sulfito oxidase está localizado no cromossomo 12 na região 12q13.2-12q13.3. Essa enzima, uma molibdohemoproteína de 466 aminoácidos, está envolvida na transferência de elétrons

do sulfito para a cadeia de transporte de elétrons via citocromo C (Johnson et al, 2002). Dezesesseis diferentes mutações patogênicas e 1 polimorfismo já foram identificados no gene da sulfito oxidase (Tan et al, 2005).

A enzima sulfito oxidase exibe uma larga distribuição em tecidos de mamíferos, e mostra diferenças significantes na atividade em uma mesma espécie. Tecidos como fígado, rim e coração possuem alta atividade da sulfito oxidase, enquanto que o cérebro e o baço apresentam atividade muito baixa dessa enzima. As células neuronais podem, portanto, ser consideradas especialmente vulneráveis ao sulfito devido à baixa atividade da sulfito oxidase (Woo et al., 2003).

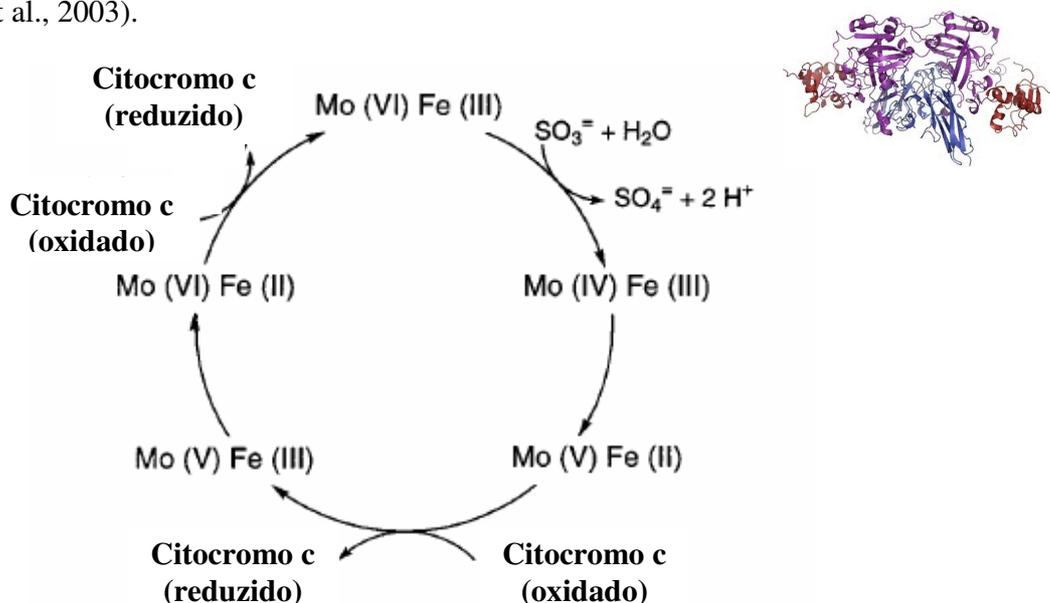


Figura 1. Representação esquemática da reação catalisada pela enzima sulfito oxidase. (Adaptado de Garret e colaboradores, 1998).

Existem diferenças significantes na atividade da sulfito oxidase entre as espécies. A atividade da sulfito oxidase em fígado de ratos é aproximadamente vinte vezes maior que a enzima hepática humana (Tejnorová, 1978).

1.3 Deficiência de Sulfito Oxidase

1.3.1 Conceitos

A deficiência de sulfito oxidase é uma doença autossômica recessiva rara que se manifesta por deterioração neurológica severa e morte na infância. O primeiro caso dessa doença foi descrito em 1967 (Mudd et al, 1967).

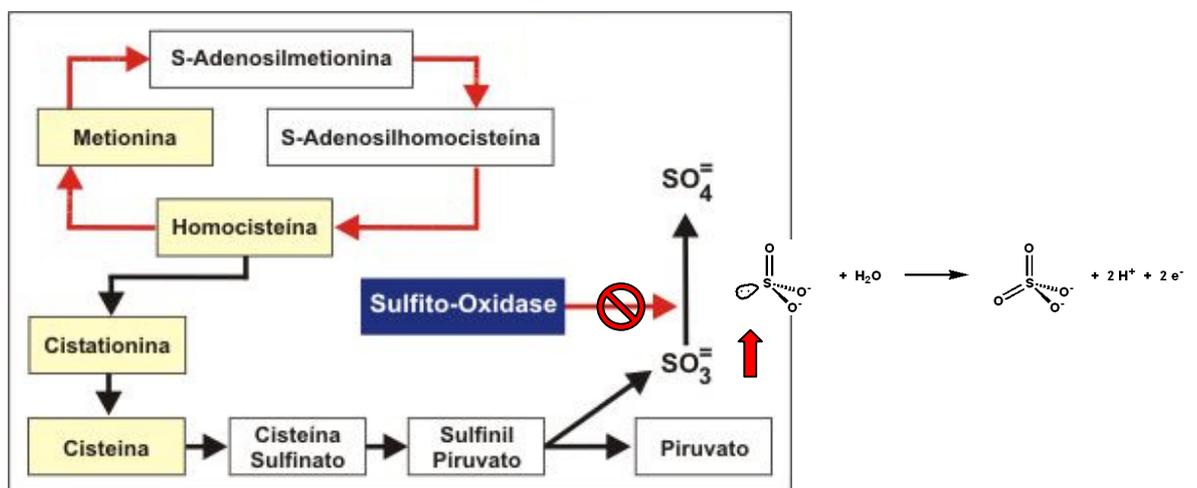


Figura 2. Deficiência de sulfito oxidase. (Adaptado de Telles Filho, 2004).

A deficiência de sulfito oxidase pode ocorrer por defeito específico da enzima ou pela ausência do cofator funcional, molibdênio. Foram descritos aproximadamente 50 casos de deficiência de sulfito oxidase em todo mundo, entretanto, é pequeno o número de pacientes vivos devido à natureza letal da doença (Hobson et al, 2005).

1.3.2 Sinais e Sintomas:

Os indivíduos afetados pela deficiência de sulfito oxidase apresentam, no período neonatal, convulsões refratárias, retardo mental e psicomotor, espasticidade, microcefalia e

deslocamento da lente ocular (Chan et al, 2002). Imagens de ressonância magnética em pacientes com essa doença revelam padrão similar à encefalopatia hipóxica-isquêmica, caracterizada por destruição progressiva do tecido cerebral. Sinais de anormalidades em gânglios da base, tálamo, corpo caloso e córtex cerebral, além de alterações multicísticas na substância branca, foram demonstradas nos casos reportados da doença (Dublin et al, 2002). Em exames neuropatológicos podem ser visualizados edema cerebral, perda neuronal e desmielinização acompanhados por gliose e espongiose difusa (Johnson & Duran, 2001).

1.3.3 Achados Laboratoriais

Na investigação dos marcadores bioquímicos em pacientes com deficiência de sulfito oxidase, observa-se o acúmulo tecidual de sulfito e redução da produção de sulfato. A presença de níveis elevados de sulfito ativa rotas metabólicas alternativas através da degradação da cisteína provocando elevações plasmáticas e urinárias de S-sulfocisteína, tiosulfato e taurina. A S-sulfocisteína é formada pela reação de oxidação direta do sulfito com cisteína, enquanto que o tiosulfato é produto das reações de transaminação e transsulfuração da cisteína (Johnson & Duran, 2001).

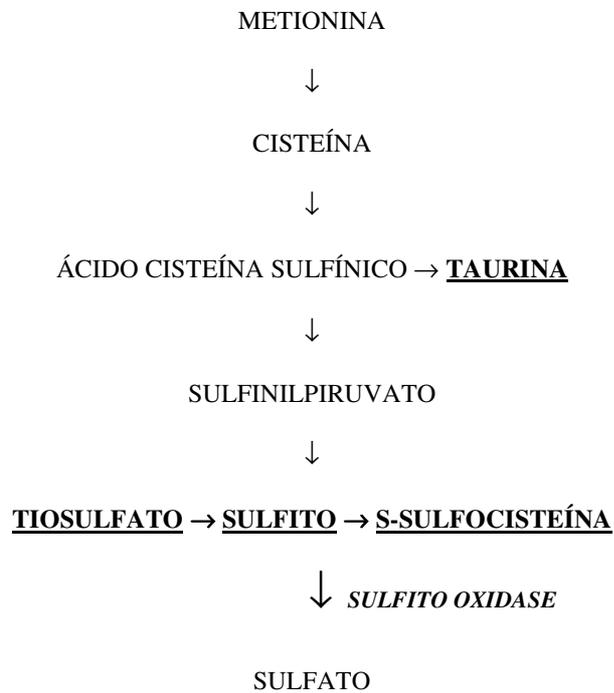


Figura 3. Vias metabólicas alternativas da cisteína. (Adaptado de Edwards e colaboradores, 1999).

O diagnóstico pré-natal pode ser realizado pelo teste da atividade da sulfito oxidase ou pela análise de mutações ao DNA em amostras de vilosidades coriônicas coletadas entre 11 -14 semanas de gestação (Hobson et al, 2005).

1.3.4 Patogênese

Não existem evidências bem documentadas as quais definam as bases bioquímicas associadas à patologia da deficiência de sulfito oxidase. Os danos neurológicos podem ser resultado do acúmulo de metabólitos tóxicos ou do déficit no produto da reação. Dessa forma, tem-se postulado que o sulfito possa ser responsável pelo dano cerebral encontrado nessa doença. A passagem do sulfito do plasma através da barreira hematoencefálica não é

conhecida, entretanto, sabe-se que a sulfito oxidase está presente no cérebro humano, sugerindo que a rota de metabolização dos aminoácidos de enxofre está operante e que há produção de sulfito cerebral (Johnson & Duran, 2001).

1.35 Tratamento

Terapias efetivas na deficiência de sulfito oxidase não estão disponíveis. A administração de dietas restritas em aminoácidos contendo enxofre e suplementação com sulfato ou molibdato tem produzido respostas bioquímicas positivas, mas sem melhora clínica (Johnson & Duran, 2001).

1.4 Sulfito

O corpo humano está exposto ao sulfito (SO_3^{2-}) endógeno e exógeno. Considerável quantidade de sulfito é gerada *in vivo* pelo catabolismo dos aminoácidos contendo enxofre, cisteína e metionina. Fontes exógenas de sulfito são encontradas em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos onde esse age como conservante, exercendo ação antioxidante e antimicrobiana. Cinco sais de sulfito são comumente utilizados como conservantes: metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), metabissulfito de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$), bissulfito de sódio (NaHSO_3), sulfito de potássio (K_2SO_3) e sulfito de sódio (NaS_2O_3) (Elmas et al., 2005). A toxicidade ao sulfito também pode resultar da exposição ao dióxido de enxofre, um poluente ambiental liberado na atmosfera a partir da combustão de combustíveis fósseis. O dióxido de enxofre é convertido a sulfito após contato com os fluidos das vias aéreas (Harvey & Nelsestuen, 1995). A exposição ao dióxido de enxofre tem sido associada a complicações respiratórias principalmente em pacientes asmáticos (Bascom et al., 1996).

Sob condições normais os organismos vivos possuem altos níveis de sulfito oxidase, porém, a concentração ou a atividade dessa enzima pode diminuir com a idade ou em certas doenças, como na Síndrome de Down (Constantin et al., 1996). Pacientes com insuficiência renal crônica (CRF) apresentam níveis elevados de sulfito sérico (pacientes normais = $1,55 \pm 0,54 \mu\text{M}$ e pacientes com CRF = $3,80 \pm 3,32 \mu\text{M}$). A elevação crônica dos níveis de sulfito pode contribuir para disfunção de órgãos e tecidos em pacientes com CRF (Kajiyama et al., 2000).

A ingesta diária de sulfito estabelecida pela Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives é de 0 - 0,7 mg/Kg de peso corporal (1974).

Se ingerido ou gerado endogenamente, o sulfito deve ser detoxificado devido às suas propriedades tóxicas.

1.5 Sulfito e danos cerebrais

Pesquisadores da Universidade Nacional de Singapura, analisando células renais de cães (Vincent et al., 2004) e cultura de células neuronais de ratos (Zhang et al., 2004) verificaram que concentrações micromolares de sulfito atuam negativamente sobre a biossíntese de ATP através da inibição da enzima glutamato desidrogenase, comprometendo, dessa forma, o complexo I da cadeia de transporte de elétrons. Esses trabalhos corroboram com a hipótese de que o alvo de ação do sulfito pode ser a mitocôndria.

Estudos desenvolvidos em institutos chineses de medicina ambiental e toxicologia, verificaram que o sulfito é capaz de modular canais de K^+ em neurônios da região CA1 do hipocampo. Esse composto aumentou o efluxo de potássio reduzindo a excitabilidade

neuronal e evidenciando injúria similar a hipóxia/isquemia em processo pró-apoptótico. Os mecanismos de ação do sulfito podem estar relacionados a um aumento do número de canais de K^+ ou a indução de mudanças no estado redox do canal (Du & Meng, 2004a e Meng & Nie, 2005). Este grupo de pesquisadores analisou também o efeito do sulfito sobre canais de Na^+ tetrodotoxina sensíveis e resistentes em culturas de neurônios de gânglios da raiz dorsal, observando aumento do influxo de Na^+ , aumento do estado despolarizado da célula e da excitabilidade e, conseqüentemente toxicidade neuronal (Du & Meng, 2004b). Trabalhos posteriores investigaram a ação do sulfito sobre canais de cálcio e sobre o trocador Na^+/Ca^{2+} em miócitos cardíacos de ratos. Os resultados mostraram que o sulfito é capaz de induzir uma sobrecarga de Ca^{2+} intracelular, aumentando a contratilidade cardíaca através do aumento da amplitude da corrente de Ca^{2+} e da inibição do movimento de Na^+ e Ca^{2+} via trocador (Nie & Meng, 2006; Nie & Meng, 2007).

Estudos realizados em linhagens de células neuronais, evidenciaram um efeito tóxico sinérgico do sulfito e peroxinitrito. O sulfito em concentrações de 10 – 50 μM foi capaz de potenciar a perda de viabilidade da célula neuronal induzida por peroxinitrito. A reação do sulfito e peroxinitrito pode resultar na produção de radicais livres de enxofre e oxigênio (Reist et al., 1998).

O sulfito (500 μM) adicionado às soluções de óxido nítrico (NO) e seus derivados é capaz de reagir com esses compostos afetando a habilidade do NO em exercer suas funções fisiológicas de segundo mensageiro, bem como sua capacidade de inibição da agregação plaquetária. A causa da toxicidade do sulfito também pode estar relacionada às alterações nos processos de sinalização celular via NO (Harvey & Nelsestuen, 1995).

Trabalhos realizados em cultura de células de mastócitos de ratos mostraram que o sulfito nas concentrações de 0,5 e 5,0 mM aumentou a formação de radicais livres. Esse

estudo aponta a NADPH oxidase como fator chave na resposta oxidativa ao sulfito (Christopher et al., 2006).

Evidências mostram que a ingestão subcrônica de sulfito (520 mg/Kg/dia) produz lipoperoxidação e alterações na atividade da enzima glutathione peroxidase em fígado, rim e cérebro de ratos. Esses resultados confirmam a atividade pró-oxidante do sulfito (Elmas et al., 2005; Derin et al., 2006). Mecanismos de lipoperoxidação induzidos por sulfito (SO_3^{2-}) foram investigados em emulsões de propofol. O SO_3^{2-} sofre oxidação a radical sulfito (SO_3^\bullet) e esse, pode reagir com oxigênio para formar espécies de sulfito oxidadas, tais como radical peroxil sulfito ($\text{SO}_3\text{OO}^\bullet$) e o radical ânion sulfato ($\text{SO}_4^{\bullet -}$) que por sua vez reagem com os lipídios. O radical sulfito também pode reagir diretamente com lipídios resultando na formação de radical alquil lipídico (L^\bullet), que na presença de oxigênio pode formar radicais peroxil lipídico (LOO^\bullet). O radical peroxil lipídico retira átomos de hidrogênio de ácidos graxos insaturados para formar hidroperóxido de lipídio (LOOH) e outro radical L^\bullet . A propagação da reação ocorre entre o sulfito e o radical alquil lipídico gerando mais radicais sulfito (Baker et al., 2002).

Trabalhos realizados em membranas lipossomais sugerem a ação do sulfito nos sítios de insaturação dos lipídios da membrana, comprometendo suas propriedades de absorção e solubilidade (Finch & Southerland, 1988).

Dados da literatura demonstram a ação tóxica do sulfito através do ataque às pontes dissulfeto e a reação com grupos SH livres (Johnson & Duran, 2001).

Alguns trabalhos foram desenvolvidos para avaliar o efeito do sulfito sobre a expressão de genes relacionados à apoptose. A análise de pulmões de ratos submetidos à inalação de dióxido de enxofre mostraram aumento dos níveis de promotores de apoptose e

redução dos níveis de repressores de apoptose, o aumento da atividade da caspase 3 foi também observado (Bai & Meng, 2005).

Estudos recentes confirmam a ação genotóxica do sulfito. A administração intraperitoneal (i.p.) de sulfito (125-500 mg/kg de peso corporal) induziu dano ao DNA em vários órgãos de camundongos, inclusive no cérebro. Sugere-se que os mecanismos envolvidos estejam relacionados à produção de radicais livres capazes de romper as fitas do DNA e/ou induzir mutações (Meng et al., 2004). Essas evidências corroboram com outras pesquisas mostrando que o sulfito aumenta a frequência de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e o aparecimento de micronúcleos, um indicador de perda da capacidade de reparo do DNA (Meng et al., 1990; Meng et al., 2002).

Alguns achados indicam que baixas concentrações de sulfito estimulam neutrófilos a produzir ânions superóxido pela ativação da NADPH oxidase através da via de transdução de sinal envolvendo proteína cinase C e Ca^{2+} /calmodulina (Beck-Speier et al., 1993).

A administração i.p. de sulfito induziu morte neuronal e exacerbação da neurotoxicidade por agentes excitotóxicos em cérebro de ratos (Baud et al., 2001). Altas taxas de mortalidade foram observadas após administração i.p. de sulfito. Em todos os casos a morte foi precedida de prostração e convulsões, indicando que o efeito imediato do sulfito pode ser diretamente no SNC (Cohen et al., 1973).

Ozturk e colaboradores (2006) demonstraram que o sulfito pode interferir na regulação de receptores NMDA. Além disso, alguns trabalhos mostraram que a inalação de

dióxido de enxofre pode prejudicar a função cognitiva em ratos jovens e sugerem como possível mecanismo, as alterações em canais iônicos (Yargicoglu et al., 2006).

1.6 Proteína Na⁺,K⁺-ATPase

A Na⁺,K⁺-ATPase é uma proteína integral de membrana, essencial para o funcionamento normal das células dos mamíferos. Essa enzima utiliza a energia da hidrólise do ATP para translocar íons Na⁺ e K⁺ através da membrana plasmática contra o seu gradiente eletroquímico (Kaplan, 2002). A bomba Na⁺ e K⁺ está presente em altas concentrações no neurônio, onde mantém o gradiente iônico necessário para a condução do impulso nervoso (McGrail et al., 1991). Este transporte ativo de sódio e potássio é responsável pela diferenciação e sobrevivência celular (Yu, 2003). A Na⁺,K⁺-ATPase consome 40 – 60 % do ATP formado no cérebro e sua atividade está relacionada à alterações na fluidez da membrana (Ericinska & Silver, 1994).

A inibição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase está relacionada a diversas patologias do sistema nervoso central, tais como isquemia (Wyse et al., 2000) epilepsia (Grisar, 1984), Parkinson e outras doenças neurodegenerativas (Kumar & Kurup, 2002; Lee, 1993).

Pelo menos dois mecanismos podem estar envolvidos na inibição da Na⁺,K⁺-ATPase. A enzima pode ser inativada indiretamente por alterações na microestrutura da membrana (Jamme et al, 1995) ou diretamente por modificações da molécula polipeptídica da proteína (Boldyrev & Bulygina, 1997).

A Na⁺,K⁺-ATPase representa um alvo importante de radicais livres. O efeito inibitório dos radicais livres sobre a atividade dessa enzima tem sido associado ao dano neuronal (Dobrota et al, 1999).

Estudos realizados em nosso laboratório têm demonstrado o efeito inibitório de alguns aminoácidos na atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana sináptica cerebral (Pontes et al., 1999; Streck et al., 2002; Franzon et al., 2003; Wyse et al., 1995). Neste contexto, alguns autores têm demonstrado o efeito de aminoácidos contendo enxofre; tais como: metionina (Stefanello et al, 2005) e homocisteína (Wyse et al, 2002), sobre a redução da atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Além disso, se tem verificado a correlação desse efeito inibitório ao aumento do estresse oxidativo.

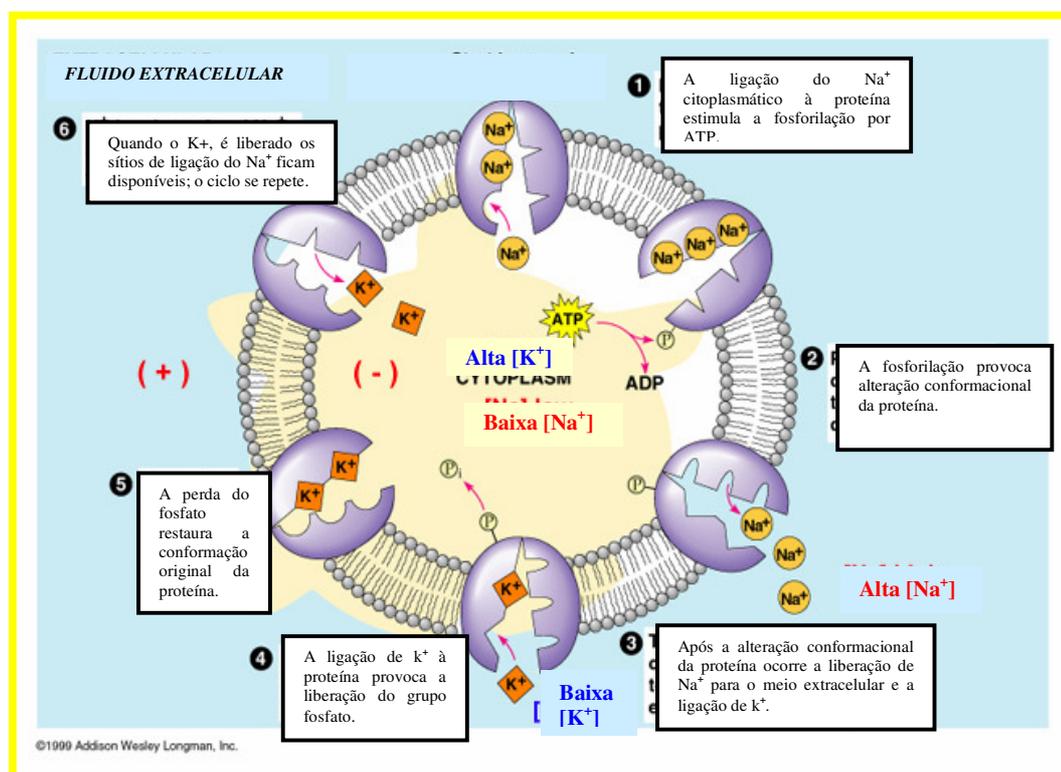


Figura 4. Ciclo catalítico da enzima Na^+, K^+ -ATPase. (Adaptado de Lehninger e colaboradores, 1999).

1.7 Estresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ser geradas de forma endógena durante o metabolismo celular, ou de forma exógena, como por exposição a drogas (Beckman & Ames, 1998). As ERO podem interagir diretamente com a maquinaria molecular com subseqüentes modificações químicas e funcionais destas moléculas ou podem interagir indiretamente através de modificação oxidativa do ambiente da macromolécula (Stark, 2005). As ERO têm sido associadas aos danos à estrutura das biomoléculas DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares.

O estresse oxidativo, o qual é decorrente de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e os radicais livres, pode estar relacionado a inúmeras doenças; tais como: aterosclerose, câncer, doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas crônicas.

Um número crescente de situações patológicas envolvendo o SNC, incluindo doenças neurodegenerativas, convulsões, isquemia/reperfusão e demência, têm sido associadas ao estresse oxidativo (Halliwell, 2006a).

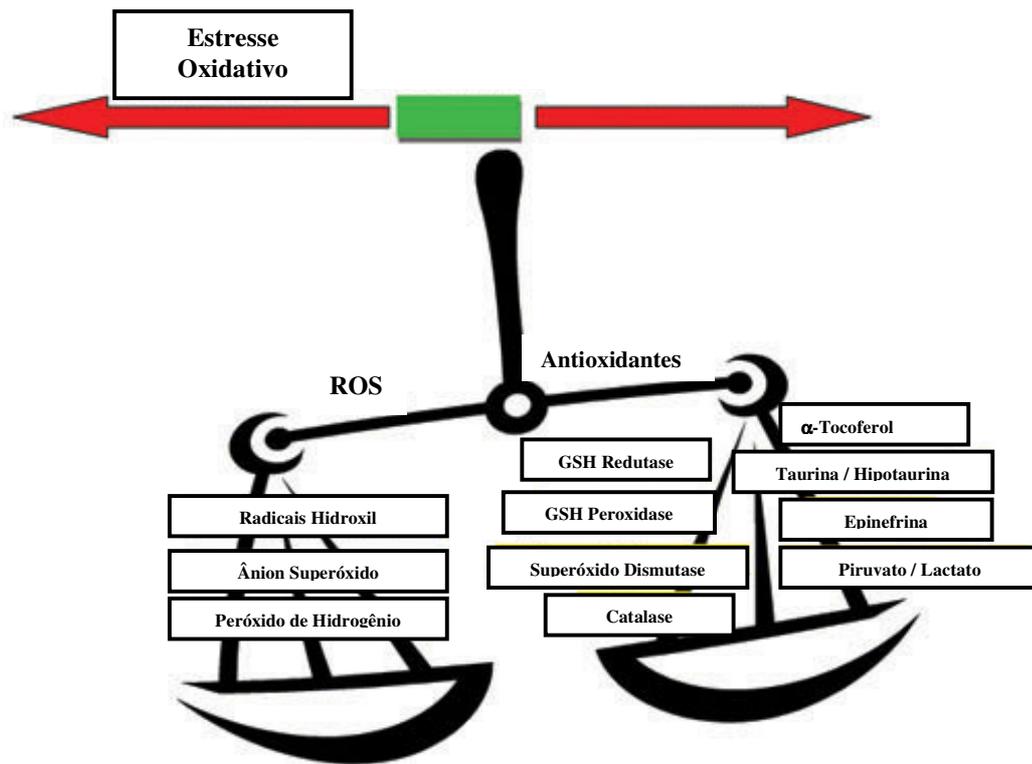


Figura 5. Estresse oxidativo - desequilíbrio pró-oxidante-antioxidante. (Adaptado de Garrido e colaboradores, 2004).

2. OBJETIVOS GERAIS

Partindo da observação de que os pacientes com deficiência de sulfito oxidase apresentam sintomatologia neurológica severa e considerando as evidências da literatura apontando o sulfito como principal candidato ao dano neural, decidimos avaliar o envolvimento do sulfito sobre alguns parâmetros bioquímicos em cérebro de ratos.

Esse trabalho teve como objetivos:

- 1 - Verificar o efeito *in vitro* do sulfito sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos jovens e adultos.
- 2 - Verificar o efeito da administração intracerebroventricular de sulfito em cérebro de ratos adultos.

Este trabalho está dividido em dois capítulos:

Cápítulo I – Resultados apresentados como artigo científico

Cápítulo II – Resultados não submetidos a publicação

3. CAPÍTULO I – ARTIGO

Sulfite increases lipoperoxidation and decreases the activity of catalase in the brain of rats

Fábria Chiarani, Caren S. Bavaresco, Carlos S. Dutra-Filho, Carlos Alexandre Netto and
Angela T.S. Wyse

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Status: aceito

Periódico: Metabolic Brain Disease

Sulfite increases lipoperoxidation and decreases the activity of catalase in brain of rats

Fábria Chiarani · Caren S. Bavaresco ·
Carlos S. Dutra-Filho · Carlos Alexandre Netto ·
Angela T. S. Wyse

Received: 24 July 2007 / Accepted: 1 October 2007
© Springer Science + Business Media, LLC 2007

Abstract The main objective of this study was to investigate the in vitro effects of sulfite, a metabolite accumulated in isolated sulfite oxidase deficiency, on Na^+ , K^+ -ATPase activity and on some parameters of oxidative stress, namely thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and catalase activity (antioxidant enzyme) in cerebral cortex, striatum and hippocampus from 10- and 60-day-old rats. Results showed that 500 μM sulfite significantly increased TBARS and reduced catalase activity in the cerebral structures studied from neonates and adults rats; in contrast, sulfite did not alter Na^+ , K^+ -ATPase activity. Our present findings show that sulfite increases lipid peroxidation and decreases antioxidant enzyme defenses in rat brain, suggesting an induction of oxidative stress. We presumed that oxidative stress might be, at least in part, associated with the neuronal dysfunction of patients affected by isolated sulfite oxidase deficiency.

Keywords Sulfite oxidase deficiency · Metabolic disease · Sulfite · Oxidative stress

Introduction

Sulfite (SO_3^{2-}) is used as an anti-microbial and anti-oxidant agent in a variety of drugs, and functions as a preservative in many food preparations (Derin *et al.* 2006). On the other hand, if sulfite is ingested or produced in high concentration through the metabolism of sulfur-containing amino acids of the animal it can cause cellular toxicity (Ozturk *et al.* 2006). In this context a rare autosomal recessive disorder, the isolated sulfite oxidase deficiency (ISOD), is caused by deficiency of sulfite oxidase

F. Chiarani · C. S. Bavaresco · C. S. Dutra-Filho · C. A. Netto · A. T. S. Wyse (✉)
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo,
CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: wyse@ufrgs.br

(EC 1.8.3.1), a soluble mitochondrial enzyme located in the intermembrane space which metabolizes sulfite to sulfate (Johnson and Duran 2001). This disorder is clinically characterized by severe neurological symptoms, including mental retardation, intractable seizures, movement disorder with marked neuronal loss and demyelination of white matter (Eyaid *et al.* 2005). Biochemically affected patients present tissue accumulation of sulfite (Tan *et al.* 2005; Johnson and Duran 2001).

The exact mechanisms underlying the brain dysfunction, particularly epilepsy and mental retardation, are poorly understood in this disease. However, the neurological dysfunction, commonly found in human ISOD, has been mainly attributed to an increase of sulfite levels (Johnson and Duran 2001). Besides, it has been shown that brain damage may be due to the accumulation of a toxic metabolite, possibly sulfite, which is a strong nucleophile that can react with a wide variety of cell components (Feng *et al.* 2007). In addition to its antioxidant properties, sulfite has been shown to exhibit pro-oxidant effects in different conditions (Kaplan *et al.* 1975; Baker *et al.* 2002). For instance, Southerland *et al.* (1982) demonstrated that sulfite added to emulsions of unsaturated fatty acids caused lipid peroxidation and formation of lipid adducts.

The pro-oxidant activity of sulfite also has been shown in renal and hepatic cells (Vincent *et al.* 2004; Elmas *et al.* 2005). It has also been proposed that sulfite radicals can act as a neurotoxic agent, especially in combination with peroxynitrite in a rat mesencephalic cell line (Reist *et al.* 1998). To our knowledge, there is no published data showing the effect of sulfite on oxidative stress in brain.

Na^+ , K^+ -ATPase (EC 3.6.1.37) is a membrane enzyme responsible for the generation of the membrane potential in the central nervous system (CNS) necessary to maintain neuronal excitability (Erecinska and Silver 1994). The Na^+ , K^+ -ATPase is inhibited by mercury sulfite (Chuu *et al.* 2001) and by free radicals (Jamme *et al.* 1995; Lees 1993).

Considering that the mechanisms involved in the brain damage of ISOD are poorly known, in the present study we investigated the *in vitro* effects of different concentrations of sulfite on some parameters of oxidative stress, namely thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS, an index of lipid peroxidation) and catalase activity (an antioxidant enzyme), as well as on Na^+ , K^+ -ATPase activity, in cerebral cortex, striatum and hippocampus of 10- and 60-day-old rats. These cerebral structures were used because they are important to memory modulation and patients affected by this disease present cognitive dysfunction (Chan *et al.* 2002; Edwards *et al.* 1999).

Material and methods

Animals and reagents

Ten-day-old and 60-day-old rats were obtained from the central Animal House Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Animals were maintained on 12/12 h light/dark cycle (lights on from 7 A.M. to 7 P.M.) in air-conditioned constant temperature (22°C) colony room, and had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. Animal care followed the official governmental guideline in compliance with the Federation of Brazilian Society

for Experimental Biology and was approved by Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. All chemicals were purchased from Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA.

Tissue and homogenate preparation

Animals were killed by decapitation without anesthesia, the brain was removed and the cortex, hippocampus and striatum were dissected. For TBARS and CAT assay, the structures were homogenized in ten volumes (1:10, w/v) of 1.15% KCl or in 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, containing 140 mM KCl, respectively. The homogenates were incubated at 37°C for 1 h without and with 1–500 μ M sodium sulfite. For Na⁺,K⁺-ATPase assay, cerebral structures were homogenized in ten volumes (1:10 w/v) of 0.32 M sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 0.1 mM EDTA, pH 7.4. After homogenization, synaptic plasma membranes were prepared as described below. The isolated plasma membrane was incubated at 37°C for 1 h without and with 1–500 μ M of sodium sulfite and the activity of Na⁺,K⁺-ATPase was determined. The concentrations of sodium sulfite were chosen according to Zhang and colleagues (2004).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS, a measure of lipid peroxidation, was determined according to Esterbauer and Cheeseman (1990). Briefly, homogenates were mixed with trichloroacetic acid 10% and thiobarbituric acid 0.67% and heated in a boiling water bath for 25 min. TBARS was determined by the absorbance at 535 nm. Results were reported as nmol of malonaldehyde per mg protein.

Catalase assay (CAT)

CAT activity was assayed by the method Aebi (1984). H₂O₂ disappearance was continuously monitored with a spectrophotometer at 240 nm for 90 s. One unit of the enzyme is defined as 1 μ mol of hydrogen peroxide consumed per minute and specific activity was reported as units per mg protein.

Preparation of synaptic plasma membrane

Synaptic plasma membrane from cerebral cortex, striatum and hippocampus were prepared according to the method of Jones and Matus (1974) with some modifications (Wyse *et al.* 1995). The membranes were isolated using a discontinuous sucrose density gradient consisting of successive layers of 0.3, 0.8 and 1.0 M. After centrifugation at 69,000 \times *g* for 2 h, the fraction at the 0.8–1.0 M sucrose interface was taken as the membrane enzyme preparation.

Determination of Na⁺,K⁺-ATPase activity

The reaction mixture for the Na⁺,K⁺-ATPase assay contained 5.0 mM MgCl₂, 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl and 40.0 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, in a final volume of 200 μ L. The reaction was started by the addition of ATP to a final

concentration of 3.0 mM. Controls were carried out under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. Na^+, K^+ -ATPase activity was calculated by the difference between the two assays, as described by Wyse *et al.* (2000). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan *et al.* (1986). Specific enzyme activity was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein.

Protein determination

Protein was measured by the method of Bradford (1976) and colleagues, using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test when *F* test was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Firstly we investigated the *in vitro* effect of sulfite on some oxidative stress parameters in 10 and 60 day rats. Figure 1 shows that 500 μM sulfite significantly increased TBARS, an index of lipoperoxidation, in cerebral cortex (100%) [$F(5, 32) = 13.972$; $p < 0.01$] (A), striatum (100%) [$F(5, 29) = 31.101$; $p < 0.01$] (B) and hippocampus (32%) [$F(5, 31) = 3.239$; $p < 0.05$] (C). Figure 2 shows that 500 μM sulfite significantly reduced catalase activity, an antioxidant enzyme, in cerebral cortex (40%) [$F(5, 31) = 12.566$; $p < 0.01$] (A), striatum (46%) [$F(5, 28) = 10.958$; $p < 0.01$] (B) and hippocampus (34%) [$F(5, 19) = 3.167$; $p < 0.05$] (C) of 10 days old rats.

As can be observed in Figs. 3 and 4, sulfite at 500 μM also increased TBARS in cerebral cortex (58%) [$F(3, 13) = 36.333$; $p < 0.01$] (3A), striatum (34%) [$F(3, 13) = 4.166$; $p < 0.05$] (3B) and hippocampus (28%) [$F(3, 16) = 4.717$; $p < 0.05$] (3C) and reduced the catalase activity in cerebral cortex (57%) [$F(3, 15) = 3.397$; $p < 0.05$] (4A), striatum (54%) [$F(3, 15) = 27.382$; $p < 0.01$] (4B) and hippocampus (53%) [$F(3, 16) = 8.334$; $p < 0.01$] (Fig. 4C) of adults rats.

We also verified the effect of sulphite on Na^+, K^+ -ATPase activity in cerebral cortex, striatum and hippocampus of neonate and adult rats. Conversely, Figs. 5 and 6 show that Na^+, K^+ -ATPase activity was not altered by sulfite in the cerebral structures studied in either developmental period ($p > 0.05$).

Discussion

Neurologic disability, developmental delay and seizures are observed in most patients with ISOD. Neuronal migration abnormalities noted on postnatal neuro-imaging suggest that the severe mental retardation associated with this disease is initiated prenatally (Tan *et al.* 2005). The neuropathogenesis of ISOD is unclear;

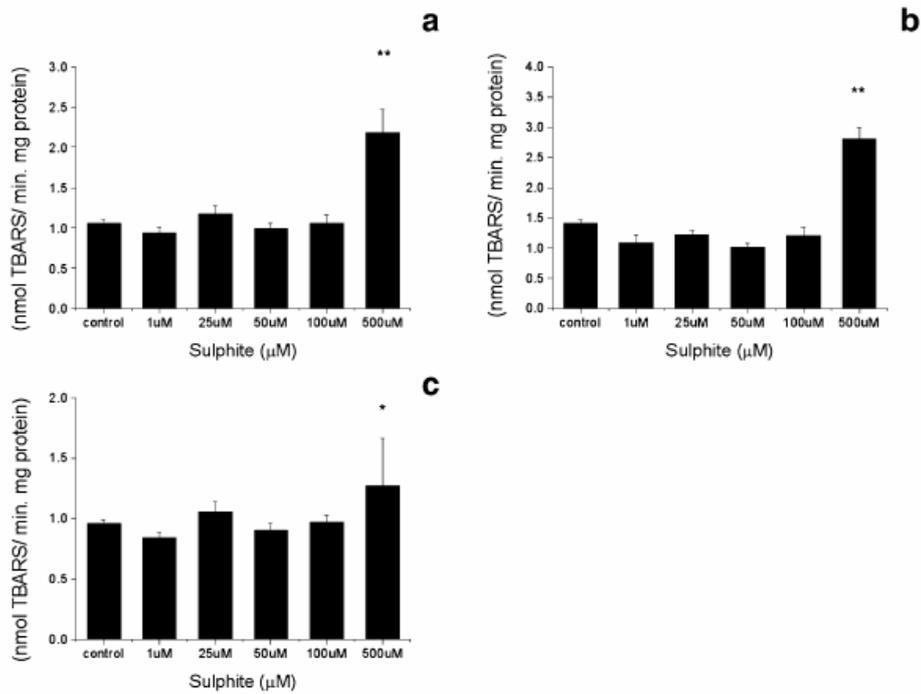


Fig. 1 In vitro effect of sulfite on TBARS in cerebral cortex (a), hippocampus (b) and striatum (c) of 10 day old rats. Results are expressed as mean±S.D. for five independent experiments performed in duplicate; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control (Duncan's multiple test)

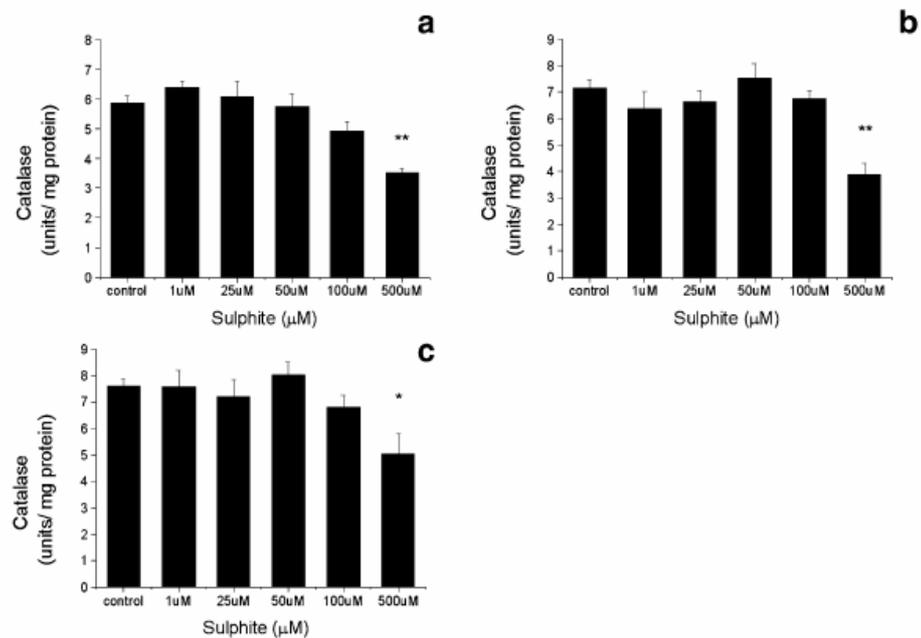


Fig. 2 In vitro effect of sulfite on catalase activity in cerebral cortex (a), hippocampus (b) and striatum (c) on 10 days old rats. Results are expressed as mean±S.D. for five independent experiments performed in duplicate; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control (Duncan's multiple test)

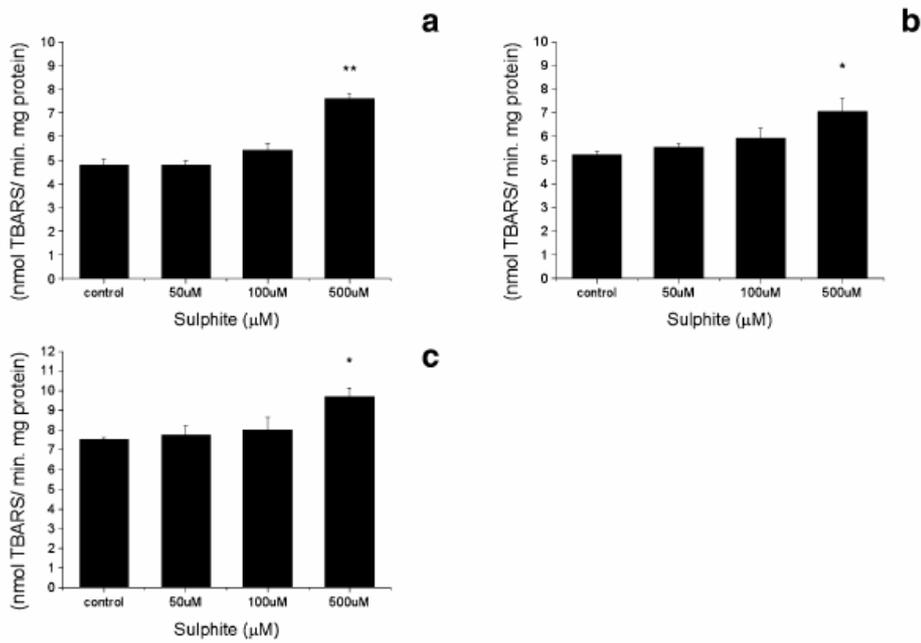


Fig. 3 In vitro effect of sulfite on TBARS in cerebral cortex (a), hippocampus (b) and striatum (c) on 60 days old rats. Results are expressed as mean±S.D. for five independent experiments performed in duplicate; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control (Duncan's multiple test)

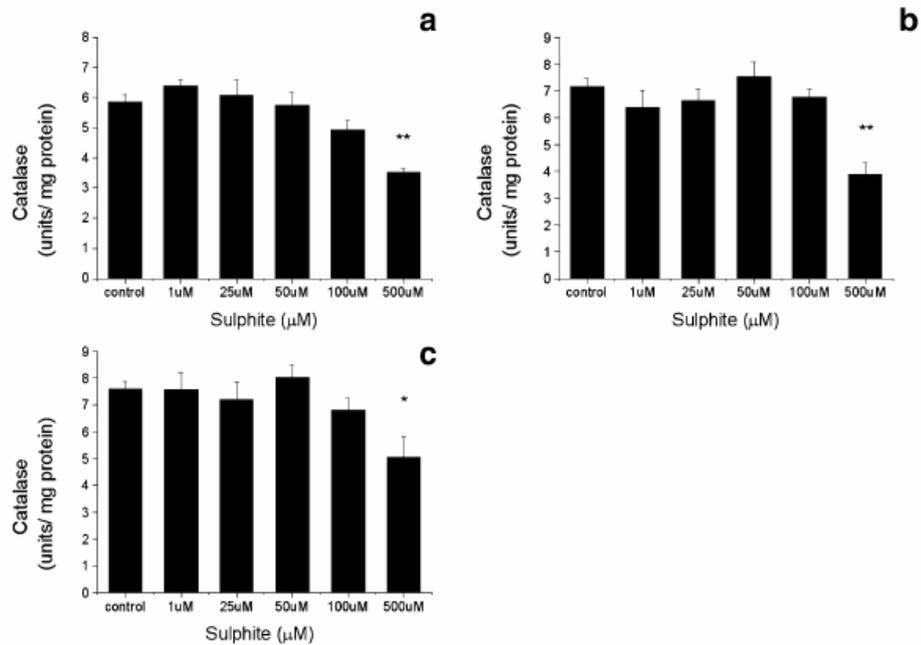


Fig. 4 In vitro effect of sulfite on catalase activity in cerebral cortex (a), hippocampus (b) and striatum (c) on 60 days old rats. Results are expressed as mean±S.D. for five independent experiments performed in duplicate; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control (Duncan's multiple test)

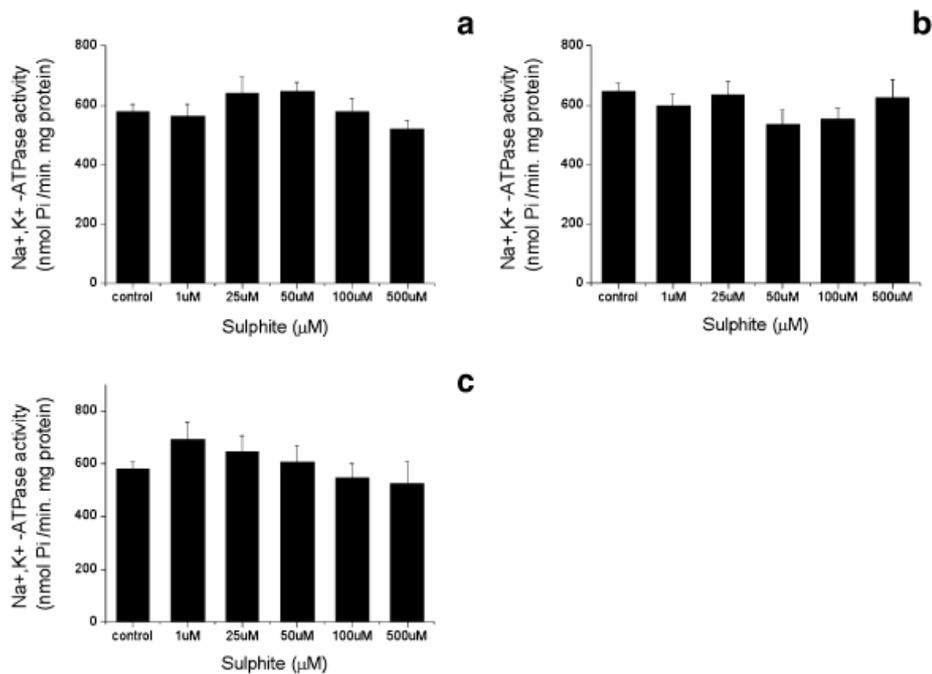


Fig. 5 In vitro effect of sulfite on Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex (a), hippocampus (b) and striatum (c) on 10 days old rats. Results are expressed as mean±S.D. for five independent experiments performed in duplicate; * p <0.05, ** p <0.01 compared to control (Duncan's multiple test)

however, rodent neuronal cell culture experiments suggest that high levels of sulfite are neurotoxic (Reist *et al.* 1998). In this context, Wilkins *et al.* (1968) showed that prostration and seizures preceded rats death following median lethal doses of intraperitoneal bisulfite, what suggests a direct effect of this compound on the CNS.

In the present study we investigated the in vitro effects of different concentrations of sulfite on some parameters of oxidative stress: namely, lipid peroxidation (TBARS) and catalase activity (antioxidant enzyme) in cerebral cortex, striatum and hippocampus of rats. Our results show that 500 μM sulfite increased TBARS and reduced catalase activity in all cerebral structure from neonate and adult rats. Since oxidative stress is defined as the imbalance between free radical production and antioxidant defenses, our results suggest that sulfite induces oxidative stress in different cerebral structures. These results are in agreement with those of other investigators who showed that subchronic ingestion of sulfite could cause oxidation forming sulfite radicals leading to lipid peroxidation in rat liver and kidney (Elmas *et al.* 2005). Sulfite radicals can also directly react with lipids, resulting in the formation of lipid alkyl radical (L•) in soybean oil emulsions (Baker *et al.* 2002). It has also been shown that low concentrations of sulfite in vitro provoked an increase in reactive oxygen species formation and a decrease in ATP levels in rat brain mitochondria and cell culture (Zhang *et al.* 2004). When we compared the increase of TBARS in rats of different ages we observed that brain from neonatal rats appears more susceptible to the sulfite effects and may explain, at least in part, the devastating neurologic disease that usually presents in early infancy.

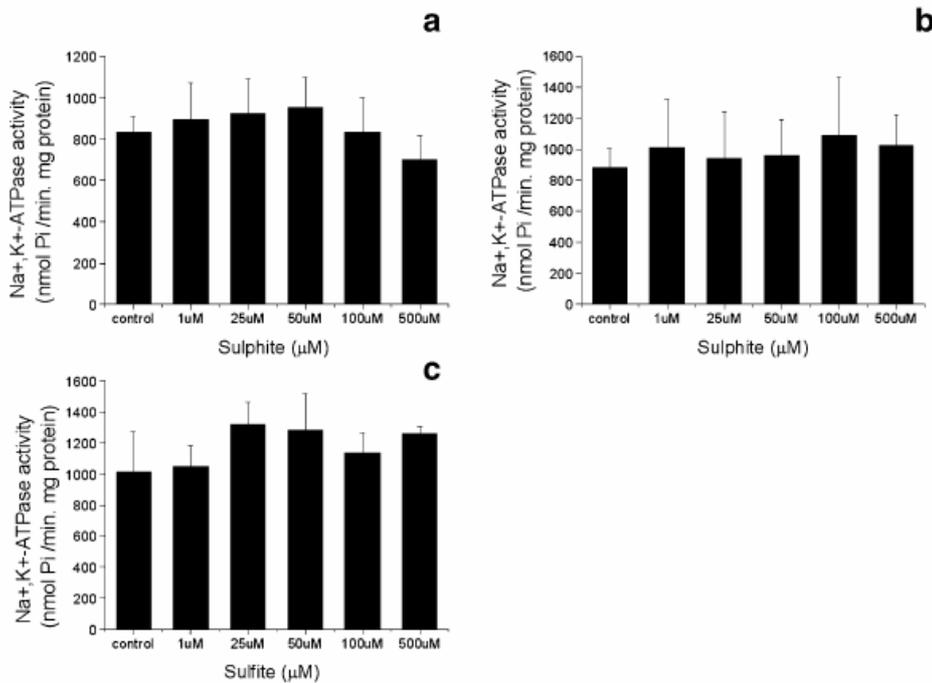


Fig. 6 In vitro effect of sulfite on Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex (a), hippocampus (b) and striatum (c) on 60 days old rats. Results are expressed as mean±S.D. for five independent experiments performed in duplicate; **p*<0.05, ***p*<0.01 compared to control (Duncan's multiple test)

Since unsaturated fatty acids are susceptible to attack by sulfite, what probably compromises membrane integrity (Southerland *et al.* 1982) and Na⁺,K⁺-ATPase activity is inhibited by free radicals (Jamme *et al.* 1995; Lees 1993). In the present study we also investigated the effect of sulfite on this enzyme activity in brain of rats. Sulfite did not alter this enzyme in synaptic plasma membranes or cerebral cortex, striatum or hippocampus of neonates and adult rats. We can't exclude an indirect effect of sulfite on Na⁺,K⁺-ATPase in intact cells. In our study, sulfite was added to enzyme assays; in this case, probably free radical formation, was not sufficient to inhibit this enzyme, which is essential to normal brain function.

Considering that oxidative stress can be elicited by an imbalance between free radical production and antioxidant defenses (Schulz *et al.* 2000), that previous evidence shows that sulfite can increase free radical formation in kidney cells and in other systems (Vincent *et al.* 2004; Izgut-Uysal *et al.* 2005; Geng and Meng 2006; Christopher *et al.* 2006) and that our present results show that sulfite decreases the brain antioxidant defense (catalase activity) and increases lipid peroxidation, we suggest that sulfite, the metabolite accumulated in ISOD, induces oxidative stress in brain. Taken together, it is tempting to speculate that oxidative stress may contribute, at least in part, to the neurological dysfunction found in this metabolic disease.

Acknowledgements Supported by CNPq-Brazil and in part by FINEP research grant "Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) "#01.06.0842-00.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
- Baker MT, Dehring DJ, Gregerson MS (2002) Sulfite supported lipid peroxidation in Propofol emulsions. *Anesthesiology* 97:1162–1167
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380
- Chan K, Li C, Lai C, Ng S, Chan A (2002) Infantile isolated sulphite oxidase deficiency in a Chinese family: a rare neurodegenerative disorder. *Hong Kong Med J* 8(4):279–282
- Christopher R, Collaco MD, Hochman DJ, Goldblum RM, Brooks EG (2006) Effect of sodium sulfite on mast cell degranulation and oxidant stress. *Ann Allergy Asthma & Immunol* 96:550–556
- Chuu JJ, Liu SH, Lin-Shiau SY (2001) Effects of methyl mercury, mercuric sulfide and cinnabar on active avoidance responses, Na⁺/K⁺-ATPase activities and tissue mercury contents in rats. *Proc Natl Sci Counc Repub China Part B* 25(2):128–136
- Derin N, Yargıçoğlu P, Aslan M, Elmas O, Agar A, Alicigüzel Y (2006) The effect of sulfite and chronic restraint stress on brain lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities. *Toxicol Ind Health* 22:233–240
- Edwards MC, Johnson JL, Marriage B, Graf TN, Coyne KE, Rajagopalan KV, MacDonald IM (1999) Isolated sulfite oxidase deficiency: Review of two cases in one family. *Ophthalmology* 106(10):1957–1961
- Elmas O, Aslan M, Çağlar S, Derin N, Agar A, Alicigüzel Y, Yargıçoğlu P (2005) The prooxidant effect of sodium metabisulfite in rat liver and kidney. *Regul Toxicol Pharmacol* 42:77–82
- Erecinska M, Silver IA (1994) Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 7:21–29
- Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407–421
- Eyaid WM, Al-Nouri DM, Rashed MS, Al-Rifai MT, Al-Wakeel AS (2005) An inborn error of metabolism presenting as hypoxic–ischemic insult. *Pediatr Neurol* 32(2):134–136
- Feng C, Tollin G, Enemark JH (2007) Sulfite oxidizing enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1774:527–539
- Geng H, Meng Z (2006) Inhibition of superoxide dismutase, vitamin C and glutathione on chemiluminescence produced by luminol and the mixture of sulfite and bisulfite. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 64(1):87–92
- Izğut-Uysal VN, Kuçukatay V, Bulbul M, Tan R, Yargıçoğlu P, Agar A (2005) Effect of sulfite on macrophage functions of normal and sulfite oxidase-deficient rats. *Food Chem Toxicol* 43:599–605
- Jamme I, Petit E, Divoux D, Gerbi A, Maixent JM, Nouvelot A (1995) Modulation of mouse cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 7:333–337
- Johnson JL, Duran M (2001) Molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency (chapter 128). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 3163–3177
- Jones DH, Matus AI (1974) Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation–sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta* 356:276–287
- Kaplan D, McJilton C, Luchtel D (1975) Bisulfite induces lipid oxidation. *Arch Environ Health* 30:507–509
- Lees GJ (1993) Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 54:287–322
- Ozürk OH, Kuçukatay V, Yonden Z, Agar A, Bağcı H, Delibas N (2006) Expressions of N-methyl-D-aspartate receptors NR2A and NR2B subunit proteins in normal and sulfite-oxidase deficient rat's hippocampus: effect of exogenous sulfite ingestion. *Arch Toxicol* 80:671–679
- Reist M, Marshall K-A, Jenner P, Halliwell B (1998) Toxic effects of sulphite in combination with peroxynitrite on neuronal cells. *J Neurochem* 71(6):2431–2438
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267:4904–4911
- Southerland WM, Akogyeram CO, Toghrol F, Sloan L, Scherrer R (1982) Interaction of bisulfite with unsaturated fatty acids. *J Toxicol Environ Health* 10:479–491
- Tan W-H, Eichler FS, Hoda S, Lee MS, Baris H, Hanley CA, Grant E, Krishnamoorthy KS, Shih VE (2005) Isolated sulfite oxidase deficiency: a case report with a novel mutation and review of the literature. *Pediatrics* 116(3):757–766

4. CAPÍTULO II- RESULTADOS NÃO SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO

4.1 Objetivos

Considerando nossos resultados da avaliação dos efeitos *in vitro* do sulfito sobre a Na⁺,K⁺-ATPase e a indução de estresse oxidativo (redução da capacidade antioxidante enzimática e aumento da peroxidação lipídica) em diferentes tecidos cerebrais de ratos, resolvemos ampliar nossa investigação para a análise dos mesmos parâmetros dos estudos *in vitro* após a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de sulfito.

4.2 Material e Métodos

Ratos Wistar de 60 dias foram anestesiados com ketamina e xilazina (75 e 10 mg/kg i.p.). Estes animais foram submetidos à cirurgia em aparelho estereotáxico, onde foi inserida e fixada uma cânula no ventrículo lateral direito de acordo com as coordenadas de bregma (AP 0,9 mm, ML 1,5 mm e V 2,6 mm) (Paxinos, 1986).

Dois dias após a cirurgia, uma agulha de 30G foi inserida para administração de sulfito (500 µM) ou veículo no ventrículo lateral direito durante o intervalo de 1 minuto.

Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle – animais não submetidos à cirurgia, grupo sham – animais que receberam salina i.c.v. e grupo sulfito – animais que receberam sulfito 500 µM i.c.v. O volume administrado (salina ou sulfito) foi 5 µL. Os ratos foram sacrificados 30 min ou 7 dias após a injeção de sulfito ou salina.

4.2.1 Preparação tecidual

Os animais foram mortos por decapitação sem anestesia, o cérebro foi removido e o córtex cerebral, estriado e hipocampo foram dissecados.

4.2.2 Preparação da membrana plasmática sináptica

Para a preparação da membrana plasmática sináptica e determinação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, as estruturas cerebrais foram homogeneizadas na proporção de 1:10 (massa/volume) em tampão pH 7,4 contendo sacarose 0,32 mM, HEPES 5,0 mM e EDTA 1,0 mM. As membranas plasmáticas sinápticas foram preparadas de acordo com Jones e Matus (1974) com algumas modificações (Wyse et al., 1995). Os homogeneizados foram centrifugados a 1.000 g por 10 min, o sobrenadante foi removido e centrifugado a 12.000 g por 20 min. O sedimento foi suspenso em tampão hipotônico (tampão Tris-HCl 5 mM, pH 8,1) a 0°C por 30 min, e aplicado num gradiente descontínuo de sacarose nas densidades 0,3; 0,8 e 1,0 M. Após a centrifugação de 69.000 g por 120 min, a fração entre as camadas mais densas de sacarose (0,8 e 1,0 M) foi coletada e utilizada para dosagem da atividade da Na^+, K^+ -ATPase.

4.2.3 Dosagem da atividade da Na^+, K^+ -ATPase

A mistura reacional para dosagem da atividade da Na^+, K^+ -ATPase continha MgCl_2 5,0 mM, NaCl 80,0 mM, KCl 20,0 mM e Tris-HCl 40,0 mM, pH 7,4, num volume final de 200 μL . A reação foi iniciada pela adição de ATP para uma reação final de 3,0 mM. Os controles foram incubados nas mesmas condições, diferenciando-se pela adição de ouabaína 1,0 mM, um inibidor específico da Na^+, K^+ -ATPase. A atividade enzimática foi calculada pela diferença entre os ensaios com e sem adição de ouabaína, como descrito por

Wyse e colaboradores (1995). O fosfato inorgânico (Pi) liberado foi medido pelo método de Chan e colaboradores (1986). A atividade específica da Na⁺,K⁺-ATPase foi expressa como nmol Pi liberado por min por mg de proteína.

4.2.4 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico - (TBARS)

Para o ensaio do TBARS, as estruturas cerebrais foram homogeneizadas na proporção 1:10 (massa/volume) de tampão fosfato de sódio 20 mM contendo KCl 140 mM, pH 7,4.

O TBARS, uma medida de lipoperoxidação, foi determinada de acordo com Esterbauer and Cheeseman (1990). Ao homogeneizado foram adicionados ácido tricloroacético 10% e ácido tiobarbitúrico 0,8%. Os tubos foram aquecidos em banho fervente por 60 min. TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados são expressos como nmol de malondialdeído por mg de proteína.

4.2.5 Capacidade antioxidante total não-enzimática - (TRAP)

Para determinação do TRAP, as estruturas cerebrais foram homogeneizadas na proporção 1:10 (massa/volume) em tampão glicina pH 8,6.

O TRAP mede a capacidade antioxidante não enzimática do tecido e foi determinada pela medida da intensidade de luminescência do luminol induzida por 2,2'-azo-bis (2-aminopropano) (ABAP) através do método de Evelson et al., 2001.

A quimiluminescência basal foi determinada na presença de ABAP e luminol (nível inicial). Dez microlitros de trolox 0.2 µM ou amostra foram adicionados ao meio de incubação os quais reduzem a quimiluminescência. O tempo necessário para retornar aos

níveis de quimiluminescência iniciais é definido como tempo de indução. O tempo de indução é diretamente proporcional à capacidade antioxidante do tecido e é comparada ao tempo de indução do trolox. Os resultados foram expressos como nmol trolox/mg proteína.

4.2.6 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

As estruturas cerebrais foram homogeneizadas na proporção 1:10 (massa/volume) em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,6.

- Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo método de Aebi (1984), o qual é baseado no desaparecimento do H_2O_2 em 240 nm. Uma unidade de catalase é definida como 1 μ mol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto e a atividade específica foi expressa em unidades por mg de proteína.

- Glutathione peroxidase (GSH-Px)

A atividade da GSH-Px foi medida pelo método de Wendel (1981). Tert-butil-hidroperóxido foi usado como substrato da reação. O desaparecimento de NADPH do meio reacional foi monitorado com espectrofotômetro a 340 nm. Uma unidade de GSH-Px é definida como 1 μ mol de NADPH consumido por minuto por mg de proteína. A atividade específica foi expressa em unidades por mg de proteína.

- Superoxide dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pelo método de Maklund (1985). Este método é baseado na autooxidação do pirogallol, o qual é altamente dependente de oxigênio. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da autooxidação do pirogallol e a atividade específica foi reportada como unidades por mg de proteína.

4.2.7 Determinação de Proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina bovina sérica como padrão.

4.2.8 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student.

4.3 Resultados

A tabela 1 mostra que o sulfito (500 μ M) não alterou a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, a peroxidação lipídica (TBARS) e a capacidade antioxidante tecidual não-enzimática (TRAP) em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos de 60 dias após 30 min e 7 dias da administração i.c.v.

As tabelas 2 e 3 mostram que a atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GSH-Px) não sofreram alterações em nenhuma das estruturas cerebrais testadas, 30 min e 7 dias, após a administração i.c.v. de sulfito (500 μ M), respectivamente.

Tabela 1. Efeito do sulfito (500 μM) sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, TBARS, TRAP em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos adultos.

Na^+, K^+-ATPase (nmol Pi/min.mg proteína)		30 min		7 dias	
		<i>Controle</i>	<i>Sulfito 500 μM</i>	<i>Controle</i>	<i>Sulfito 500 μM</i>
	<i>Córtex</i>	1320,50 \pm 59,12	1255,75 \pm 74,47	1194,00 \pm 174,93	1011,00 \pm 154,28
<i>Estriado</i>	1411,50 \pm 77,53	1301,25 \pm 107,82	1216,00 \pm 151,64	1104,50 \pm 40,35	
<i>Hipocampo</i>	1353,25 \pm 222,84	1250,00 \pm 141,21	1286,50 \pm 117,48	1093,50 \pm 153,83	

TBARS (nmol TBA/min.mg proteína)		30 min		7 dias	
		<i>Controle</i>	<i>Sulfito 500 μM</i>	<i>Controle</i>	<i>Sulfito 500 μM</i>
	<i>Córtex</i>	13,08 \pm 2,87	12,92 \pm 3,26	8,21 \pm 1,05	9,30 \pm 1,40
<i>Estriado</i>	14,12 \pm 1,56	15,55 \pm 1,47	9,54 \pm 1,09	9,79 \pm 1,09	
<i>Hipocampo</i>	12,91 \pm 1,75	11,29 \pm 1,04	6,68 \pm 1,11	7,28 \pm 1,02	

TRAP (nmol Trolox/min.mg proteína)		30 min		7 dias	
		<i>Controle</i>	<i>Sulfito 500 μM</i>	<i>Controle</i>	<i>Sulfito 500 μM</i>
	<i>Córtex</i>	138,84 \pm 26,20	129,70 \pm 19,28	75,69 \pm 13,18	69,20 \pm 7,86
<i>Estriado</i>	119,62 \pm 8,78	113,09 \pm 10,97	78,89 \pm 4,28	72,16 \pm 1,70	
<i>Hipocampo</i>	92,78 \pm 12,86	91,54 \pm 9,00	134,77 \pm 13,90	138,12 \pm 27,75	

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão para um n = 4 ou 6.

Tabela 2. Efeito do sulfito 500 μM sobre a atividade das enzimas antioxidantes, CAT, SOD e GSH-Px após 30 min em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos adultos.

		<i>Córtex cerebral</i>	<i>Estriado</i>	<i>Hipocampo</i>
CAT (U/mg proteína)	<i>Controle</i>	4,88 \pm 0,79	7,94 \pm 1,10	4,91 \pm 0,38
	<i>Sulfito</i>	3,46 \pm 0,32	6,24 \pm 0,66	4,22 \pm 0,28
SOD (U/mg proteína)	<i>Controle</i>	4,81 \pm 0,75	5,31 \pm 1,27	4,96 \pm 1,06
	<i>Sulfito</i>	5,06 \pm 0,76	4,69 \pm 0,93	4,17 \pm 1,08
GSH-Px (U/mg proteína)	<i>Controle</i>	45,22 \pm 3,40	62,58 \pm 4,25	58,70 \pm 4,99
	<i>Sulfito</i>	39,52 \pm 5,32	62,30 \pm 5,19	49,96 \pm 8,37

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão para um n = 4 ou 6.

Tabela 3. Efeito do sulfito 500 μM sobre a atividade das enzimas antioxidantes, CAT, SOD e GSH-Px após 7 dias em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos adultos.

		<i>Córtex cerebral</i>	<i>Estriado</i>	<i>Hipocampo</i>
CAT (U/mg proteína)	<i>Controle</i>	3,87 \pm 0,48	4,06 \pm 0,63	4,79 \pm 0,25
	<i>Sulfito</i>	3,14 \pm 0,39	3,14 \pm 0,48	4,38 \pm 0,97
SOD (U/mg proteína)	<i>Controle</i>	5,82 \pm 0,50	8,26 \pm 1,26	4,97 \pm 0,71
	<i>Sulfito</i>	5,22 \pm 0,86	7,05 \pm 0,89	5,49 \pm 0,70
GSH-Px (U/mg proteína)	<i>Controle</i>	52,87 \pm 4,60	57,54 \pm 10,46	42,50 \pm 5,04
	<i>Sulfito</i>	43,72 \pm 3,42	57,87 \pm 7,61	45,69 \pm 4,83

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão para um n = 4 ou 6.

5. DISCUSSÃO

A deficiência de sulfito oxidase é uma doença autossômica recessiva na qual o caminho de degradação oxidativa dos aminoácidos sulfurosos está comprometido. A conversão de sulfito a sulfato está prejudicada, resultando no acúmulo de metabólitos tóxicos e na deficiência de sulfato. Essa doença é caracterizada por disfunções neurológicas severas, convulsões refratárias, espasticidade, movimentos coreatéticos, deslocamento da lente ocular, e acúmulo e excreção de sulfito, tiosulfato e S-sulfocisteína (Chan et al., 2002). Embora a fisiopatologia da deficiência de sulfito oxidase não seja conhecida, estudos sugerem que o distúrbio do desenvolvimento e o dano cerebral podem ocorrer como resultado de níveis tóxicos de sulfito no cérebro (Johnson & Duran et al., 2001).

Dessa forma, nossos objetivos iniciais foram avaliar os possíveis mecanismos envolvidos nos danos neurotóxicos mediado pelo sulfito. As concentrações de sulfito utilizadas nesse estudo foram definidas com base nos trabalhos de Zhang e colaboradores (2004). As estruturas cerebrais estudadas foram escolhidas considerando os estudos neuroradiológicos dos pacientes afetados pela deficiência de sulfito oxidase, os quais mostram atrofia cerebral difusa com extensa perda de neurônios e mielina, calcificações em gânglios da base e ventriculomegalia. Esses achados histológicos são acompanhados por disfunções neurológicas severas caracterizadas por retardo mental, convulsões e retardo psicomotor (Chan et al., 2002).

Primeiramente, investigamos os efeitos *in vitro* do sulfito nas concentrações 1 – 500 μM em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos de 10 e 60 dias. Os resultados desse estudo demonstraram que o sulfito (500 μM) alterou parâmetros de estresse oxidativo

(reduziu a atividade da CAT e aumentou o TBARS), implicando num possível envolvimento do sulfito na formação de radicais livres. Por outro lado, o sulfito, nas concentrações testadas, não foi capaz de alterar a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas.

Partindo-se da hipótese de indução de estresse oxidativo nas condições *in vitro* pelo sulfito (500 μM), avaliamos os efeitos *in vivo*, 30 min e 7 dias, após a administração i.c.v. desse composto. Nos estudos *in vivo*, entretanto, o sulfito (500 μM) não foi capaz de interferir na capacidade antioxidante enzimática (CAT, SOD e GSH-Px) e não-enzimática (TRAP) em cérebro de ratos adultos. Além disso, não foram observadas alterações na peroxidação lipídica (TBARS) ou na atividade da Na^+, K^+ -ATPase.

O dano oxidativo é um desequilíbrio no balanço pró-oxidante-antioxidante (Sies, 1991). O ataque de espécies reativas pode causar dano a biomoléculas, falha no reparo e substituição de biomoléculas danificadas ou mesmo propagação do estresse oxidativo (Halliwell, 2006b).

A Na^+, K^+ -ATPase é um sistema de transporte ativo presente na membrana da célula e é particularmente importante no cérebro uma vez que, aproximadamente dois terços da demanda de energia deste órgão é utilizada para manter o potencial transmembrana neuronal (Kumar & Kurup, 2002). A inibição desta enzima por ERO foi demonstrada em cérebro de animais (Rauchová et al., 1999). A neurotoxicidade provocada pela inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase está associada a várias patologias neurológicas; tais como; epilepsia, isquemia cerebral, esquizofrenia e doença de Parkinson e de Alzheimer (Kumar & Kurup, 2002, Kurup & Kurup, 2002).

O sulfito é uma espécie iônica com alta reatividade, a qual interage com moléculas de importância biológica em reações potencialmente tóxicas (Izgut-Uysal et al., 2005). Várias hipóteses têm sido propostas para explicar os mecanismos envolvidos no dano cerebral presente na deficiência de sulfito oxidase. O efeito tóxico do sulfito tem sido demonstrado em muitos componentes celulares, incluindo DNA (Southerland et al., 1982, Rencuzogullari et al., 2001, Meng et al., 2002).

Dados da literatura mostram que o sulfito pode sofrer oxidação de um elétron formando um radical ânion sulfito ($\text{SO}_3^{\cdot-}$) e este pode reagir com oxigênio molecular formando radical peroxil sulfite ($\text{SO}_3\text{OO}^{\cdot}$) e o radical ânion sulfato ($\text{SO}_4^{\cdot-}$) (Mottley & Mason et al., 1988).

Alguns trabalhos mostram que o radical sulfito, é capaz de causar hidroxilação da deoxiguanosina gerando 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina e também de danificar a dupla fita de DNA (Shi & Mao, 1994). Além disso, estudos demonstram que sulfito pode agir como agente neurotóxico através da interação com peroxinitrito (ONOO^{\cdot}) (Reist et al., 1998). O radical sulfato também apresenta reatividade semelhante ao radical hidroxil podendo reagir com outros radicais (Mottley & Mason et al., 1988).

Analisando nossos resultados em conjunto, pode-se verificar, nas condições *in vitro*, um efeito direto do sulfito sobre as estruturas cerebrais avaliadas. Entretanto, quando administramos sulfito através de injeção i.c.v., o metabolismo celular parece atuar no sentido de neutralizar os efeitos do sulfito, e desta forma impedir o dano neurotóxico.

Apesar disso, a possibilidade de citotoxicidade induzida pelo sulfito não pode ser excluída, uma vez que, não se tem registros exatos da concentração de sulfito em cérebro de pacientes afetados pela deficiência de sulfito oxidase e não se conhecem os tecidos cerebrais alvos nessa doença.

Algumas considerações devem ser feitas em relação aos resultados *in vivo*, se considerarmos a impossibilidade de predizermos a quantidade de sulfito capaz de se difundir em cada tecido cerebral após a administração i.c.v. de sulfito 500 μ M e a influência do tempo de exposição à droga sobre os achados bioquímicos.

Os estágios de desenvolvimento do animal também podem implicar em variações nos efeitos do sulfito. Nesse contexto, embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas nos estudos *in vitro*, os animais neonatos parecem apresentar uma tendência à maior suscetibilidade ao dano oxidativo pelo sulfito comparada aos animais adultos. Esta diferença em relação ao estágio de desenvolvimento do animal não foram avaliadas nos estudos *in vivo*.

Diferenças na atividade da enzima sulfito oxidase interespecies são bem documentadas. A atividade dessa enzima tem-se mostrado 20 vezes maior em fígado de ratos comparada ao fígado humano (Johnson & Rajagopalan, 1976). Essas considerações apontam um catabolismo do sulfito muito mais eficiente em ratos e, portanto, nosso modelo animal pode não reproduzir os efeitos tóxicos do sulfito no homem. Modelos animais apropriados para estudar a toxicidade do sulfito pressupõem uma atividade hepática da enzima de aproximadamente 5% da de ratos normais (Johnson et al., 1974).

Concluindo, nossos resultados mostram que a indução de estresse oxidativo pode estar envolvida no potencial neurotóxico do sulfito e corroboram para hipótese da participação desse composto na fisiopatologia da deficiência de sulfito oxidase. Além disso, nossos resultados reforçam a importância da determinação dos níveis de sulfito alcançados em cérebro de pacientes, o que pode evidenciar, além da condição de estresse oxidativo, o comprometimento de outras vias metabólicas importantes no funcionamento cerebral e

podem apontar estratégias terapêuticas na prevenção dos efeitos neurológicos da deficiência de sulfito oxidase.

6. CONCLUSÕES

- O sulfito *in vitro* na concentração 500 μM reduziu a atividade da catalase e aumentou a lipoperoxidação em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos jovens e adultos.
- Após 30 min e 7 dias da administração i.c.v. de sulfito 500 μM em ratos de 60 dias, não foram observadas alterações nas atividades das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GSH-Px em córtex cerebral, estriado e hipocampo. Nestas mesmas condições, o sulfito não foi capaz de interferir na capacidade antioxidante tecidual não enzimática (TRAP inalterado) e na peroxidação lipídica (TBA inalterado).
- A atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase não mostrou-se susceptível à ação *in vitro* e *in vivo* do sulfito (500 μM) em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos nos tempos de exposição avaliados.
- Em resumo, o sulfito (500 μM) foi capaz de induzir estresse oxidativo *in vitro*, entretanto nas condições *in vivo*, não se observou alteração tanto na capacidade antioxidante tecidual quanto na peroxidação lipídica em cérebro de ratos.

7. PERSPECTIVAS

Adotar o modelo desenvolvido por Johnson e colaboradores (1974), de indução da deficiência da enzima sulfito oxidase experimental em ratos para mimetizar a atividade dessa enzima em humanos. Esse modelo baseia-se na dieta com baixas concentrações de molibdênio e tratamento com tungstênio (antagonista competitivo do molibdênio).

Usando este modelo avaliaremos os seguintes parâmetros:

- estresse oxidativo
- metabolismo energético
- comprometimento à lipídios, proteínas e DNA
- comportamentais (esquiva inibitória e campo aberto)

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984, 105: 121-126.
2. Bai, J. & Meng, Z. Effects of sulfur dioxide on apoptosis-related gene expressions in lungs from rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 2005, 43: 272-279.
3. Baker, M. T., Dehring, D. J., Gregerson, M. S. Sulfite supported lipid peroxidation in Propofol emulsions. *Anesthesiology* 2002, 97: 1162-1167.
4. Bascom, R., Bromberg, P. A., Costa, D. A. Health effects of outdoor air pollution. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 153: 3-50.
5. Baud, O., Laudenbach, V., Evrard, P., Gressens, P. Neurotoxic effects of fluorinated glucocorticoid preparations on the developing mouse brain: Role of preservatives. *Pediatr Res* 2001, 50:706-711.
6. Beck-Speier, I., Liese, J. G., Belohradsky, B. H., Goldleski, J. J. Sulfite stimulates NADPH oxidase of human neutrophils to produce active oxygen radicals via protein Kinase C and Ca²⁺/calmodulin pathways. *Free Radic Biol Med* 1993, 14: 661-668.
7. Beckman, K. B. & Ames, B. N. The free radicals theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998, 79: 547-581.
8. Boldyrev, A. A. & Bulygina, E. R. Na/K-ATPase and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 1997, 3:666-8.
9. Chan, k., Li, C., Lai, C., Ng, S., Chan, A. Infantile isolated sulphite oxidase deficiency in a Chinese family: a rare neurodegenerative disorder. *Hong Kong Med J.* 2002, 8: 279-282.

10. Chan, K. M., Delfer, D., Junger, K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 1986, 157: 375-380.
11. Christopher, R., Collaco, C. R., Hochman, D. J., Goldblum, R. M., Brooks, E. G. Effect of sodium sulfite on mast cell degranulation and oxidant stress. *Ann Allergy Asthma & Immunol* 2006, 96:550-556.
12. Cohen, H. J., Drew, R. T., Johnson, J. L., Rajagopalan, K. V. Molecular basis of the biological function of molybdenum. The relationship between sulfite oxidase and the acute toxicity of bisulfite and SO₂. *Proc Nat Acad Sci* 1973, 70: 3655-3659.
13. Constantin, D., Bini, A., Meletti, E., Moldeus, P., Monti, D., Tomasi, A. Age-related differences in the metabolism of sulphite to sulphate and in the identification of sulphur trioxide radical in human polymorphonuclear leukocytes. *Mech Ageing Dev* 1996, 88: 95-109.
14. Derin, N., Yargıçoglu, P., Aslan, M., Elmas, O., Agar, A., Aicigüzel, Y. The effect of sulfite and chronic restraint stress on brain lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities. *Toxicol Ind Health*. 2006, 22: 233-240.
15. Dobrota, D., Matejovicova, M., Kurrela, E.G., Boldyrev, A.A. Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. *Cell Mol Neurobiol* 1999,19:141-149.
16. Dublin, A. B., Hald, J. K., Wootton-Gorges, S. L. Isolated Sulfite Oxidase Deficiency: MR imaging features. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002, 23:484-485.
17. Du, Z. & Meng, Z. Effects of derivatives of sulfur dioxide on transient outward potassium currents in acutely isolated hippocampal neurons. *Food Chem Toxicol* 2004a, 42: 1211-1216.

18. Du, Z. & Meng, Z. Modulation of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons by sulfur dioxide derivatives. *Brain Res* 2004b, 1010: 127-133.
19. Edwards, M. C., Johnson, J. L., Marriage, B., Graf, T. N., Coyne, K. E., Rajagopalan, K. V. and MacDonald, I. M. Isolated Sulfite Oxidase Deficiency: Review of Two Cases in One Family. *Ophthalmology*. 1999, 106: 1957-1961.
20. El Husny, A. S. & Fernandes-Caldato, M. C. Erros Inatos do Metabolismo: revisão de literatura. *Revista Paraense de Medicina* 2006, 20: 41-45.
21. Elmas, O., Aslan, M., Çağlar, S., Derin, N., Agar, A., Alicigüzel, Y., Yargıçoğlu, P. The prooxidant effect of sodium metabisulfite in rat liver and kidney. *Regul Toxicol Pharmacol* 2005, 42: 77-82.
22. Erecinska, M. & Silver, I. A. Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 1994, 7: 21-29.
23. Esterbauer, H. & Cheeseman, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods. Enzymol.* 1990, 186: 407-421.
24. Evelson, P., Travacio, M., Repetto, M., Escobar, J., Llesuy, S., Lissi, E.A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys* 2001, 388: 261-266.
25. FAO/WHO: Expert Committee on Food Additives. Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principle and of specification, 17th report. Food and Agriculture Organization 1974.
26. Finch, L. & Southerland, W. M. The reaction of bisulfite with liposomal membranes. *Bioscience Reports*, 1988, 8: 443-448.

27. Finkelstein, J. D. Review: Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med.* 2007, 45:1694-1699.
28. Franzon, R., Lamers, M.L., Stefanello, F.M., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S. Evidence that oxidative stress is involved in the inhibitory effect of proline on Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptic plasma membrane of rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 2003, 21: 303-307.
29. Garrett, R. M., Johnson, J. L., Graf, T. N., Feigenbaum, A., Rajagopalan, K.V. Human sulfite oxidase R160Q: identification of the mutation in a sulfite oxidase-deficient patient. and expression and characterization of the mutant enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 26:6394-6398.
30. Garrido, N., Meseguer, M., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl* 2004, 6: 59-65.
31. Giugliani, R. Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. *Pediatria Moderna* 1988, 1: 29-40.
32. Grisar, T. Glial and neuronal Na⁺,K⁺-pump in epilepsy. *Ann. Neurol.*, 1984, 16: 128-134.
33. Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006a, 97:1634-1658.
34. Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006b, 141: 312-322.
35. Haraguchi, H. Inherited metabolic disorders of the transsulfuration pathway. *Nippon Rinsho* 1992, 50:1548-1554.

36. Harvey, S. B. & Nelsestuen, G. L. Reaction of nitric oxide and its derivatives with sulfites: a possible role in sulfite toxicity. *Biochim Biophys Acta* 1995, 1267: 41-44.
37. Hobson, E. E., Thomas, S., Crofton, P. M., Murray, A. D., Dean, J. C. S., Lloyd, D. Isolated sulfite oxidase deficiency mimics the features of hypoxic ischaemic encephalopathy. *Eur J Pediatr* 2005,164: 655-659.
38. Izgut-Uysal, V. N., Kuçukatay, V. Bulbul, M., Tan, R., Yargıçoğlu, P., Agar, A. Effect of sulfite on macrophage functions of normal and sulfite oxidase-deficient rats. *Food Chem toxicol* 2005, 43: 599-605.
39. Jamme, I., Petit, E., Divoux, D., Gerbi, A., Maixent, J. M., Nouvelot, A. Modulation of mouse cerebral Na^+,K^+ -ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport*. 1995, 7: 333-337.
40. Meng, Z. & Zhang, L. Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in lymphocytes of workers exposed to sulphur dioxide. *Mutat Res* 1990a, 241: 15-20.
41. Johnson, J. L., Coyne, K. E., Garste, R. M., Zabet, M-T., Dorche, C., Kisker, C., Rajagopalan K. V. Isolated Sulfite Oxidase Deficiency: Identification of 12 novel SUOX mutations in 10 patients. *Human Mutation* 2002
42. Johnson, J. L. & Duran, M. Molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency (chapter 128). In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. McGraw-Hill, New York, 2001, 3163-3177.

43. Johnson, J. L., Rajagopalan, K. V., Cohen, H. J. Molecular basis of the biological function of molybdenum. Effect of tungsten on xanthine oxidase and sulfite oxidase in the rat. *J Biol Chem* 1974, 249:859-866.
44. Johnson, J. L. & Rajagopalan, K. V. Purification and properties of sulfite oxidase from human liver. *J Clin Invest* 1976, 58: 543-550.
45. Jones, D. H. & Matus, A. I. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1974, 356: 276-287.
46. Kajiyama, H., Nojima, Y., Mitsuhashi, H., Ueki, K., Tamura, S., Sekihara, T., Wakamatsu, R., Yano, S., Naruse, T. Elevated levels of serum sulfite in patients with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2000, 11: 923-927.
47. Kaplan, J. K. Biochemistry of Na⁺-K⁺-ATPase. *Annu Rev Biochem* 2002, 71: 511-535.
48. Kumar, A. R. & Kurup, P.A. Inhibition of membrane Na⁺-K⁺-ATPase activity: A common pathway in central nervous system disorders. *JAPI* 2002, 50:400-406.
49. Kurup, R. K. & Kurup, P. A. Hypothalamic digoxin related membrane Na⁺-K⁺-ATPase inhibition and familial basal ganglia calcification. *Neurosci Res* 2002, 42: 35-44.
50. Lees, G. J. Contributory mechanism in the causation of neurodegenerative disorders. *Neurosci.*, 1993, 54: 287-322.
51. Lehninger, A. L, Nelson, D. L., Cox, M. M. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc. New York, 2nd Ed., 1995.

52. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L., Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193: 265-267.
53. McGrail, K. M., Phillips, J. M., Sweadner, K. J. Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. *J Neurosci* 1991, 11:381-91.
54. Maklund, S. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton 1985, 243-247.
55. Meng, Z., Qin, G., Zhang, B., Bai, J. DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice. *Mutagenesis* 2004, 19:465-468.
56. Meng, Z., Sang, N., Zhang, J. Effects of derivatives of sulfur dioxide on micronuclei formation in mouse bone marrow cells in vivo. *Bull Environ Contam Toxicol* 2002, 69: 257-264.
57. Meng, Z. & Nie, A. Effects of sodium metabisulfite on potassium currents in acutely isolated CA1 pyramidal neurons of rats hippocampus. *Food Chem Toxicol* 2005, 43: 225-232.
58. Mottley, C. & Mason, R. P. Sulfate anion free radical formation by peroxidation of (bi)sulfite and its reaction with hydroxyl radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 1988, 267: 681-689.
59. Mudd, S. H., Irreverre, F., Laster, L. Sulfite oxidase deficiency in man: demonstration of the enzymatic defect. *Science*. 1967, 156:1599-1602.
60. Nie, A. & Meng, Z. Modulation of L-type calcium current in rat cardiac myocytes by sulfur dioxide derivatives. *Food Chem Toxicol* 2006, 44: 355-363.

61. Nie, A. & Meng, Z. Sulfur dioxide derivatives modulate Na/Ca exchange currents and cytosolic [Ca²⁺]_i in rat myocytes. *Biochem Biophys Res Comm.* 2007, 358: 879-884.
62. Ozturk, O. H., Kuçukatay, V., Yonden, Z., Agar, A., Bagci, H., Delibas, N. Expressions of N-methyl-D-aspartate receptors NR2A and NR2B subunit proteins in normal and sulfite-oxidase deficient rat's hippocampus: effect of exogenous sulfite ingestion. *Arch Toxicol* 2006.
63. Paxinos, G. The rat brain in stereotaxic coordinates. Ed. San Diego, Academic Press 1986.
64. Pontes, Z.L., Oliveira, L.S., Bavaresco, C.S., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S. Proline administration decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats. *Metab Brain Res* 1999, 26: 1321–1326.
65. Rauchová, H., Drahotka, Z., Koudelová, J. The role of membrane fluidity changes and thiobarbituric acid-reactive substances production in the inhibition of cerebral cortex Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Physiol Res* 1999, 48:73-78.
66. Reist, M., Marshall, K-A., Jenner, P., Halliwell, B. Toxic effects of sulfite in combination with peroxynitrite on neuronal cells. *J Neurochem* 1998, 71: 2431-2438.
67. Rencuzogullari, E., LLa, H. B., Kayraldiz, A., Topaktas, M. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite , a food preservative. *Mutat Res* 2001, 490: 107-112.

68. Saudubray, J. M., Sedel, F., Walter, J. H. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: An introduction. *J Inherit Metab Dis* 2006, 29:261-274.
69. Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill, Inc., New York, 8th Ed., 2001.
70. Sedel, F., Lyon-Caen, O., Saudubray J. M. Therapy insight: inborn errors of metabolism in adult neurology – a clinical approach focused on treatable diseases. *Nat Clin Pract Neurol* 2007, 3:279-290.
71. Shi, X. & Mao, Y. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA damage induced by sulfur trioxide anion radicals. *Biochem Biophys Res Comm* 1994, 205: 141-147.
72. Sies, H. Oxidative stress. Oxidants and antioxidants. Academic Press, New York 1991.
73. Southerland, W. M., Akogyeram, C. O., Toghrol, F., Sloan, L., Scherrer, R. Interaction of bisulfite with unsaturated fatty acids. *J Toxicol Environ Health*. 1982, 10: 479-491.
74. Stark, G. Functional consequences of oxidative membrane damage. *J Membrane Biol* 2005, 205: 1-16.
75. Stefanello, F.M., Chiarani, F., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S. Methionine alters Na(+),K(+)-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 2005, 23:651-656.
76. Stipanuk, M. H. Sulfur Amino Acid Metabolism: Pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu. Rev. Nutr.* 2004, 24:539-577.

77. Streck, E.L., Zugno, A.I., Tagliari, B., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Metab Brain Dis* 2002, 17: 83-91.
78. Tan, W-H., Eihler, F. S., Hoda, S, Lee, M. S., Baris, H., Hanley, C. A., Grant, E., Krishnamoorthy, K. S., Shih, V. E. Isolated Sulfite Oxidase Deficiency: A case report with a novel mutation and review of the literature. *Pediatrics*. 2005, 116: 757-766.
79. Tejnorová, I. Sulfite oxidase activity in liver and kidney tissue in five laboratory animal species. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978, 44:251-256.
80. Telles Filho, P. A. Asma Brônquica. Disponível em: http://www.asma-bronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_asma_sulfitos. Acesso em: 15 nov. 2007.
81. Vincent, A. N., Lim, B. G., Tan, J., Whiteman, M., Cheung, N. S., Halliwell, B., Wong, K. P. Sulfite-mediated oxidative stress in kidney cells. *Kidney International*. 2004, 65: 393-402.
82. Wendel, A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981, 77: 325–333.
83. Woo, W. H., Yang, H., Wong, K. P., Halliwell, B. Sulphite oxidase gene expression in human brain and in other human and rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 305: 619-23.
84. Wyse, A. T. S., Streck, E. L., Worm, P., Wajner, M., Ritter, F., Netto, C. A. Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem. Res*. 2000, 25: 969-973.
85. Wyse, A. T., Zugno, A. I., Streck, E. L., Matté, C., Calcagnotto, T., Wannmacher, C. M., Wajner, M. Inhibition of Na(+),K(+)-ATPase activity in

- hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem Res.* 2002, 27: 1685-1689.
86. Wyse, A. T. S., Wajner, M., Brusque, A. M., Wannmacher, C. M. D. Alanine reverses the inhibitory effect of phenylalanine and its metabolites on Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. *Biochem. Soc. Trans.*, 1995, 23: 227S.
87. Yargicoglu, P., Sahin, E., Gumuslu, S., Agar, A. The effect of sulfur dioxide inhalation on active avoidance learning, antioxidant status and lipid peroxidation during aging. *Neurotoxicol Teratol* 2007, 29: 211-218.
88. Yu, S. P. Na⁺,K⁺-ATPase: the new face of an older player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem Pharmacol* 2003, 66: 1601-1609.
89. Zhang, X., Vincent, A. S., Halliwell, B., Wong, K. P. A Mechanism of Sulfite Neurotoxicity: Direct Inhibition of Glutamate Dehydrogenase. *The J Biol Chem* 2004, 279: 43035-43045.

9. Lista de Figuras e Tabelas.

	Pág.
Figura 1. Representação esquemática da reação catalisada pela enzima sulfito oxidase	6
Figura 2. Deficiência de sulfito oxidase	7
Figura 3. Vias metabólicas alternativas da cisteína	9
Figura 4. Ciclo catalítico da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	16
Figura 5. Estresse oxidativo – desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes	18
Tabela 1. Efeito do sulfito (500 µM) sobre a atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase, TBARS, TRAP, após 30min e 7 dias da administração intracerebroventricular em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos adultos.	35
Tabela 2. Efeito do sulfito (500 µM) sobre a atividade das enzimas antioxidantes, CAT, SOD e GSH-Px após 30min da administração intracerebroventricular em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos adultos.	36
Tabela 3. Efeito do sulfito (500 µM) sobre a atividade das enzimas antioxidantes, CAT, SOD e GSH-Px após 7 dias da administração intracerebroventricular em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos adultos.	36