

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

EFEITOS DO SULFITO E DO TIOSSULFATO SOBRE A
NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA E A HOMEOSTASE REDOX
EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS

BELISA DOS SANTOS PARMEGGIANI
ORIENTADOR: Prof. Dr. GUILHIAN LEIPNITZ

Porto Alegre, 2016

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

EFEITOS DO SULFITO E DO TIOSSULFATO SOBRE A
NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA E A HOMEOSTASE REDOX
EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS

BELISA DOS SANTOS PARMEGGIANI

ORIENTADOR: Prof. Dr. GUILHIAN LEIPNITZ

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

Porto Alegre, 2016

CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos Parmeggiani, Belisa
EFEITOS DO SULFITO E DO TIOSSULFATO SOBRE A
NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA E A HOMEOSTASE REDOX
EM CÔRTEX CEREBRAL DE RATOS / Belisa dos Santos
Parmeggiani. -- 2016.
53 f.

Orientador: Guilhian Leipnitz.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2016.

1. sulfito. 2. sulfito oxidase. 3. estresse
oxidativo. 4. neurotransmissão glutamatérgica. I.
Leipnitz, Guilhian, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Regina e Eduardo, que sempre incentivaram, desde muito pequena, meu interesse pela ciência. Obrigada por me apoiarem ao longo de toda essa jornada.

A toda a minha família, em especial à minha irmã Brenda, por todo o carinho.

Ao Guilhian, meu orientador e meu amigo, que, longe ou perto, sempre esteve comigo.

Ao professor Moacir, pelo acolhimento e pelas parcerias

Aos meus colegas do lab “65”, pela convivência e pela amizade. Em especial, aos meus queridos Alana e Mateus Grings, que me ajudaram em absolutamente tudo, seguraram a minha mão nos momentos difíceis e me proporcionaram muita alegria e diversão.

Também à Bi, minha amiga e minha inspiração. Vocês são inesquecíveis.

Aos nossos bolsistas, Gabi Cardoso, Julia, Fernanda, Rafa e Gaby Magueta, e meus colegas de iniciação científica, Anna Paula e Gustavo, pela companhia e toda a ajuda de vocês.

A todos os amigos que me acompanharam, de alguma maneira, nessa nova etapa. Em especial, Tati, Rodrigo, Gabi Sanseverino, Milena, Djeni, Alicia e Carol Chatain. Vocês tornam tudo mais fácil, e eu sou muito feliz de poder contar com vocês.

Obrigada!

SUMÁRIO

PARTE I	1
Resumo	2
Abstract	4
Lista de abreviaturas	6
I.1 Introdução	8
I.1.1 Erros inatos do metabolismo	8
I.1.2 Sulfito oxidase	11
I.1.3 Deficiência da sulfito oxidase	12
I.1.3.1 Achados clínicos e laboratoriais	13
I.1.3.2 Achados neuropatológicos	13
I.1.3.3 Diagnóstico e tratamento	14
I.1.4 Neurotransmissão glutamatérgica	15
I.1.5 Radicais livres e espécies reativas	18
I.1.6 Defesas antioxidantes	20
I.1.7 Estresse oxidativo	20
I.2 Justificativa	21
I.3 Objetivos	22
I.3.1 Objetivos gerais	22
I.3.2 Objetivos específicos	22
PARTE II	23
Capítulo I	24
PARTE III	33
III.1 Discussão	34
III.2 Conclusões	38
III.3 Perspectivas	38
Referências	39
Lista de figuras	48
Lista de tabelas	49

PARTE I

RESUMO

A sulfito oxidase (SO) é uma enzima que catalisa a última reação na rota de degradação de aminoácidos sulfurados, a oxidação de sulfito a sulfato. A deficiência da SO é um erro inato do metabolismo que pode ser causado tanto pela deficiência isolada da enzima como por defeitos na síntese do seu cofator molibdênio, cuja principal característica bioquímica é o acúmulo tecidual e a excreção urinária aumentada de sulfito, tiosulfato e S-sulfocisteína. Os pacientes acometidos pela doença têm sintomatologia predominantemente neurológica, e exames de imagem evidenciam encefalomalácia cística, atrofia cerebral e edema, perda neuronal e astrogliose, os quais se concentram na região cortical. Pouco se sabe sobre os patomecanismos envolvidos nos danos encontrados na deficiência da SO, porém dados apontam para uma ação tóxica dos metabólitos acumulados. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi o de investigar os efeitos *in vitro* do sulfito e do tiosulfato sobre a neurotransmissão glutamatérgica e parâmetros de estresse oxidativo em fatias de córtex cerebral de ratos. As fatias foram expostas ao sulfito ou tiosulfato (10 – 500 μ M) durante 1 ou 3 h para a realização dos experimentos, nos quais medimos a captação de glutamato dependente de sódio, a atividade da enzima glutamina sintetase, os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), o conteúdo de glutathione (GSH) e de sulfidrilas, a formação de carbonilas e as atividades das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), glutathione S-transferase (GST) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Também avaliamos a liberação da lactato desidrogenase e a redução do MTT. Foi observado que o sulfito diminui a captação de glutamato e que o tiosulfato diminui a atividade da glutamina sintetase. Uma tendência quase significativa de que o sulfito diminui a atividade da glutamina sintetase também foi verificada. Quanto à homeostase redox, verificamos que o sulfito, na concentração de

10 μM , aumentou os níveis de TBA-RS e diminuiu as concentrações de GSH, sem alterar a formação de carbonilas. Já o tiosulfato não teve nenhum efeito significativo sobre esses parâmetros. Ainda verificamos que 500 μM de sulfito aumentaram o conteúdo de grupamentos sulfidril em córtex cerebral de ratos e o conteúdo de GSH em um meio sem amostra biológica, o que pode ser explicado pela capacidade do sulfito em reduzir pontes dissulfeto a grupos sulfidril. Ao medir as atividades das enzimas antioxidantes GPx, GR, GST e G6PDH, não houve diferença com qualquer dos metabólitos durante 1 h de incubação, porém, ao realizarmos os mesmos experimentos com amostras incubadas por 3 h com sulfito, observamos inibição das atividades da GPx, da GST e da G6PDH. Finalmente, observamos que o sulfito não alterou a redução do MTT e a liberação de lactato desidrogenase, indicando que os resultados encontrados não são devidos à morte celular. Pode ser concluído que um prejuízo na neurotransmissão glutamatérgica e estresse oxidativo causados pelos metabólitos acumulados na deficiência da SO estão envolvidos, pelo menos parcialmente, na disfunção neurológica observada nessa doença.

ABSTRACT

Sulfite oxidase (SO) is the enzyme that catalyzes the oxidation of sulfite to sulfate, which is the last step in the pathway of degradation of sulfur-containing amino acids. SO deficiency is an inborn error of metabolism caused either by isolated deficiency in this enzyme, or by defects in the synthesis of its molybdenum cofactor. The main biochemical characteristic of this disorder is the tissue accumulation and high urinary excretion of sulfite, thiosulfate and cysteine-S-sulfate. Patients present predominantly neurological symptoms and brain abnormalities, such as cystic encephalomalacia, brain atrophy and swelling and neuronal loss, which prevail in the cortical region. Although available data point towards a toxic mechanism of the accumulating metabolites, little is known about the exact pathomechanisms exerted by these compounds. Therefore, our objective in this study was to investigate the *in vitro* effects of sulfite and thiosulfate on glutamatergic neurotransmission and oxidative stress parameters in rat cerebral cortex slices, a system with preserved integrity. Slices were exposed to sulfite or thiosulfate (10 – 500 μM) for 1 or 3 h. After the incubation, we measured sodium-dependent glutamate uptake, glutamine synthetase activity, thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) levels, glutathione (GSH) and sulfhydryl content, carbonyl formation and the activities of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). Lactate dehydrogenase and MTT reduction were also evaluated. We verified that sulfite reduced the glutamate uptake and that thiosulfate inhibited glutamine synthetase activity. A pronounced trend toward glutamine synthetase inhibition caused by sulfite was also seen. Regarding redox homeostasis, 10 μM sulfite increased TBA-RS levels and decreased GSH concentrations, without altering protein carbonyl formation. Moreover, thiosulfate had no effect on these

parameters. Five hundred micromolar sulfite also increased sulfhydryl content in rat cerebral cortex slices and increased GSH content in a medium devoid of biological samples, which can be explained by the fact that sulfite is able to directly reduce disulfide bonds to thiol groups. We further verified that sulfite did not alter the activities of the enzymes GPx, GR, GST and G6PDH when cortical slices were incubated in the presence of sulfite during 1 h. However, after an incubation of 3 h, sulfite decreased the activities of GPx, GST and G6PDH. Finally, sulfite did not change MTT reduction and lactate dehydrogenase release, suggesting that the effects observed were not due to cell death. Therefore, it is concluded that glutamatergic neurotransmission impairment and oxidative stress induced by the accumulating metabolites in SO deficiency may contribute to the neurological dysfunction observed in this disorder.

LISTA DE ABREVIATURAS

AKU – alcaptonúria

AMPA - receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

cAMP – adenosina monofosfato cíclico

CAT – catalase

cPMP - piranopterinina cíclica monofosfato

EAAC1 – carreador de aminoácidos excitatórios 1

EAAT4 – transportador de aminoácidos excitatórios 4

EAAT5 – transportador de aminoácidos excitatórios 5

EIM – erros inatos do metabolismo

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

G6PDH – glicose-6-fosfato desidrogenase

GLAST1 – transportador de glutamato-aspartato 1

GLT-1 – transportador de glutamato 1

GPx – glutathiona peroxidase

GR – glutathiona reductase

GSH – glutathiona reduzida

GSSG – glutathiona oxidada

GST – glutationa S-transferase

HPLC – cromatografia líquida de alta resolução

iGluR –receptor ionotrópico de glutamato

IP3 – inositol trifosfato

mGluR – receptor metabotrópico de glutamato

MTT - brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NADP⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NMDA – N-metil-D-aspartato

SNC – sistema nervoso central

SO – sulfito oxidase

SOD – superóxido dismutase

TBA-RS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

I.1 INTRODUÇÃO

I.1.1 Erros Inatos do metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) compreendem um grupo de doenças com quadro clínico muito variado, cuja característica comum é a ocorrência de um distúrbio metabólico causado por mutações genéticas, as quais levam à síntese de uma proteína defeituosa. Já foram descritos EIM com defeitos em proteínas do tipo enzima, transportador, receptor, proteína de membrana ou estrutural, cuja atividade diminuída pode prejudicar a homeostase do organismo e levar ao acúmulo de intermediários potencialmente tóxicos devido ao bloqueio de importantes rotas metabólicas [1,2].

O termo EIM foi utilizado pela primeira vez por Sir Archibald Garrod no início do século XX para descrever a alcaptonúria (AKU), uma doença do metabolismo da fenilalanina e da tirosina que provoca excreção aumentada de ácido homogentísico na urina dos pacientes, tornando-a escura. Garrod concentrou-se no estudo da duração, da natureza metabólica e da incidência familiar da AKU a partir de casos relatados por ele mesmo. Sir Garrod propôs então que a AKU seria uma doença de herança recessiva, obedecendo às leis Mendelianas, visto que alguns pacientes eram nascidos de uniões consanguíneas de pais hígidos. Ele também ressaltou que, mesmo numa época em que casamentos entre parentes eram comuns, a AKU ainda era uma doença bastante rara, denotando a sua individualidade química, ou seja, que não poderia ser explicada apenas pela consanguinidade. Tal observação indicou que um problema metabólico específico seria o responsável pelos sintomas da doença [3], o que neste caso era a deficiência da enzima ácido homogentísico oxidase, que catalisa a clivagem do anel aromático do ácido homogentísico proveniente do catabolismo da tirosina (Figura 1) [1,2].

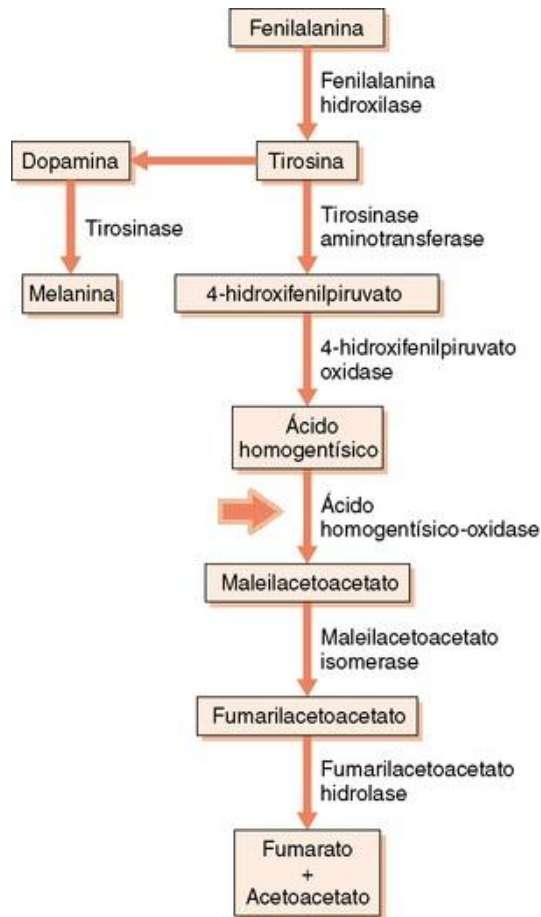


Figura 1. Rota catabólica dos aminoácidos fenilalanina e tirosina. Adaptado de Jorde, Lynn B; Carey, John C; Bamshad, Michael J. Genética Médica, Capítulo 7: Genética Bioquímica: Desordens Metabólicas.

Os estudos de Garrod permitiram que muitas outras doenças já conhecidas, tais como a pentosúria e a cistinúria, fossem também classificadas como EIM, pois apresentavam as mesmas características básicas da AKU [3]. Atualmente, já estão descritos mais de 600 EIM, os quais podem ser classificados conforme o esquema apresentado na figura 2.

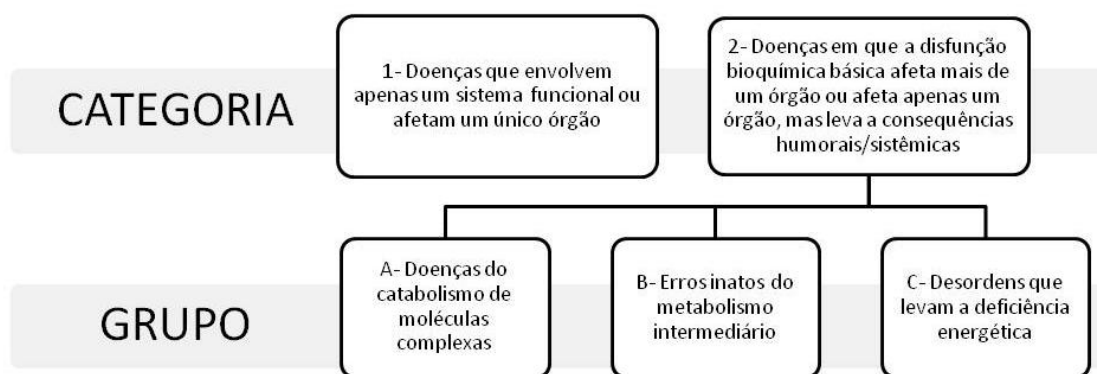


Figura 2. Classificação dos erros inatos do metabolismo baseada no quadro clínico e em características bioquímicas.

Os distúrbios caracterizados por consequências sistêmicas são mais frequentes que aqueles que afetam um único órgão. Dentro da categoria de distúrbios com consequências sistêmicas, ainda existe uma outra subdivisão em 3 grupos (Figura 2). As doenças do grupo A afetam o catabolismo de moléculas complexas e incluem as doenças lisossomais e peroxissomais, além de distúrbios no transporte intracelular e no processamento de proteínas secretadas. Já os EIM enquadrados no grupo B são aqueles que levam à toxicidade aguda ou progressiva nos pacientes devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos originados do bloqueio metabólico. Estes englobam as aminoacidopatias, a maioria das acidúrias orgânicas, defeitos do ciclo da ureia e intolerância a açúcares. No grupo C estão as doenças cujos sintomas são, pelo menos em parte, causados por déficit energético, tanto por problemas na produção como na utilização da energia. Aqui estão incluídos os defeitos na gliconeogênese e na glicogenólise, acidemias lácticas congênitas, defeitos na oxidação de ácidos graxos e doenças da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Enfatize-se aqui que, apesar do crescimento no número de casos de EIM registrados, acredita-se que muitos

pacientes sejam diagnosticados incorretamente ou ainda não tenham um diagnóstico preciso, o que se deve, principalmente, à inespecificidade dos sintomas. [4]

I.1.2 Sulfito oxidase (SO)

A SO (EC 1.8.3.1) é uma enzima mitocondrial que catalisa a oxidação de sulfito a sulfato, última reação da via de degradação dos aminoácidos sulfurados cisteína e metionina (Figura 3). Essa enzima também faz a detoxificação do sulfito exógeno, que é encontrado, por exemplo, em conservantes de alimentos e medicamentos. A estrutura da SO consiste em um homodímero de aproximadamente 110 kDa [5], sendo que cada subunidade possui um domínio heme (ou citocromo b_5) e um domínio de ligação do cofator molibdênio, além de um domínio de ancoragem que conecta os dois monômeros. O cofator, que consiste em um grupo prostético de baixo peso molecular no qual um átomo de molibdênio está complexado a uma pterina, é necessário não só para a atividade da SO, como também de outras enzimas (chamadas molibdoenzimas), tais como a xantina desidrogenase e a aldeído oxidase [6, 7].

A sequência da SO é altamente conservada entre espécies de vertebrados, sendo que a SO humana apresenta 88% de identidade com a SO de rato e 68% com a de galinha. Apesar de a estrutura cristalográfica para a SO humana ainda não estar descrita, o mecanismo de catálise da SO foi elucidado com a estrutura obtida da SO de galinha [8]. Baseado nesse modelo, o sulfito se ligaria ao cofator molibdênio, sofrendo uma oxidação de dois elétrons, sendo liberado na forma de sulfato; em seguida, ocorreriam duas transferências intramoleculares de um elétron do cofator molibdênio para o Fe do grupamento heme e deste para o citocromo c , acceptor final de elétrons externo à proteína. Esse “caminho” dos elétrons durante as transferências intramoleculares seria potencialmente facilitado por uma mudança conformacional no domínio de ligação

entre os monômeros, aproximando o domínio do cofator molibdênio do grupamento heme, evitando, dessa forma, o vazamento de elétrons para o espaço intermembranas [7].

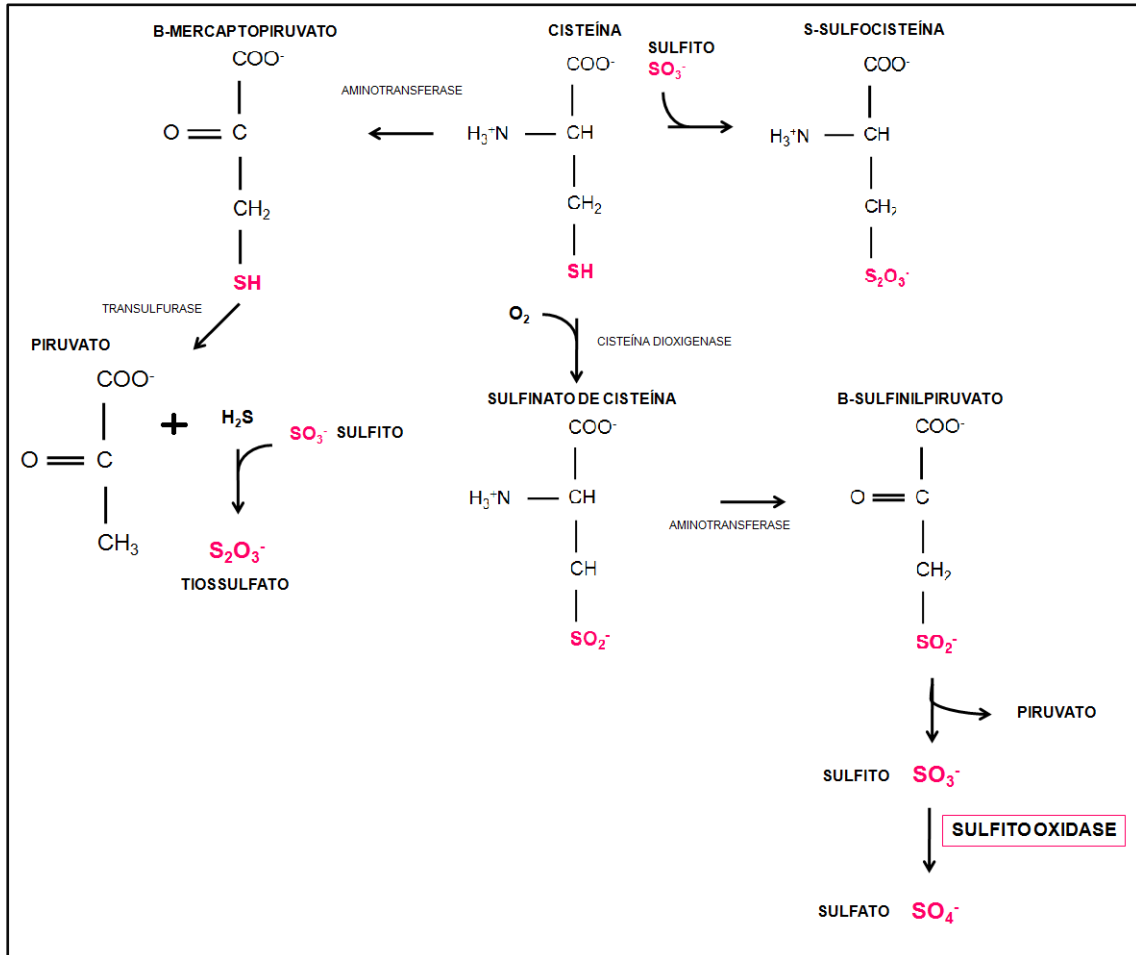


Figura 3. Via de catabolismo da cisteína. Adaptado de Johnson JL, Duran M. The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases, capítulo 128: Molybdenum Cofactor Deficiency and Isolated Sulfite Oxidase Deficiency.

I.1.3 Deficiência da sulfito oxidase (SO)

A deficiência da SO é um EIM de caráter autossômico recessivo que pode se manifestar sob duas formas: como uma deficiência isolada da enzima SO ou como uma deficiência causada pela falta do cofator molibdênio. A deficiência isolada da SO é causada por mutações no gene *SUOX*, que codifica a proteína da enzima, levando à

síntese de uma proteína defeituosa com pouca ou nenhuma atividade enzimática, sendo posteriormente degradada. Por outro lado, a deficiência do cofator molibdênio é decorrente de mutações nos genes que codificam as enzimas envolvidas na biossíntese da molécula de molibdopterina (genes *MOCS1*, *MOCS2*, *MOCS3* ou *GEPH*), prejudicando não só a atividade da SO, mas também das outras molibdoenzimas humanas xantina desidrogenase e aldeído oxidase [6].

I.1.3.1 Achados clínicos e laboratoriais

As duas formas da deficiência da SO têm sintomatologia similar, atribuindo-se os achados clínicos da deficiência do cofator molibdênio majoritariamente à deficiência da própria SO, sem consequências significativas dos defeitos da xantina desidrogenase e aldeído oxidase. A apresentação da deficiência da SO é principalmente neurológica, com a ocorrência de convulsões e hipotonia já nos primeiros dias de vida. Os pacientes também apresentam problemas respiratórios, dificuldades para se alimentar, retardo motor, atraso no desenvolvimento e subluxação do cristalino, podendo levar o indivíduo ao óbito. Quanto aos achados bioquímicos, a principal característica da doença é o acúmulo tecidual e a excreção urinária aumentada de sulfito, tiosulfato e S-sulfocisteína (Figura 3). No caso da deficiência do cofator molibdênio, além desses metabólitos, ainda são observados níveis urinários aumentados de taurina, xantina, hipoxantina e ácido úrico [9].

I.1.3.2 Achados neuropatológicos

Exames de imagem demonstram dilatação dos ventrículos, diminuição da substância branca, encefalomalácia cística, atrofia cerebral e edema [6, 10,11, 12]. Os pacientes também apresentam lesões corticais decorrentes de perda importante de

neurônios acompanhada de astrogliose e acúmulo de corpúsculos granulares de microglia, além de espongiose. Na substância branca é observada desmielinização juntamente com diminuição de axônios. Apesar de os principais danos estarem concentrados no córtex cerebral, anormalidades similares já foram encontradas nos gânglios basais e no cerebelo [9,13].

I.1.3.3 Diagnóstico e tratamento

Quando há suspeita clínica de deficiência da SO, o diagnóstico é realizado inicialmente pela detecção de sulfito na urina com o uso de uma fita indicadora, e pela pesquisa de S-sulfocisteína e tiosulfato, produtos de reações diretas do sulfito com cisteína e mercaptopiruvato, respectivamente. Considerando-se as variações na dieta, no catabolismo e produção de creatinina de cada paciente, a proporção em que os metabólitos se encontram alterados pode variar sensivelmente. Outro viés desse teste é que nem sempre o teste da fita indicadora funciona, uma vez que o sulfito oxida rapidamente quando exposto ao ar, produzindo falsos negativos. Devido a isso, devem ser utilizadas técnicas mais sensíveis, como a espectrometria de massas *in tandem* ou quantificação por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), para detectar os outros metabólitos, em especial a S-sulfocisteína, que é mais estável que o sulfito.

Para o diagnóstico diferencial da deficiência isolada da SO e da deficiência do cofator molibdênio são avaliadas as concentrações plasmáticas e urinárias de xantina, hipoxantina e ácido úrico, alteradas apenas na deficiência do cofator [9]. A confirmação pode ser feita através da medida da atividade da SO em cultivo de fibroblastos da pele dos pacientes e/ou por análise mutacional [6, 14, 15]. O diagnóstico pré-natal também é possível pela medida da atividade da SO em células amnióticas, ou através de análise mutacional pré-natal [9, 16, 17].

O tratamento foca, principalmente, no controle dos sintomas, sobretudo das convulsões. O paciente também passa a ter restrição proteica na dieta visando diminuir o aporte de cisteína e metionina. Outras tentativas focam na administração de compostos que reagem com sulfito, impedindo a sua interação com moléculas endógenas, porém ainda são necessários mais estudos na área, pois há dificuldades em se atingir concentrações farmacológicas eficientes para tais compostos [9].

Trabalhos já demonstraram eficácia no tratamento da deficiência do cofator molibdênio tipo A, que é causada pela deficiência da enzima MOCS1AB [18]. O tratamento consiste na infusão de piranopterina cíclica monofosfato (cPMP), que é o produto da MOCS1AB, fornecendo assim o substrato para a biossíntese do cofator molibdênio um passo adiante do bloqueio [19, 20, 21]. Foi mostrado que esse tratamento melhorou os sintomas de pacientes que já apresentavam dano neurológico, desacelerando a progressão da doença, ao passo que pacientes que iniciaram a administração de cPMP antes do aparecimento dos sintomas tiveram um melhor desenvolvimento a longo prazo. Além disso, já existe a perspectiva de novas terapias baseadas no uso de nanopartículas de trióxido de molibdênio direcionadas para a mitocôndria, que possuem atividade catalítica semelhante à da SO [22].

I.1.4 Neurotransmissão glutamatérgica

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos [23] e está presente em concentrações que podem ser de 1.000 a 10.000 vezes maior que as concentrações de outros importantes neurotransmissores, como, por exemplo, serotonina, noradrenalina e dopamina [24]. A neurotransmissão glutamatérgica age em diferentes regiões cerebrais, nas quais até 50-80% dos neurônios são glutamatérgicos. Além disso, a neurotransmissão glutamatérgica desempenha um

importante papel na cognição, formação e evocação da memória, aprendizado, manutenção da consciência, movimento, sensações (como dor e gustação), plasticidade celular, diferenciação e morte celular [24, 25].

Quando o glutamato é liberado na fenda sináptica, o sinal desencadeado vai depender do receptor ao qual ele irá se ligar. Nesse contexto, existem dois grandes grupos de receptores para glutamato: receptores ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos (mGluR). Os receptores iGluR são canais iônicos organizados na forma de heteromultímeros, cuja composição determina a seletividade para íons Na^+ , Ca^{2+} e K^+ e incluem o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e receptor de cainato [24]. Os receptores mGluR, por sua vez, são acoplados à proteína G e induzem resposta pela ativação intracelular de segundos mensageiros, como inositol trifosfato (IP3) e adenosina monofosfato cíclico (cAMP) [26]. Ambas as famílias de receptores regulam mecanismos importantes em sinapses excitatórias e inibitórias e agem tanto nos terminais pré- como pós-sinápticos [24].

Para o funcionamento correto de todos esses processos fisiológicos coordenados pela sinalização glutamatérgica, as concentrações de glutamato no espaço extracelular (em especial, na fenda sináptica) devem ser finamente controladas. O glutamato não é metabolizado no espaço extracelular e, portanto, para que ele seja adequadamente reciclado ou neutralizado, deve ser importado para a célula [23]. A captação celular de glutamato é realizada pelos seguintes transportadores de glutamato dependentes de Na^+ : transportador de glutamato-aspartato 1 (GLAST1); transportador de glutamato 1 (GLT-1); carreador de aminoácidos excitatórios 1 (EAAC1); e os transportadores de aminoácidos excitatórios 4 e 5 (EAAT 4 e 5) [27, 28]. O GLAST1 está presente em astrócitos de todas as regiões do cérebro, e é considerado o mais importante

transportador de glutamato no cerebelo e em regiões do sistema nervoso periférico, sendo frequentemente co-expresso com GLT-1. Já o GLT-1 é o transportador mais abundante do SNC, encontrado em astrócitos e, em menor proporção, em alguns neurônios hipocámpais. O EAAC1, expresso somente em neurônios, encontra-se constitutivamente por todo o cérebro e é concentrado nos dendritos e no soma das células neuronais. Por outro lado, EAAT4 se localiza predominantemente nas células de Purkinje do cerebelo, com algumas raras populações em outras regiões cerebrais, ao passo que o EAAT5 é encontrado quase que exclusivamente na retina. Tanto o EAAT4 quanto o EAAT5 são transportadores de glutamato pouco eficientes, sendo sugerido que eles atuariam principalmente como receptores inibitórios [28, 29].

O glutamato, ao ser captado pelos transportadores, pode ser usado para a síntese de glutamina ou de α -cetoglutarato. Nos astrócitos, a glutamina sintetase conjuga o glutamato com uma molécula de amônia, formando a glutamina. Visto que a glutamina não tem atividade neurotransmissora, ela pode ser liberada “com segurança” para o espaço extracelular e, em seguida, captada pelos neurônios, onde é novamente convertida a glutamato pela glutaminase. Esse processo é conhecido como o ciclo glutamato-glutamina. Por outro lado, o glutamato pode ser convertido em α -cetoglutarato, tanto pela glutamato desidrogenase como por transaminases, e usado para reciclagem do glutamato em neurônios, ou utilizado para produção de energia pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

A manutenção da homeostase glutamatérgica é particularmente importante devido à excitotoxicidade induzida por glutamato. Esse fenômeno ocorre quando há uma exacerbação na sinalização glutamatérgica, ou seja, há muito mais moléculas de glutamato se ligando a receptores do que seria necessário, o que geralmente ocorre por falha na recaptação desse aminoácido. Dessa forma, pela ativação dos receptores,

crecem os níveis de Ca^{2+} intracelulares que, se não forem controlados, podem desencadear diversos eventos tóxicos à célula, incluindo aumento de espécies reativas, aumento não fisiológico do consumo de energia e, finalmente, morte celular. Estudos sugerem que a excitotoxicidade pode, pelo menos em parte, contribuir para os danos encontrados em patologias do SNC, como as doenças de Alzheimer [30] e de Parkinson [31], esquizofrenia [32], esclerose lateral amiotrófica [33], autismo [34], doença de Huntington [35], epilepsia, dentre outras [36, 37].

I.1.5 Radicais livres e espécies reativas

Radicaís livres são pequenas moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados que são capazes de existir de maneira independente. Essas moléculas podem ser formadas tanto pela perda como pelo ganho de um elétron por parte de um não-radical, bem como a partir de um processo denominado fissão homolítica, em que a ligação covalente entre dois átomos é desfeita e um dos átomos permanece com um elétron do par anteriormente compartilhado [38].

Devido ao desequilíbrio energético resultante do desemparelhamento dos elétrons, radicaís livres são altamente reativos e interagem facilmente com outros compostos não-radicaís. Quando isso ocorre, outro radical livre pode ser formado, que, por sua vez, pode gerar um novo radical livre e assim sucessivamente. Sendo assim, um único radical livre pode iniciar uma cadeia de reações redox resultando na formação de novos radicaís livres [38, 39].

O termo espécies reativas engloba não apenas os radicaís livres, mas também outras moléculas com alta reatividade que não possuem elétrons desemparelhados nos seus orbitais externos. As duas principais classes de espécies reativas são as de oxigênio (espécies reativas de oxigênio – ERO) e as de nitrogênio (espécies reativas de

nitrogênio – ERN). Os principais representantes de cada classe estão listados na tabela 1 [39].

Tabela 1. Representação das principais espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN). Adaptado de Bergendi, L. et al., Chemistry, physiology and pathology of free radicals, Life Sciences, Vol. 65, pp. 1865-1874, 1999.

Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Hidroxila $\cdot\text{OH}$
Peróxido de hidrogênio H_2O_2
Ânion superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$

Espécies reativas de nitrogênio (ERN)

Peroxinitrito ONOO^-
Óxido nítrico $\cdot\text{NO}$

Algumas espécies reativas são produtos normais do metabolismo celular. Por exemplo, durante a transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, uma pequena parte do oxigênio (em torno de 2 %) é apenas parcialmente reduzido devido ao vazamento de elétrons, originando ERO como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila [40, 41]. Radicais livres também podem ser produzidos em grandes quantidades por determinadas células. Esse é o caso de células fagocíticas do sistema imune que expressam a enzima NADPH oxidase, a qual produz radical superóxido com o objetivo de eliminar patógenos.

I.1.6 Defesas antioxidantes

As células possuem defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas para eliminar as espécies reativas, já que essas moléculas são produzidas normalmente durante o metabolismo celular e podem ser tóxicas devido à sua alta reatividade. Dentre as defesas antioxidantes enzimáticas, podem ser citadas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx), que atuam diretamente sobre as ERO; e as enzimas glutathione reductase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), que tem papel fundamental na reciclagem de moléculas importantes para as defesas antioxidantes (GSH e NADPH, respectivamente). As defesas não-enzimáticas incluem moléculas que neutralizam ERO e ERN por interação direta, sem a necessidade de atividade enzimática, tais como a glutathione reduzida (GSH) e as vitaminas α -tocoferol e ácido ascórbico, ou moléculas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, como a transferrina que liga íons ferro [38].

I.1.7 Estresse oxidativo

À medida que as espécies reativas são geradas na célula, os sistemas antioxidantes as metabolizam, de modo a manter o estado redox normal do meio. No entanto, certas condições patológicas podem levar a uma produção exacerbada de espécies reativas ou a uma diminuição nas defesas antioxidantes, ou ambas, causando um quadro de desequilíbrio denominado estresse oxidativo.

Quando esse desequilíbrio é apenas moderado e as células conseguem lidar com ele, ocorre a chamada resposta adaptativa ao estresse oxidativo, o que geralmente induz aumento nas defesas antioxidantes a fim de restaurar o equilíbrio redox. Entretanto, se o desequilíbrio for grave, as defesas antioxidantes não serão suficientes e as espécies

reativas oxidarão componentes importantes para a homeostase celular, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Dependendo da gravidade do dano, pode haver até mesmo a morte celular (por apoptose ou necrose) [38].

I.2 JUSTIFICATIVA

Pacientes acometidos pela deficiência da SO apresentam alterações cerebrais graves e debilitantes, cujos patomecanismos ainda não foram totalmente esclarecidos. Nesse sentido, têm sido investigados os potenciais efeitos deletérios dos metabólitos acumulados na doença, em especial o sulfito e tiosulfato. Diversos trabalhos já demonstraram que eles são neurotóxicos, uma vez que podem prejudicar o tamponamento energético intracelular e induzir estresse oxidativo por gerar espécies reativas, promover lipoperoxidação e comprometer as defesas antioxidantes em cérebro de ratos [42 – 49]. Também já foram verificadas alterações no conteúdo dos receptores NMDA em ratos submetidos a um modelo da deficiência da SO, o que pode estar associado com indução de excitotoxicidade, hipótese reforçada pela semelhança química entre a S-sulfocisteína e o glutamato, agonista clássico dos receptores NMDA [50, 51, 52]. Dessa forma, ressalta-se a importância de estudar mais detalhadamente os efeitos do sulfito e do tiosulfato sobre parâmetros de neurotransmissão glutamatérgica, dano oxidativo e defesas antioxidantes a fim de esclarecer a fisiopatologia do dano cerebral observado na deficiência da SO.

I.3 OBJETIVOS

I.3.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos *in vitro* do sulfito e do tiosulfato sobre parâmetros de neurotransmissão glutamatérgica e homeostase redox em córtex cerebral de ratos.

I.3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do sulfito e do tiosulfato sobre a captação de glutamato dependente de sódio em fatias de córtex cerebral de ratos;

- Estudar os efeitos do sulfito e do tiosulfato sobre a atividade da enzima glutamina sintetase em homogeneizado obtido de fatias de córtex cerebral de ratos;

- Avaliar os efeitos do sulfito e do tiosulfato sobre os parâmetros de dano oxidativo medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), formação de carbonilas e conteúdo total de grupamentos sulfidril em homogeneizado obtido de fatias de córtex cerebral de ratos;

- Investigar os efeitos do sulfito e do tiosulfato sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) e sobre as atividades das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR), glutathiona S-transferase (GST) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em homogeneizado obtido de fatias de córtex cerebral de ratos.

- Estudar os efeitos do sulfito sobre a liberação de lactato desidrogenase em homogeneizado obtido de fatias de córtex cerebral de ratos.

- Estudar os efeitos do sulfito sobre redução de MTT em fatias de córtex cerebral de ratos.

PARTE II

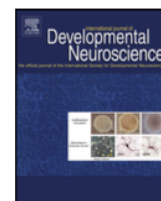
Capítulo I

In vitro evidence that sulfite impairs glutamatergic neurotransmission and inhibits glutathione metabolism-related enzymes in rat cerebral cortex.

Belisa Parmeggiani, Alana Pimentel Moura, Mateus Grings, Anna Paula Bumbel,
Leonardo de Moura Alvorcem, Julia Tauana Pletsch, Carolina Gonçalves Fernandes,
Angela TS Wyse, Moacir Wajner, Guilhian Leipnitz.

Artigo científico publicado no periódico International Journal of Developmental Neuroscience

2015 May;42:68-75. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2015.03.005.



In vitro evidence that sulfite impairs glutamatergic neurotransmission and inhibits glutathione metabolism-related enzymes in rat cerebral cortex



Belisa Parmeggiani^a, Alana Pimentel Moura^a, Mateus Grings^a, Anna Paula Bumbel^a, Leonardo de Moura Alvorcem^a, Julia Tauana Pletsch^a, Carolina Gonçalves Fernandes^a, Angela TS Wyse^a, Moacir Wajner^{a,b}, Guilhian Leipnitz^{a,*}

^a 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

^b Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 – CEP, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2015

Received in revised form 11 March 2015

Accepted 11 March 2015

Available online 13 March 2015

Keywords:

Sulfite oxidase deficiency

Sulfite

Thiosulfate

Glutamatergic neurotransmission

Redox homeostasis

Rat cerebral cortex

ABSTRACT

Sulfite oxidase (SOX) deficiency is an inherited neurometabolic disorder biochemically characterized by tissue accumulation and high urinary excretion of sulfite and thiosulfate. Affected patients present severe neurological dysfunction accompanied by seizures, whose pathophysiology is poorly known. In the present study we evaluated the *in vitro* effects of sulfite and thiosulfate on important parameters of glutamatergic neurotransmission and redox homeostasis in rat cerebral cortex slices. We verified that sulfite, but not thiosulfate, significantly decreased glutamate uptake when cerebral cortex slices were exposed during 1 h to these metabolites. We also observed that thiosulfate inhibited glutamine synthetase (GS) activity. A pronounced trend toward GS inhibition induced by sulfite was also found. Regarding redox homeostasis, sulfite, at the concentration of 10 μ M, increased thiobarbituric acid-reactive substances and decreased glutathione concentrations after 1 h of exposure. In contrast, thiosulfate did not alter these parameters. We also found that 500 μ M sulfite increased sulfhydryl group content in rat cerebral cortex slices and increased GSH levels in a medium containing oxidized GSH (GSSG) and devoid of cortical slices, suggesting that sulfite reacts with disulfide bonds to generate sulfhydryl groups. Moreover, sulfite and thiosulfate did not alter the activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) after 1 h of incubation. However, sulfite inhibited the activities of GPx, GST and G6PDH when cortical slices were exposed for 3 h to sulfite. We finally verified that sulfite did not induce cell death after 1 h of incubation. Our data show that sulfite impairs glutamatergic neurotransmission and redox homeostasis in cerebral cortex. Therefore, it may be presumed that these pathomechanisms contribute, at least in part, to the seizures observed in patients affected by SOX deficiency.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: SOX, sulfite oxidase; GS, glutathione synthetase; TBA-RS, thiobarbituric acid-reactive substances; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GST, glutathione S-transferase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; DNPH, 2,4-dinitrophenylhydrazine; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; DTNB, 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid); GSSG, oxidized glutathione; LDH, lactate dehydrogenase; GLAST, glutamate/aspartate transporter; GLT1, glutamate transporter 1; EAAC1, excitatory amino acid carrier 1.

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 5551; fax: +55 51 3308 5540.

E-mail address: guilhian@ufrgs.br (G. Leipnitz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.03.005>
0736-5748/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Sulfite oxidase (SOX) deficiency is a debilitating disease caused either by a mutation in the gene encoding the enzyme protein (isolated SOX deficiency) or by defects in the pathway that synthesizes its molybdopterin cofactor (molybdenum cofactor deficiency). SOX catalyzes the oxidation of sulfite to sulfate, the final step in the pathway of degradation of the sulfur-containing amino acids cysteine and methionine (Johnson and Duran, 2001; Schwarz et al., 2009). Sulfite may also be derived from exogenous sources, such as sulfite-preserving agents that are used as food and medication preservatives (Taylor et al., 1986). Both forms of SOX deficiency (isolated SOX

deficiency and molybdenum cofactor deficiency) are biochemically characterized by an abnormal tissue accumulation and high urinary excretion of sulfite, thiosulfate and cysteine-S-sulfate. Patients with the cofactor deficiency additionally present increased levels of xanthine and hypoxanthine, since the enzyme xanthine dehydrogenase is also defective in this condition (Johnson and Duran, 2001; Schwarz et al., 2009).

The clinical presentation of SOX deficiency consists of severe neurological symptoms, including seizures and mental retardation that may lead to premature death (Bindu et al., 2011). Neuropathological analysis reveals severe encephalopathy with neuronal death and demyelination accompanied by gliosis and diffuse spongiosis in the cerebral cortex. Marked atrophy of the basal ganglia and thalami, and dilated brain ventricles are also reported in MRI (Basheer et al., 2007; Dublin et al., 2002; Johnson and Duran, 2001).

Previous reports showed that the accumulating metabolites in SOX deficiency are neurotoxic. In this context, a modulation of NMDA receptor subunits was demonstrated in hippocampus of SOX-deficient rats fed with sulfite (Oztürk et al., 2006). Other studies suggested that cysteine-S-sulfate could induce excitotoxicity due to its chemical similarity to glutamate (Salman et al., 2002; Tan et al., 2005). Previous data verified that sulfite and thiosulfate markedly inhibit the activity of the enzyme creatine kinase, whereas sulfite also causes brain mitochondrial dysfunction (Grings et al., 2013; Zhang et al., 2004). In addition, sulfite generates reactive oxygen species (ROS) via autooxidation reactions leading to lipid peroxidation and impairment of antioxidant defenses in rat brain (Chiarani et al., 2008; Kocamaz et al., 2012; Küçükay et al., 2005; Niknahad and O'Brien, 2008; Ozsoy et al., 2014).

Considering that the mechanisms involved in the brain injury observed in SOX deficiency are still unclear and that practically nothing has been studied concerning glutamatergic neurotransmission, the present study evaluated the *in vitro* effects of sulfite and thiosulfate on glutamate uptake, glutamine synthetase (GS) activity, thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) levels, glutathione (GSH) concentrations, sulfhydryl content, carbonyl formation and the activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). The effect of sulfite on cell viability and integrity were also determined. These parameters were analyzed in rat cerebral cortex slices, which consist in a system with preserved cell machinery, including enzymes, as well as glutamate transporters and receptors.

2. Experimental procedures

2.1. Chemicals

Reagents were mainly purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, except for [³H]glutamate (49.6 Ci/mmol), which was obtained from PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, USA).

2.2. Animals

Thirty-day-old Wistar rats obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil, were used. The animals had free access to water and 20% (w/w) protein commercial chow (SUPRA, Porto Alegre, RS, Brazil) and were maintained on a 12:12 h light/dark cycle in an air conditioned constant temperature (22 °C ± 1 °C) colony room. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of UFRGS, Porto Alegre, Brazil, and followed the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH

Publications No. 80–23, revised 1978). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

2.3. Sample preparation for glutamatergic system and MTT reduction evaluation

Animals were euthanized by decapitation, the brain was immediately removed and sliced using a McIlwain tissue chopper. The slices (400 μm) were submerged in Na⁺-free medium for the measurement of glutamate uptake; in Krebs-bicarbonate buffer, pH 7.4, for GS activity determination; or in HBSS for MTT reduction assay. Then, cerebral cortex slices were isolated, transferred to a 48-well plate (one slice per well) and incubated with sulfite or thiosulfate (10–500 μM) at 37 °C during 1 h. After incubation, the slices were used for glutamate uptake determination and MTT reduction or homogenized in 200 μL of Krebs-bicarbonate buffer to measure GS activity.

2.4. Sample preparation for oxidative stress parameters evaluation

Rats were euthanized, had their brain quickly removed and placed on an ice plate. Cerebral cortex was dissected and sliced with a McIlwain tissue chopper. Approximately 60–75 mg of cortical slices (300 μm) were placed in each well of a 48-well plate and incubated with sulfite or thiosulfate (10–500 μM) at 37 °C for 1 h. After incubation, the slices were homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of Krebs-bicarbonate buffer, pH 7.4. Homogenates were centrifuged at 750 × g for 10 min at 4 °C to discard nuclei and cell debris (Evelson et al., 2001). The pellet was discarded and the supernatant separated to evaluate the biochemical parameters.

2.5. Glutamate uptake

Glutamate uptake experiments were carried out in the presence of high Na⁺ concentrations, which favor glutamate binding to high-affinity uptake carriers (Almeida et al., 2010; Frizzo et al., 2002). We used Hank's buffered salt solution (HBSS) containing 137 mM NaCl, 0.63 mM Na₂HPO₄, 4.17 mM NaHCO₃, 5.36 mM KCl, 0.44 mM KH₂PO₄, 1.26 mM CaCl₂, 0.40 mM MgSO₄, 0.50 mM MgCl₂, and 5.5 mM glucose, pH 7.2, for measuring this uptake. After the incubation of cortical slices in the presence of the metabolites, we added 0.33 μCi/mL [³H]glutamate and 100 μM nonradioactive glutamate. The reaction was stopped after 7 min with five ice-cold washes with 1 mL HBSS and solubilized overnight with 200 μL of 0.5 M NaOH. Na⁺-independent uptake was determined by using *N*-methyl-D-glucamine instead of sodium chloride. Na⁺-dependent uptake was calculated as the difference between glutamate uptakes measured in the medium containing Na⁺ and in the medium containing *N*-methyl-D-glucamine (Frizzo et al., 2002). The radioactivity incorporated was determined in a Wallac 1409 liquid scintillation counter. Results are expressed in nmol/mg of protein.

2.6. Glutamine synthetase (GS) activity

GS activity was determined in homogenates obtained from cortical slices after incubation as previously described (Olney, 1969). One hundred microliters of homogenate were added to a reaction mixture containing 50 mM imidazole buffer, pH 6.8, 100 mM glutamine, 50 mM hydroxylamine, 25 mM sodium arsenate, 2 mM MgCl₂ and 0.2 mM ADP and incubated for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by the addition of a solution containing 370 mM ferric chloride, 100 mM HCl and 50 mM trichloroacetic acid. After centrifugation, the absorbance of the supernatant was measured at 540 nm and compared to a calibration curve of

Table 1
Effect of sulfite and thiosulfate on carbonyl formation in rat cerebral cortex slices.

	Protein carbonyl formation				
	Control	10 μ M	50 μ M	100 μ M	500 μ M
Sulfite	96.4 \pm 8.06	99.4 \pm 10.7	101 \pm 9.64	95.3 \pm 8.74	95.5 \pm 6.88
Thiosulfate	125 \pm 7.85	122 \pm 2.80	122 \pm 3.67	121 \pm 6.16	124 \pm 8.93

Cerebral cortex slices were exposed to sulfite and thiosulfate for 1 h. Results are presented as mean \pm standard deviation for six independent experiments (animals) and are expressed as nmol of carbonyl groups/mg of protein. No significant differences were observed (one-way ANOVA).

γ -glutamylhydroxamate treated with ferric chloride reagent. Results were expressed in μ mol/mg of protein/h.

2.7. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS levels were measured according to the method described by Yagi (1998) with slight modifications. Briefly, 200 μ L of 10% trichloroacetic acid and 300 μ L of 0.67% thiobarbituric acid in 7.1% sodium sulfate were added to 100 μ L of tissue supernatants containing 0.10–0.30 mg of protein and incubated for 1 h in a boiling water bath. The mixture was allowed to cool on running tap water for 5 min. The resulting pink-stained complex was extracted with 400 μ L of butanol. Fluorescence of the organic phase was read at 515 nm and 553 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane and subjected to the same treatment as supernatants. TBA-RS levels were calculated as nmol TBA-RS/mg protein.

2.8. Protein carbonyl formation

We measured protein carbonyl formation by spectrophotometric assay (Reznick and Packer, 1994) with some modifications. One hundred microliters of supernatants containing approximately 0.15 mg of protein were treated with 200 μ L of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) dissolved in 2.5 N HCl or with 2.5 N HCl (blank) and left in the dark for 1 h. The proteins present in the samples were then precipitated with 500 μ L of 20% TCA and centrifuged for 5 min at 10,000 \times g. The pellet was suspended in 300 μ L of 6 M guanidine prepared in 2.5 N HCl. The difference between the DNPH-treated and HCl-treated samples (blank) was used to calculate the carbonyl content determined at 365 nm. The results were calculated as nmol carbonyl groups/mg protein, using the extinction coefficient of 22,000 M⁻¹ cm⁻¹ for aliphatic hydrazones.

2.9. Reduced glutathione (GSH) concentrations

GSH concentrations were measured according to Browne and Armstrong (1998) with slight modifications. One hundred and eighty-five microliters of 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 15 μ L of *o*-phthalaldehyde (1 mg/mL) were added to 30 μ L of sample (0.03–0.05 mg of protein) previously deproteinized with metaphosphoric acid. This mixture was incubated at room temperature in a dark room for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 nm and 420 nm, respectively. Calibration curve was prepared with standard GSH (0.001–1 mM) and the concentrations were calculated as nmol GSH/mg protein.

We also tested whether sulfite could alter the redox state of a commercial solution of GSSG (200 μ M) by exposing this solution to 500 μ M sulfite for 60 min in a medium devoid of brain supernatants. *N*-Ethylmaleimide (250 μ M), a classical oxidant of sulfhydryl groups, was used as a positive control. After sulfite exposition, 7.4 mM *o*-phthalaldehyde (1 mg/mL) was added to the

wells (96-well plate) and the mixture was incubated at room temperature during 15 min.

2.10. Sulfhydryl content

This assay is based on the reduction of 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm (Aksenov and Markesbery, 2001). Briefly, 30 μ L of 10 mM DTNB and 980 μ L of PBS were added to 50 μ L of tissue supernatants containing 0.1 mg of protein. This was followed by a 30 min incubation at room temperature in a dark room. Absorption was measured at 412 nm. Sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were calculated and expressed as nmol/mg protein.

2.11. Glutathione S-transferase (GST) activity

The activity of GST was measured according to Mannervik and Guthenberg (1981) with slight modifications. GST activity was measured by the rate of formation of dinitrophenyl-S-glutathione at 340 nm in a medium containing 50 mM potassium phosphate, pH 6.5, 1 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate, and tissue supernatants (approximately 0.045 mg of protein). The results were calculated and expressed as U/mg protein.

2.12. Glutathione reductase (GR) activity

GR activity was measured according to Carlberg and Mannervik (1985) using oxidized glutathione (GSSG) and NADPH as substrates. The enzyme activity was determined by monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium with 200 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, containing 6.3 mM EDTA, 1 mM GSSG, 0.1 mM NADPH and tissue supernatants (approximately 0.065 mg of protein). The results were calculated and expressed as U/mg protein.

2.13. Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was measured using *tert*-butylhydroperoxide as substrate (Wendel, 1981). The enzyme activity was determined by monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium containing 100 mM potassium phosphate buffer/1 mM EDTA, pH 7.7, 2 mM GSH, 0.1 U/mL GR, 0.4 mM azide, 0.5 mM *tert*-butyl hydroperoxide, 0.1 mM NADPH and tissue supernatants (approximately 0.065 mg of protein). The results were calculated and expressed as U/mg protein.

2.14. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity

G6PDH activity was measured by the method of Leong and Clark (1984) in a reaction mixture containing 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺ and tissue supernatants (approximately 0.035 mg of protein). The reaction was started by the addition of 1 mM glucose-6-phosphate and was followed in a spectrophotometer at 340 nm. The results were calculated and expressed as U/mg protein.

2.15. MTT reduction

Cell viability was determined in cerebral cortex slices exposed to sulfite or thiosulfate at 37 °C for 1 h by measuring the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to a dark violet formazan product (Mosmann, 1983). After pre-incubation, the slices were washed twice with 500 μ L HBSS. MTT reduction assay was performed in plates containing 300 μ L HBSS and the reaction was started with the addition of 0.5 mg mL⁻¹ MTT. After 45 min incubation at 37 °C the medium was removed and the slices were submerged in dimethyl sulphoxide in order to extract the colored formazan product. This colored product was measured spectrophotometrically at a wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 630 nm. Results were compared to control samples to which 100% viability was attributed.

2.16. Lactate dehydrogenase (LDH) assay

LDH is a cytosolic enzyme that is released from cell upon membrane integrity loss. After different treatments, LDH activity (reduction of pyruvate to lactate in the presence of NADH, which is oxidized to NAD⁺) was evaluated in the culture medium using a fluorimetric assay. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 366 nm and 450 nm, respectively.

3. Results

First, we evaluated the *in vitro* effects of sulfite and thiosulfate on [³H] glutamate uptake and GS activity in rat cerebral cortex slices exposed during 1 h to these compounds. It can be observed in Fig. 1 that sulfite, but not thiosulfate, significantly reduced glutamate uptake [$F_{(3,16)} = 4.277$; $P < 0.05$]. We also verified that thiosulfate inhibited GS activity [$F_{(3,21)} = 5.054$; $P < 0.05$] (Fig. 2). Furthermore, there is a statistical trend toward significance that sulfite also inhibits the activity of GS [$F_{(3,14)} = 2.328$; $P = 0.119$] (Fig. 2).

We also investigated the effect of the exposition of sulfite and thiosulfate during 1 h on TBA-RS levels and carbonyl formation in rat cerebral cortex. Our results demonstrate that sulfite significantly increased TBA-RS levels at the concentration of 10 μ M [$F_{(4,35)} = 3.956$; $P < 0.01$], whereas higher concentrations of this compound (50–500 μ M) and thiosulfate did not alter this parameter (Fig. 3). Moreover, sulfite and thiosulfate did not alter carbonyl formation (Table 1).

Then, we determined the effects of sulfite and thiosulfate on antioxidant defenses. We found that sulfite, only at 10 μ M, decreased GSH concentrations [$F_{(5,29)} = 12.306$; $P < 0.001$], whereas the other concentrations of this metabolite (50–500 μ M) and thiosulfate did not significantly alter this parameter when cortical slices were exposed during 1 h to these compounds (Fig. 4).

The next set of experiments was performed to evaluate the ability of sulfite to react with disulfide bonds to generate thiol groups. We first determined whether sulfite could reduce GSSG to GSH by measuring GSH levels after exposing a solution of 200 μ M GSSG to 500 μ M sulfite in a medium devoid of cerebral cortex slices. Table 2 demonstrates that sulfite significantly increased GSH levels in this medium. We also tested the effect of 500 μ M sulfite on total sulfhydryl group content in rat cerebral cortex slices and verified that the metabolite significantly increased this parameter (Table 2). These data indicate that sulfite reacts with disulfide bonds to generate thiol groups.

Moreover, as it can be observed in Table 3, sulfite and thiosulfate did not alter the activities of the enzymes GPx, GR, GST and G6PDH after 1 h of incubation. We then evaluated the effect of sulfite on the same enzymatic antioxidant defenses after 3 h of exposure

Table 2

Effect of sulfite on glutathione (GSH) levels in a medium containing commercial oxidized glutathione (GSSG; 200 μ M) and on sulfhydryl group content in rat cerebral cortex.

GSH levels (FAU)	
200 μ M GSH	29562 \pm 2114.0
200 μ M GSSG	932.66 \pm 229.36***
200 μ M GSSG + 500 μ M Sulfite	27296 \pm 1881.3****
Sulfhydryl group content (nmol/mg of protein)	
Control	45.9 \pm 4.80
500 μ M Sulfite	99.2 \pm 12.3**

Values are means \pm standard deviation for five to six independent experiments performed in triplicate. GSH levels were measured in the absence of brain tissue. GSH levels: * $P < 0.05$. *** $P < 0.001$ compared to 200 μ M GSH. **** $P < 0.001$ compared to 200 μ M GSSG (Duncan multiple range test). Sulfhydryl group content: ** $P < 0.01$, compared to control (Paired-samples *T* test).

Table 3

Effect of sulfite and thiosulfate on the activities of glutathione-related metabolism in rat cerebral cortex slices.

	Sulfite				
	Control	10 μ M	50 μ M	100 μ M	500 μ M
GPx	11.0 \pm 2.34	11.1 \pm 1.30	11.6 \pm 1.48	11.2 \pm 1.78	11.1 \pm 1.23
GR	11.7 \pm 1.46	12.4 \pm 2.51	10.7 \pm 3.36	9.22 \pm 3.31	11.1 \pm 2.21
GST	30.2 \pm 6.86	26.4 \pm 2.49	28.2 \pm 4.6	33.5 \pm 6.51	29.8 \pm 6.47
G6PDH	12.7 \pm 1.23	13.8 \pm 1.97	13.8 \pm 1.58	14.8 \pm 2.15	15.2 \pm 2.39
	Thiosulfate				
	Control	10 μ M	50 μ M	100 μ M	500 μ M
GPx	10.8 \pm 1.95	11.7 \pm 2.55	10.7 \pm 1.57	10.9 \pm 3.44	11.4 \pm 2.66
GR	9.59 \pm 1.3	9.48 \pm 2.07	9.59 \pm 0.99	9.48 \pm 1.5	9.01 \pm 1.25
GST	25.2 \pm 6.89	20.7 \pm 3.21	21.7 \pm 5.05	20.2 \pm 2.88	21.0 \pm 4.6
G6PDH	13.7 \pm 1.44	11.7 \pm 2.18	13.4 \pm 2.14	12.6 \pm 1.99	11.1 \pm 1.87

Cerebral cortex slices were exposed to sulfite and thiosulfate for 1 h. Results are presented as mean \pm standard deviation for four to six independent experiments (animals) and are expressed as U/mg of protein. The activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione *S*-transferase (GST) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) were not significantly altered (one-way ANOVA).

and observed an inhibition of the activities of GPx [$F_{(4,34)} = 3.033$; $P < 0.05$], GST [$F_{(4,32)} = 2.989$; $P < 0.05$] and G6PDH [$F_{(4,22)} = 2.953$; $P < 0.05$] (Fig. 5). We finally examined the effect of sulfite on cell viability and integrity through MTT reduction and LDH release, respectively, in cerebral cortex slices after 1 h of incubation and verified that the metabolite did not alter these parameters (data not shown).

4. Discussion

SOX deficiency is an autosomal recessive disorder characterized by neurological dysfunction that frequently includes epilepsy, whose pathophysiology is not totally established. In this context, a previous report demonstrated that the accumulating metabolites alter NMDA receptor subunit expression in SOX-deficient rat hippocampus (Oztürk et al., 2006). It has also been shown that sulfite induces oxidative damage to lipids and decreases the concentrations of the crucial antioxidant GSH in rat tissues (Chiarani et al., 2008; Küçükataay et al., 2005; Ozsoy et al., 2014). However, more studies on the effects of sulfite and thiosulfate on glutamatergic system and GSH metabolism-related enzymes could contribute to explain the frequent seizures and other neurological symptoms observed in affected patients.

In the present study we demonstrate for the first time that sulfite reduces glutamate uptake in cerebral cortex, suggesting that this metabolite causes alterations of glutamate transporters localized in this brain region. Considering that the glial glutamate/aspartate

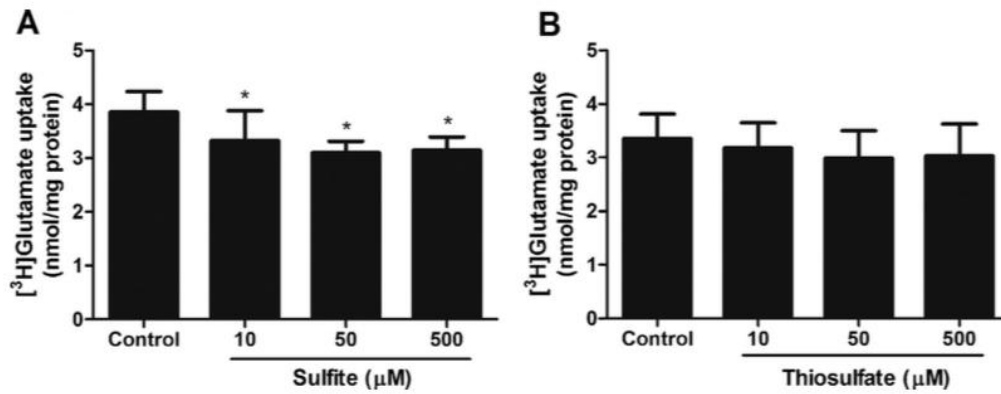


Fig. 1. Effect of sulfite (A) and thiosulfate (B) on [³H]glutamate uptake in cerebral cortex slices of young rats. Cerebral cortex slices were exposed to sulfite and thiosulfate for 1 h. Results are presented as mean ± standard deviation for five to six independent experiments (animals) and are expressed as nmol/mg protein. **P* < 0.05 compared to control (Duncan multiple range test).

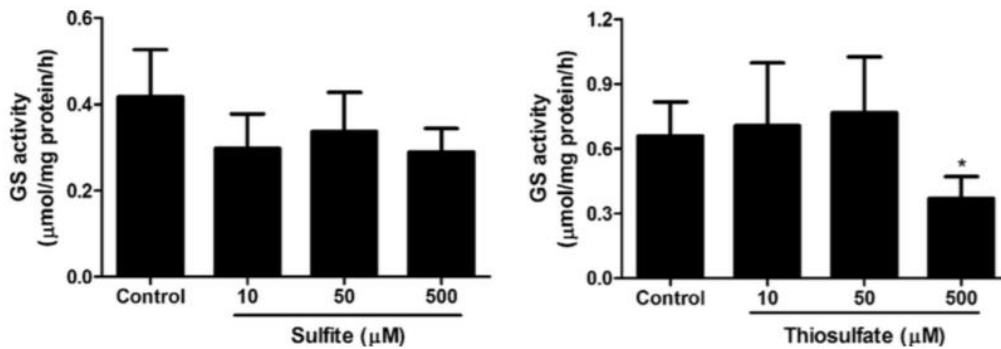


Fig. 2. Effect of sulfite (A) and thiosulfate (B) on glutamine synthetase (GS) activity in cerebral cortex slices of young rats. Cerebral cortex slices were exposed to sulfite and thiosulfate for 1 h. Results are presented as mean ± standard deviation for four to eight independent experiments (animals) and are expressed as μmol/mg protein/h. **P* < 0.05 compared to control (Duncan multiple range test).

transporter (GLAST) and glutamate transporter 1 (GLT1) and the neuronal glutamate transporter excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1) are present in our cerebral cortex preparations (Rosa et al., 2007), one or more of these transporters are the candidates to be the target of sulfite. We also verified that sulfite and thiosulfate inhibited GS activity. Since this enzyme is essential for the maintenance of the glutamate–glutamine cycle (Matés et al., 2002), it may be presumed that this cycle is being affected by these compounds. On the other hand, sulfite and thiosulfate did not alter cell viability and integrity, implying that their effects on glutamatergic system are not likely due to cell injury. Taken together, our data suggest that sulfite and thiosulfate disturb glutamatergic neurotransmission.

We also evaluated the effects of sulfite and thiosulfate on redox homeostasis parameters. Sulfite, at a low dose (10 μM), induced lipid peroxidation and decreased GSH concentrations, whereas higher doses of the same metabolite (50–500 μM) did not change these parameters. In contrast, sulfite and thiosulfate did not alter carbonyl formation. The biphasic effects exerted by sulfite on lipid peroxidation and GSH concentrations, pending on its concentrations, may be possibly explained by the fact that this metabolite is able to react with disulfide bonds to form thiol compounds (Robinson and Pasternak, 1964) that are antioxidants. In line with this, we verified that 500 μM sulfite increased sulfhydryl group content in rat cerebral cortex slices, and increased GSH levels in a medium containing GSSG and devoid of cortical slices,

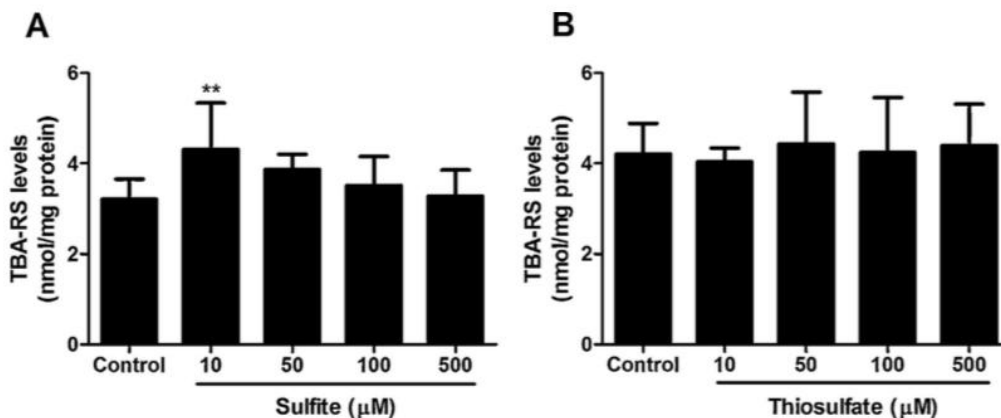


Fig. 3. Effect of sulfite (A) and thiosulfate (B) on thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) levels in cerebral cortex slices of young rats. Cerebral cortex slices were exposed to sulfite and thiosulfate for 1 h. Results are presented as mean ± standard deviation for five to eight independent experiments (animals) and are expressed as nmol TBA-RS/mg protein. ***P* < 0.01 compared to control (Duncan multiple range test).

confirming that sulfite reacts with disulfide bonds to generate sulfhydryl groups. Similar findings were demonstrated by [Niknahad and O'Brien \(2008\)](#) that reported an increase of GSH concentrations in cultured rat hepatocytes exposed to high concentrations of sulfite (millimolar range). So, it may be suggested that, in our experimental conditions, high doses of sulfite react with GSSG recycling this compound to GSH, leading to the restoration of the concentrations of this antioxidant to basal levels (control levels) and to the prevention of lipid peroxidation. However, we cannot rule out that other oxidative stress parameters not measured in the present study may be

altered by high doses of sulfite. Indeed, [Grings et al. \(2013\)](#) demonstrated that high concentrations of sulfite induce reactive species overproduction in rat brain. Concerning the sulfite-induced lipid oxidative damage and decrease of GSH levels at low doses, these effects are probably mediated by reactive species produced during sulfite autooxidation reactions ([Hayon et al., 1972](#)). This is in accordance with previous *in vitro* studies showing that sulfite disrupts redox homeostasis in different rat tissues ([Chiarani et al., 2008](#); [Küçükataay et al., 2005](#); [Niknahad and O'Brien, 2008](#); [Ozsoy et al., 2014](#)).

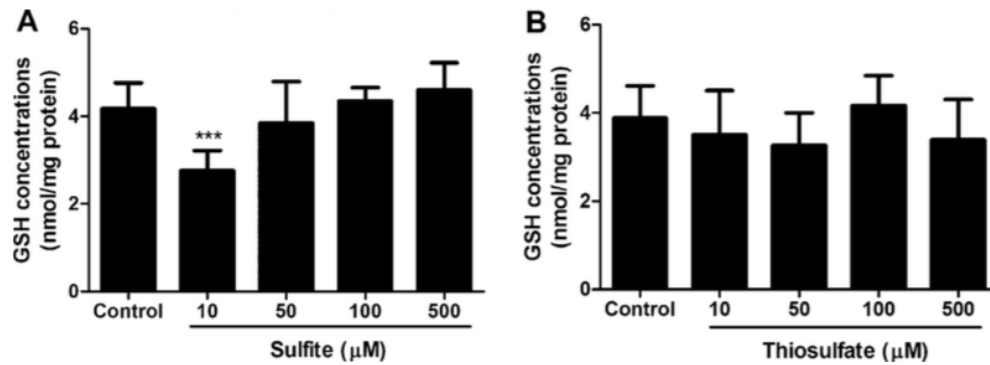


Fig. 4. Effect of sulfite (A) and thiosulfate (B) on reduced glutathione (GSH) concentrations in cerebral cortex slices of young rats. Cerebral cortex slices were exposed to sulfite and thiosulfate for 1 h. Results are presented as mean \pm standard deviation for five to six independent experiments (animals) and are expressed as nmol GSH/mg protein. *** $P < 0.001$ compared to control (Duncan multiple range test).

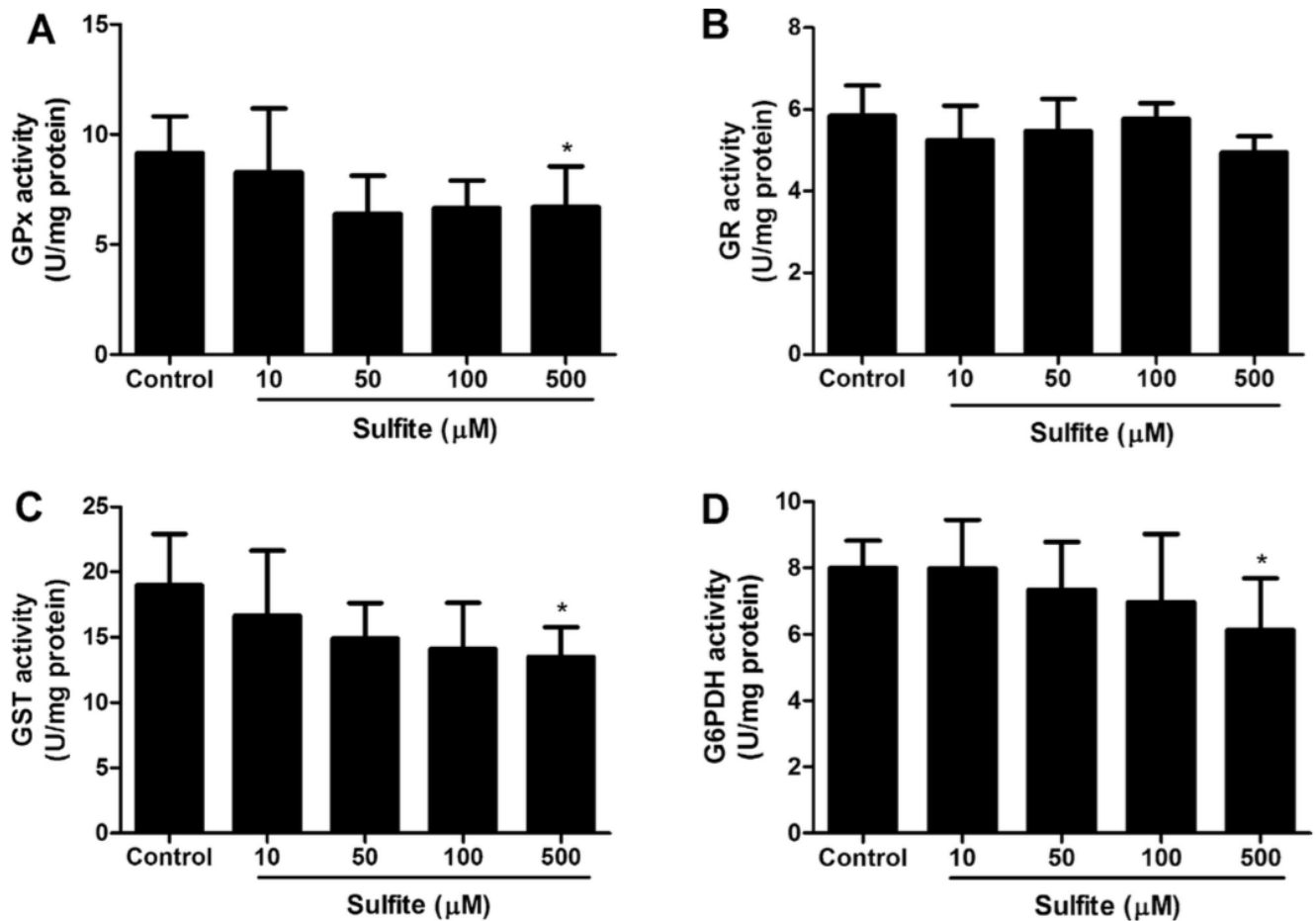


Fig. 5. Effect of sulfite on the activities of glutathione (GSH) metabolism-related enzymes in cerebral cortex slices of young rats. Cerebral cortex slices were exposed to sulfite and thiosulfate for 3 h. Values are mean \pm standard deviation for four to eight independent experiments (animals). (A) Glutathione peroxidase (GPx) activity (U/mg of protein); (B) Glutathione reductase (GR) activity (U/mg of protein); (C) Glutathione-S-transferase (GST) activity (U/mg of protein); (D) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity (U/mg of protein). * $P < 0.05$ compared to control (Duncan multiple range test).

The influence of sulfite and thiosulfate on the activity of antioxidant enzymes related to GSH metabolism was also studied. We did not find alterations on these enzyme activities when cortical slices were exposed to sulfite or thiosulfate during 1 h. Nevertheless, sulfite inhibited the activities of GPx, GST and G6PDH at a prolonged exposure of cerebral cortex to this compound. These inhibitory effects exerted by sulfite on the GSH-related enzymes could be attributed to reactive species attack causing a site-specific amino acid modification on the enzyme structure and leading to the impairment of cell enzymatic antioxidant defenses (Arenas et al., 2013; Halliwell and Gutteridge, 2007). On the other hand, although we cannot explain at present why an extended incubation is required for sulfite-induced decrease of enzyme activities, it may be speculated that during this period there is a sufficient build-up of the damaging sulfite-derived reactive species able to cause deleterious effects. Since the inhibition of GPx, GST and G6PDH affects GSH recycling and the detoxification of xenobiotic compounds (Gu et al., 2015; Halliwell and Gutteridge, 2007), it may be presumed that brain redox balance is compromised by sulfite.

Considering that sulfite disrupts redox homeostasis and that glutamate transporters, mainly GLT1, GLAST and EAAC1, are vulnerable to biological oxidants (Trotti et al., 1998; Mysona et al., 2009; Banerjee et al., 2008; Danbolt, 2001), it may be suggested that the reduction of glutamate uptake caused by sulfite possibly occurs due to oxidative damage to these glutamate transporters, leading to an impairment of the termination of glutamatergic synaptic transmission and to excitotoxicity. In this context, this pathomechanism has been demonstrated in common neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis (Trotti et al., 1998; Mehta et al., 2013; Beste et al., 2014; Kostic et al., 2012).

We cannot ascertain the pathophysiological relevance of our present data, since the concentrations of sulfite in brain of affected patients have not been determined. However, it is noteworthy that even low concentrations of this metabolite (10 and 50 μM) were able to alter parameters of glutamatergic system and redox homeostasis. It should be also emphasized here that the cerebral cortex presents the highest expression of SOX among brain regions (Woo et al., 2003), implying that the deficient activity of this enzyme may predispose the cerebral cortex to damage by excess of sulfite. This is in accordance with the clinical evidence showing cortical damage in several SOX-deficient patients (Woo et al., 2003).

5. Conclusion

In conclusion, to our knowledge, this is the first report showing that sulfite and thiosulfate disturb glutamatergic neurotransmission. It was also seen that sulfite inhibits GSH metabolism-related enzymes, reinforcing the previous data in the literature showing that oxidative stress contribute to cause neurodegeneration in SOX deficiency (Chiarani et al., 2008; Küçükatay et al., 2005; Niknahad and O'Brien, 2008; Ozsoy et al., 2014). In case these findings are confirmed *in vivo* in animal models and in tissues from patients affected by SOX deficiency, it is conceivable that antagonists of glutamatergic receptors and antioxidant agents may be used as adjuvant therapies to treat patients with this disorder.

Disclaimer

The authors disclose that there are no conflicts of interest involved in this work.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa

de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX II), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Pró-reitoria de Pesquisa/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPE/SQ/UFRGS), Financiadora de estudos e projetos (FINEP), Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)# 01.06.0842-00 and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCT-EN).

References

- Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R., 2001. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 302, 141–145.
- Almeida, R.F., Thomazi, A.P., Godinho, G.F., Sauter, J.A., Wofchuk, S.T., Souza, D.O., Ganzella, M., 2010. Effects of depressive-like behavior of rats on brain glutamate uptake. *Neurochem. Res.* 35 (8), 1164–1171.
- Arenas, A., López-Alarcón, C., Kogan, M., Lissi, E., Davies, M.J., Silva, E., 2013. Chemical modification of lysozyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase, and bovine eye lens proteins induced by peroxy radicals: role of oxidizable amino acid residues. *Chem. Res. Toxicol.* 26 (1), 67–77.
- Banerjee, R., Vitvitsky, V., Garg, S.K., 2008. The undertow of sulfur metabolism on glutamatergic neurotransmission. *Trends Biochem. Sci.* 33 (9), 413–419.
- Basheer, S.N., Waters, P.J., Lam, C.W., Acquaviva-Bourdain, C., Henderson, G., Poskitt, K., Hukin, J., 2007. Isolated sulfite oxidase deficiency in the newborn: lactic acidemia and leukoencephalopathy. *Neuropediatrics* 38 (1), 38–41.
- Beste, C., Stock, A.K., Ness, V., Hoffmann, R., Saft, C., 2014. Evidence for divergent effects of neurodegeneration in Huntington's disease on attentional selection and neural plasticity: implications for excitotoxicity. *Brain Struct. Funct.*, article in press.
- Bindu, P.S., Christopher, R., Mahadevan, A., Bharath, R.D., 2011. Clinical and imaging observations in isolated sulfite oxidase deficiency. *J. Child Neurol.* 26 (8), 1036–1040.
- Browne, R.W., Armstrong, D., 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol. Biol.* 108, 347–352.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113, 484–490.
- Chiarani, F., Bavaresco, C.S., Dutra-Filho, C.S., Netto, C.A., Wyse, A.T., 2008. Sulfite increases lipoperoxidation and decreases the activity of catalase in brain of rats. *Metab. Brain Dis.* 23 (1), 123–132.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65 (1), 1–105.
- Dublin, A.B., Hald, J.K., Wootton-Gorges, S.L., 2002. Isolated sulfite oxidase deficiency: MR imaging features. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 23 (3), 484–485.
- Evelson, P., Travacio, M., Repetto, M., Escobar, J., Llesuy, S., Lissi, E.A., 2001. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 261–266.
- Frizzo, M.E., Lara, D.R., Prokopiuk, A.S., Vargas, C.R., Salbego, C.G., Wajner, M., Souza, D.O., 2002. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell Mol. Neurobiol.* 22 (3), 353–363.
- Grings, M., Moura, A.P., Parmeggiani, B., Marcowich, G.F., Amaral, A.U., de Souza Wyse, A.T., Wajner, M., Leipnitz, G., 2013. Disturbance of brain energy and redox homeostasis provoked by sulfite and thiosulfate: potential pathomechanisms involved in the neuropathology of sulfite oxidase deficiency. *Gene* 531 (2), 191–198.
- Gu, F., Chauhan, V., Chauhan, A., 2015. Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 18 (1), 89–95.
- Hayon, E., Treinin, A., Wilf, J., 1972. Electronic spectra, photochemistry, and autoxidation mechanism of the sulfite-bisulfite-pyrosulfite systems. The SO_2^- , SO_3^- , SO_4^- , and SO_5^- radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 47–57.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press, New York.
- Johnson, J.L., Duran, M., 2001. Molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Valle, D., Sly, W.S. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 3181–3217.
- Kocamaz, E., Adiguzel, E., Er, B., Gundogdu, G., Kucukatay, V., 2012. Sulfite leads to neuron loss in the hippocampus of both normal and SOX-deficient rats. *Neurochem. Int.* 61 (3), 341–346.
- Kostic, M., Zivkovic, N., Stojanovic, I., 2012. Multiple sclerosis and glutamate excitotoxicity. *Rev. Neurosci.* 24 (1), 71–88.
- Küçükatay, V., Savcioğlu, F., Hacıoğlu, G., Yargıçoğlu, P., Açar, A., 2005. Effect of sulfite on cognitive function in normal and sulfite oxidase deficient rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 27 (1), 47–54.
- Leong, S.F., Clark, J.B., 1984. Regional development of glutamate dehydrogenase in the rat brain. *J. Neurochem.* 43, 106–111.
- Mannervik, B., Guthenberg, C., 1981. Glutathione transferase (human placenta). *Methods Enzymol.* 77, 231–235.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I., Asenjo, M., Márquez, J., 2002. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (5), 439–458.
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., Sharma, P.L., 2013. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders? *Eur. J. Pharmacol.* 698 (1–3), 6–18.

- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mysona, B., Dun, Y., Duplantier, J., Ganapathy, V., Smith, S.B., 2009. Effects of hyperglycemia and oxidative stress on the glutamate transporters GLAST and system xc⁻ in mouse retinal Müller glial cells. *Cell Tissue Res.* 335 (3), 477–488.
- Niknahad, H., O'Brien, P.J., 2008. Mechanism of sulfite cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 174 (3), 147–154.
- Olney, J.W., 1969. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice: electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 28 (3), 455–474.
- Ozsoy, O., Aras, S., Ozkan, A., Parlak, H., Aslan, M., Yargicoglu, P., Agar, A., 2014. 2014. The effect of ingested sulfite on visual evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant status of brain in normal and sulfite oxidase-deficient aged rats. *Toxicol. Ind. Health*, article in press.
- Oztürk, O.H., Küçükataç, V., Yönden, Z., Açar, A., Bağcı, H., Delibaş, 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 (10), 671–679.
- Reznick, A.Z., Packer, L., 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233, 357–363.
- Robinson, H.C., Pasternak, C.A., 1964. The isolation of *S*-sulphogluthathione from the small intestine of the rat. *Biochem. J.* 93 (3), 487–492.
- Rosa, R.B., Dalcin, K.B., Schmidt, A.L., Gerhardt, D., Ribeiro, C.A., Ferreira, G.C., Schuck, P.F., Wyse, A.T., Porciúncula, L.O., Wofchuk, S., Salbego, C.G., Souza, D.O., Wajner, M., 2007. Evidence that glutaric acid reduces glutamate uptake by cerebral cortex of infant rats? *Life Sci.* 81 (25–26), 1668–1676.
- Salman, M.S., Ackerley, C., Senger, C., Becker, L., 2002. New insights into the neuropathogenesis of molybdenum cofactor deficiency. *Can. J. Neurol. Sci.* 29, 91–96.
- Schwarz, G., Mendel, R.R., Ribbe, M.W., 2009. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* 460 (7257), 839–847.
- Tan, W.H., Eichler, F.S., Hoda, S., Lee, M.S., Baris, H., Hanley, C.A., Grant, P.E., Krishnamoorthy, K.S., Shih, V.E., 2005. Isolated sulfite oxidase deficiency: a case report with a novel mutation and review of the literature. *Pediatrics* 116 (3), 757–766.
- Taylor, S.L., Higley, N.A., Bush, R.K., 1986. Sulfites in foods: uses analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Adv. Food Res.* 30, 1–76.
- Trotti, D., Danbolt, N.C., Volterra, A., 1998. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol. Sci.* 19 (8), 328–334.
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77, 325–332.
- Woo, W.H., Yang, H., Wong, K.P., Halliwell, B., 2003. Sulphite oxidase gene expression in human brain and in other human and rat tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (3), 619–623.
- Yagi, K., 1998. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol. Biol.* 108, 107–110.
- Zhang, X., Vincent, A.S., Halliwell, B., Wong, K.P., 2004. A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 279 (41), 43035–43045.

PARTE III

III.1 DISCUSSÃO

A deficiência da SO é uma doença neurometabólica caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo tecidual e elevada excreção urinária de sulfito, tiosulfato e S-sulfocisteína. Dentre os achados clínicos, se destacam disfunção motora, atraso no desenvolvimento e alterações no cristalino, enquanto que exames de imagem mostram graves anormalidades no córtex cerebral acompanhadas de edema, leucodistrofia e atrofia generalizada [6, 10, 11, 12].

Os sintomas têm sido principalmente associados aos metabólitos acumulados, cuja potencial toxicidade levaria ao dano celular e tecidual e, assim, aos achados clínicos. Dados da literatura evidenciam modificação nas subunidades dos receptores NMDA, indução de dano oxidativo, prejuízo nas defesas antioxidantes e alterações no metabolismo energético em modelos *in vitro* e *in vivo* da deficiência da SO [42 – 52]. No entanto, ainda pouco se sabe sobre a influência do sulfito e do tiosulfato sobre a neurotransmissão glutamatérgica, e sobre o sistema antioxidante relacionado ao metabolismo da GSH. Sendo assim, investigamos os efeitos do sulfito e do tiosulfato sobre tais sistemas em fatias de córtex cerebral de ratos.

As fatias de córtex cerebral foram expostas por 1 h ao sulfito ou tiosulfato, em concentrações que variaram de 10 a 500 μM , para avaliação do sistema glutamatérgico. Verificamos que o sulfito, em todas as concentrações avaliadas, diminuiu a captação do glutamato dependente de sódio, indicando uma possível alteração dos transportadores de glutamato corticais. É importante ser salientado aqui que a amostra utilizada apresenta a estrutura tecidual do córtex cerebral intacta, preservando, assim, a organização de proteínas de superfície, incluindo os próprios transportadores glutamatérgicos. Contudo, não é possível afirmar em nosso presente estudo quais transportadores específicos são afetados pelo sulfito.

Também vimos que o tiosulfato inibiu a atividade da glutamina sintetase e que o sulfito apresenta forte tendência em exercer o mesmo efeito. Essa enzima é expressa em astrócitos e sua principal função é de “neutralização” do glutamato, isto é, ao utilizar o glutamato para produzir glutamina, a glutamina sintetase produz um aminoácido sem capacidade neurotransmissora, o qual é então liberado para o espaço extracelular e pode ser internalizado pelos neurônios, onde é reconvertido em glutamato. Dessa forma, o sulfito e o tiosulfato alteram o controle das concentrações extracelulares de glutamato, pois prejudicam a recaptação desse neurotransmissor e sua metabolização.

Em um segundo momento, avaliamos os efeitos dos metabólitos sobre parâmetros de estresse oxidativo em fatias de córtex cerebral de ratos. Observamos que o sulfito, na concentração de 10 μM , aumentou os níveis de TBA-RS e diminuiu as concentrações de GSH. Por outro lado, concentrações mais altas de sulfito e o tiosulfato não alteraram esses parâmetros. Isso demonstra que o sulfito exerce um efeito bifásico sobre a oxidação de lipídios e da GSH, já que apenas baixas concentrações desse composto parecem ser deletérias sobre esses parâmetros. Com o objetivo de melhor investigar esse efeito bifásico e considerando que já foi demonstrado que o sulfito é capaz de reduzir pontes dissulfeto a grupamentos sulfidril, investigamos os efeitos do sulfito sobre o conteúdo de grupamentos sulfidril. O sulfito, na concentração de 500 μM , aumentou o conteúdo de sulfidrilas e, quando co-incubamos sulfito e GSSG em num meio sem amostra biológica, observamos um aumento nas concentrações de GSH. Tais resultados reforçam os achados de que o sulfito interage diretamente com pontes dissulfeto doando elétrons, o que aumenta a formação de tióis. Achados semelhantes já foram relatados num trabalho realizado em culturas de hepatócitos de ratos, no qual os autores mostraram que concentrações milimolares de sulfito aumentam o conteúdo de GSH [48]. Dessa forma, pode ser especulado que o

sulfito, em altas concentrações, é capaz de reciclar a GSH, o que evita a lipoperoxidação que poderia ser induzida pelo excesso de espécies reativas. Entretanto, outros estudos relataram que o sulfito induz estresse oxidativo *in vitro* em outras preparações de diferentes tecidos [44, 47, 49], o que sugere que mesmo altas concentrações de sulfito possam alterar outros parâmetros de dano oxidativo não investigados no nosso modelo experimental.

No próximo passo de nosso trabalho examinamos os efeitos do sulfito e tiosulfato sobre as atividades de importantes enzimas antioxidantes relacionadas com o metabolismo da GSH. Foram analisadas as atividades das enzimas GPx, GR, GST e G6PDH. Quando as fatias de córtex cerebral foram expostas aos compostos durante 1 h, não houve diferença na atividade das enzimas. Já quando incubamos as amostras na presença de sulfito 500 μ M por 3 h, observamos inibição das atividades da GPx, GST e G6PDH. Pode ser sugerido que esse efeito inibitório exercido pelo sulfito ocorra devido a modificações sítio-específicas em aminoácidos importantes para a atividade catalítica ou para a manutenção da estrutura tridimensional das enzimas. Além disso, supomos que essas modificações sejam provavelmente mediadas por espécies reativas acumuladas durante um período mais longo de incubação com o sulfito (3 h), já que essas enzimas apresentam aminoácidos vulneráveis ao dano oxidativo [53 – 57].

Por outro lado, os metabólitos acumulados na deficiência da SO não alteraram a formação de carbonilas. Não foram investigadas no presente estudo as razões pelas quais esse parâmetro não foi alterado, mas é possível que as espécies reativas geradas a partir de sulfito e do tiosulfato não sejam capazes de oxidar os grupamentos funcionais proteicos que gerariam grupos carbonilas, tipicamente resíduos de prolina, arginina, lisina e treonina [54]. Dessa forma, pode ser especulado que a inibição das enzimas GPx, GST, G6PDH e glutamina sintetase causada pelo sulfito esteja ocorrendo via

oxidação de grupamentos sulfidril. Isso está de acordo com o fato de que estudos com enzimas com sequências homólogas mostraram que a GPx, a GST e a glutamina sintetase não possuem os resíduos de aminoácidos passíveis de carbonilação em posições importantes para a sua atividade [54, 55, 56]. Além disso, o sulfito e o tiosulfato não alteraram a liberação da lactato desidrogenase e a redução do MTT, indicando que os efeitos exercidos por esses metabólitos não ocorreram devido a dano e morte celular.

Considerando-se que um prejuízo na neurotransmissão glutamatérgica pode levar ao aumento de espécies reativas no meio intracelular, sugere-se que o dano oxidativo causado pelo sulfito não seja mediado somente por espécies reativas geradas por sua auto-oxidação, mas também via alterações no sistema glutamatérgico. Nesse contexto, sabe-se que os próprios transportadores de glutamato são especialmente sensíveis a modificações oxidativas [58 – 61].

Concluindo, mostramos que o sulfito e o tiosulfato alteram o sistema glutamatérgico e induzem estresse oxidativo em cérebro de ratos. Enfatize-se aqui que os efeitos causados por esses metabólitos ocorreram em concentrações relativamente baixas, o que indica que mesmo um acúmulo moderado de sulfito e tiosulfato pode causar dano celular. Além disso, já foi relatado que o córtex cerebral é a estrutura cerebral com maior expressão da enzima SO [63], o que indica que essa região é particularmente sensível aos efeitos do sulfito.

III.2 CONCLUSÕES

- O sulfito diminui a captação de glutamato dependente de sódio em córtex cerebral de ratos;
- O sulfito e o tiosulfato inibem a atividade da glutamina sintetase em córtex cerebral de ratos;
- O sulfito, na concentração de 10 μM , induz peroxidação lipídica e diminui as concentrações de GSH em córtex cerebral;
- O sulfito, na concentração de 500 μM , aumenta o conteúdo de grupamentos sulfidril em córtex cerebral e aumenta a concentração de GSH a partir de GSSG em um meio sem amostra biológica;
- O sulfito inibe a atividade das enzimas GPx, GST e G6PDH em córtex cerebral.

III.3 PERSPECTIVAS

- Avaliar os efeitos da injeção intracerebroventricular de sulfito e tiosulfato sobre a neurotransmissão glutamatérgica em córtex cerebral de ratos;
- Avaliar os efeitos de antagonistas glutamatérgicos (por exemplo, MK-801) e de antioxidantes (por exemplo, melatonina e vitamina E) sobre os efeitos do sulfito e tiosulfato na neurotransmissão glutamatérgica e homeostase redox em cérebro de ratos.

REFERÊNCIAS

- [1] Jorde, Lynn B; Carey, John C; Bamshad, Michael J. Genética Bioquímica em: Genética Médica, 4ª edição. Disponível em <https://www.evolution.com.br/epubreader/gentica-mdica-4ed>, último acesso em 16 de janeiro de 2016.
- [2] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5ª edição. Nova Iorque: W H Freeman; 2002. Seção 23.6, Inborn Errors of Metabolism Can Disrupt Amino Acid Degradation. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22493/>, último acesso em 17 de janeiro de 2016.
- [3] Eugene Knox W. Sir Archibald Garrod's "Inborn Errors of Metabolism". II. Alkaptonuria. Am J Hum Genet. 1958; 10(2): 95–124.
- [4] Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D. Genetics, Biochemistry, and Molecular Bases of Variant Human Phenotypes. Em: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson K, Mitchell G (Eds.), The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases, Nova Iorque, NY, McGraw-Hill; 2014. <http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=971&Sectionid=62632821>. Último acesso em 21 de janeiro de 2016.
- [5] Garrett RM, Rajagopalan KV. Site-directed mutagenesis of recombinant sulfite oxidase: identification of cysteine 207 as a ligand of molybdenum. J Biol Chem. 1996; 271(13):7387-91.
- [6] Sass JO, Gunduz A, Araujo Rodrigues Funayama C, Korkmaz B, Dantas Pinto KG, Tuysuz B, Yanasse Dos Santos L, Taskiran E, de Fátima Turcato M, Lam CW, Reiss J, Walter M, Yalcinkaya C, Camelo Junior JS. Functional deficiencies of sulfite oxidase:

Differential diagnoses in neonates presenting with intractable seizures and cystic encephalomalacia. *Brain Dev.* 2010; 32(7):544-9.

[7] Davis AC, Cornelison MJ, Meyers KT, Rajapakshe A, Berry RE, Tollin G, Enemark JH. Effects of mutating aromatic surface residues of the heme domain of human sulfite oxidase on its heme midpoint potential, intramolecular electron transfer, and steady-state kinetics. *Dalton Trans.* 2013; 42(9):3043-9.

[8] Kisker C, Schindelin H, Pacheco A, Wehbi WA, Garrett RM, Rajagopalan KV, Enemark JH, Rees DC. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell.* 1997; 91(7):973-83.

[9] Johnson JL, Duran M. Molybdenum Cofactor Deficiency and Isolated Sulfite Oxidase Deficiency. Em: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson K, Mitchell G (Eds.), *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, Nova Iorque, NY, McGraw-Hill; 2014. Disponível em: <http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=971&Sectionid=62640104>. Último acesso em 21 de janeiro de 2016.

[10] Tan WH, Eichler FS, Hoda S, Lee MS, Baris H, Hanley CA, Grant PE, Krishnamoorthy KS, Shih VE. Isolated sulfite oxidase deficiency: a case report with a novel mutation and review of the literature. *Pediatrics.* 2005; 116(3):757-66.

[11] Chen LW, Tsai YS, Huang CC. Prenatal multicystic encephalopathy in isolated sulfite oxidase deficiency with a novel mutation. *Pediatr Neurol.* 2014; 51(1):181-2.

[12] Dublin AB, Hald JK, Wootton-Gorges SL. Isolated sulfite oxidase deficiency: MR imaging features. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2002; 23(3):484-5.

- [13] Barth PG, Beemer FA, Cats BP, Duran M, Wadman SK. Neuropathological findings in a case of combined deficiency of sulphite oxidase and xanthine dehydrogenase. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1985; 408(1):105-6.
- [14] Teksam O, Yurdakok M, Coskun T. Molybdenum cofactor deficiency presenting with severe metabolic acidosis and intracranial hemorrhage. *J Child Neurol.* 2005; 20(2):155-7.
- [15] Coşkun T, Yetük M, Yurdakök M, Tekinalp G. Blood uric acid as a pointer to the diagnosis of molybdenum cofactor deficiency. *Acta Paediatr.* 1998; 87(6):714-5.
- [16] Johnson JL. Prenatal diagnosis of molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency. *Prenat Diagn.* 2003; 23(1):6-8.
- [17] Reiss J, Christensen E, Dorche C. Molybdenum cofactor deficiency: first prenatal genetic analysis. *Prenat Diagn.* 1999; 19(4):386-8.
- [18] Schwarz G, Mendel RR, Ribbe MW. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature.* 2009; 460(7257):839-47
- [19] Schwahn BC, Van Spronsen FJ, Belaidi AA, Bowhay S, Christodoulou J, Derks TG, Hennermann JB, Jameson E, König K, McGregor TL, Font-Montgomery E, Santamaria-Araujo JA, Santra S, Vaidya M, Vierzig A, Wassmer E, Weis I, Wong FY, Veldman A, Schwarz G. Efficacy and safety of cyclic pyranopterin monophosphate substitution in severe molybdenum cofactor deficiency type A: a prospective cohort study. *Lancet.* 2015. pii: S0140-6736(15)00124-5.
- [20] Veldman A, Santamaria-Araujo JA, Sollazzo S, Pitt J, Gianello R, Yaplito-Lee J, Wong F, Ramsden CA, Reiss J, Cook I, Fairweather J, Schwarz G. Successful treatment

of molybdenum cofactor deficiency type A with cPMP. *Pediatrics*. 2010; 125(5):e1249-54.

[21] Hitzert MM, Bos AF, Bergman KA, Veldman A, Schwarz G, Santamaria-Araujo JA, Heiner-Fokkema R, Sival DA, Lunsing RJ, Arjune S, Kosterink JG, van Spronsen FJ. Favorable outcome in a newborn with molybdenum cofactor type A deficiency treated with cPMP. *Pediatrics*. 2012; 130(4):e1005-10.

[22] Ragg R, Natalio F, Tahir MN, Janssen H, Kashyap A, Strand D, Strand S, Tremel W. Molybdenum trioxide nanoparticles with intrinsic sulfite oxidase activity. *ACS Nano*. 2014; 8(5):5182-9.

[23] Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int*. 2007; 51(6-7):333-55.

[24] Robinson MB. Acute Regulation of Sodium-Dependent Glutamate Transporters: A Focus on Constitutive and Regulated Trafficking. *Handb Exp Pharmacol*. 2006; (175):251-75.

[25] Bielarczyk H, Szutowiczand A, Thompson EJ. *Neuroquímica*. Em: Baynes JW, Dominiczak MH. *Bioquímica Médica*, 4ª edição. Disponível em: <https://www.evolution.com.br/epubreader/bioquimica-medica-4ed>, último acesso em 25 de janeiro de 2016.

[26] Nakanishi S. Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron*. 1994; 13(5):1031-7.

- [27] Stoffel W, Körner R, Wachtmann D, Keller BU. Functional analysis of glutamate transporters in excitatory synaptic transmission of GLAST1 and GLAST1/EAAC1 deficient mice. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004; 128(2):170-81.
- [28] Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014; 121(8):799-817.
- [29] Vandenberg RJ, Ryan RM. Mechanisms of glutamate transport. *Physiol Rev*. 2013; 93(4):1621-57.
- [30] Paula-Lima AC, Brito-Moreira J, Ferreira ST. Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2013; 126(2):191-202.
- [31] Ambrosi G, Cerri S, Blandini F. A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014; 121(8):849-59
- [32] Plitman E, Nakajima S, de la Fuente-Sandoval C, Gerretsen P, Chakravarty MM, Kobylanskii J, Chung JK, Caravaggio F, Iwata Y, Remington G, Graff-Guerrero A. Glutamate-mediated excitotoxicity in schizophrenia: a review. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2014; 24(10):1591-605
- [33] Blasco H, Mavel S, Corcia P, Gordon PH. The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. *Curr Med Chem*. 2014; 21(31):3551-75.
- [34] Essa MM, Braidy N, Vijayan KR, Subash S, Guillemin GJ. Excitotoxicity in the pathogenesis of autism. *Neurotox Res*. 2013; 23(4):393-400

- [35] Sepers MD, Raymond LA. Mechanisms of synaptic dysfunction and excitotoxicity in Huntington's disease. *Drug Discov Today*. 2014; 19(7):990-6.
- [36] Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol*. 2013; 698(1-3):6-18.
- [37] Takahashi K, Foster JB, Lin CL. Glutamate transporter EAAT2: regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. *Cell Mol Life Sci*. 2015; 72(18):3489-506.
- [38] Halliwell B, Gutteridge JMC. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. Em: B Halliwell, JMC Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press Inc., Oxford, 2007.
- [39] Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*. 1999; 65(18-19):1865-74.
- [40] T Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 1973; 134(3): 707–716.
- [41] Roede JR, Jones DP. Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environ Mol Mutagen*. 2010; 51(5):380-90.
- [42] Grings M, Moura AP, Parmeggiani B, Marcowich GF, Amaral AU, de Souza Wyse AT, Wajner M, Leipnitz G. Disturbance of brain energy and redox homeostasis provoked by sulfite and thiosulfate: potential pathomechanisms involved in the neuropathology of sulfite oxidase deficiency. *Gene*. 2013; 531(2):191-8.

- [43] Grings M, Moura AP, Amaral AU, Parmeggiani B, Gasparotto J, Moreira JC, Gelain DP, Wyse AT, Wajner M, Leipnitz G. Sulfite disrupts brain mitochondrial energy homeostasis and induces mitochondrial permeability transition pore opening via thiol group modification. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842(9):1413-22.
- [44] Chiarani F, Bavaresco CS, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wyse AT. Sulfite increases lipoperoxidation and decreases the activity of catalase in brain of rats. *Metab Brain Dis*. 2008; 23(1):123-32.
- [45] Zhang X, Vincent AS, Halliwell B, Wong KP. A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 2004; 279(41):43035-45
- [46] Kocamaz E, Adiguzel E, Er B, Gundogdu G, Kucukatay V. Sulfite leads to neuron loss in the hippocampus of both normal and SOX-deficient rats. *Neurochem Int*. 2012; 61(3):341-6.
- [47] Küçükatay V, Savcıoğlu F, Hacıoğlu G, Yargıçoğlu P, Açar A. Effect of sulfite on cognitive function in normal and sulfite oxidase deficient rats. *Neurotoxicol Teratol*. 2005; 27(1):47-54.
- [48] Niknahad H, O'Brien PJ. Mechanism of sulfite cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact*. 2008; 174(3):147-54.
- [49] Ozsoy O, Aras S, Ozkan A, Parlak H, Aslan M, Yargicoglu P, Agar A. The effect of ingested sulfite on visual evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant status of brain in normal and sulfite oxidase-deficient aged rats. *Toxicol Ind Health*. 2014. pii: 0748233714552688.

- [50] Oztürk OH, Küçükataş V, Yönden Z, Ağar A, Bağcı H, Delibaş 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; 80(10):671-9.
- [51] Salman MS, Ackerley C, Senger C, Becker L. New insights into the neuropathogenesis of molybdenum cofactor deficiency. *Can J Neurol Sci.* 2002; 29(1):91-6.
- [52] Tan WH, Eichler FS, Hoda S, Lee MS, Baris H, Hanley CA, Grant PE, Krishnamoorthy KS, Shih VE. Isolated sulfite oxidase deficiency: a case report with a novel mutation and review of the literature. *Pediatrics.* 2005; 116(3):757-66.
- [53] Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 2003; 25(3-4):207-18.
- [54] Tosatto SC, Bosello V, Fogolari F, Mauri P, Roveri A, Toppo S, Flohé L, Ursini F, Maiorino M. The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(9):1515-26.
- [55] Yamamoto K, Higashiura A, Hossain MT, Yamada N, Shiotsuki T, Nakagawa A. Structural characterization of the catalytic site of a *Nilaparvata lugens* delta-class glutathione transferase. *Arch Biochem Biophys.* 2015; 566:36-42.
- [56] Yamamoto K, Aso Y, Yamada N. Catalytic function of an ϵ -class glutathione S-transferase of the silkworm. *Insect Mol Biol.* 2013; 22(5):523-31.
- [57] Wray LV Jr, Fisher SH. Functional roles of the conserved Glu304 loop of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase. *J Bacteriol.* 2010; 192(19):5018-25.

- [58] Trotti D, Danbolt NC, Volterra A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci.* 1998; 19(8):328-34.
- [59] Mysona B, Dun Y, Duplantier J, Ganapathy V, Smith SB. Effects of hyperglycemia and oxidative stress on the glutamate transporters GLAST and system xc- in mouse retinal Müller glial cells. *Cell Tissue Res.* 2009; 335(3):477-88.
- [60] Banerjee R, Vitvitsky V, Garg SK. The undertow of sulfur metabolism on glutamatergic neurotransmission. *Trends Biochem Sci.* 2008; 33(9):413-9.
- [61] Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001; 65(1):1-105.
- [62] Woo WH, Yang H, Wong KP, Halliwell B. Sulphite oxidase gene expression in human brain and in other human and rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305(3):619-23.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota de catabolismo dos aminoácidos fenilalanina e tirosina.....página 9

Figura 2: Classificação dos erros inatos do metabolismo baseada no quadro clínico e em características bioquímicas..... página 10

Figura 3: Via de catabolismo da cisteína..... página 12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Representação das principais espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN).....	página 22
--	-----------