

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação de Estresse Oxidativo em Pacientes Portadores de
Acidemia 3-Hidroxi-3-Metilglutárica: O Efeito da Carnitina

MARIANA DOS SANTOS MELLO

PORTO ALEGRE, 2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação de Estresse Oxidativo em Pacientes Portadores de
Acidemia 3-Hidroxi-3-Metilglutárica: O Efeito da Carnitina

Dissertação apresentada por Mariana dos Santos Mello
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador(a): Prof^a Dr^a Carmen Regla Vargas

PORTO ALEGRE, 2014

Dissertação apresentada por Mariana dos Santos Mello para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas da Faculdade Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19 de setembro de 2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Cristiane Matté
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Alethéa Gatto Barschak
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Vanusa Manfredini
Universidade Federal do Pampa

Mello, Mariana
Avaliação de Estresse Oxidativo em Pacientes
Portadores de Acidemia 3-Hidroxi-3-Metilglutárica:
O Efeito da Carnitina / Mariana Mello. -- 2014.
79 f.

Orientadora: Carmen Vargas.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Erros inatos do metabolismo. 2. Estresse
oxidativo. 3. Acidemias orgânicas. I. Vargas, Carmen,
orient. II. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais e aos meus irmãos, o amor de vocês motiva meu crescimento.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Carmen Vargas, pela dedicação, profissionalismo e pela paciência.

A Graziela Ribas pelo apoio, sugestões e colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por ter me proporcionado essa qualificação.

Aos colegas de laboratório pelos auxílios nos experimentos, pelas trocas de idéias e momentos de descontração.

As minhas amigas de faculdade (Fe, Mila, Jose, Tabi) pela amizade e por me apoiarem sempre.

Aos meus pais, irmãos e cunhadas por todo amor que sempre me deram e por acreditarem em mim.

Ao Maurício e a Cíntia por serem grandes exemplos de dedicação acadêmica.

MUITO OBRIGADA, a todos!!!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

Introdução: A acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica é causada pela deficiência da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA-liase, uma enzima do metabolismo da leucina, levando ao acúmulo, especialmente, do ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico nos tecidos. Estudos sugerem que o estresse oxidativo pode contribuir para os danos neurológicos observados em algumas acidúrias orgânicas. **Objetivo:** Avaliar parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica antes e após o tratamento. **Materiais e Métodos:** Amostras de sangue e urina foram coletadas de pacientes no momento do diagnóstico e após tratamento com dieta com restrição de proteínas e suplementação de L-carnitina (100mg/kg/dia) e de controles. O TBA, um subproduto final da peroxidação lipídica, foi medido no plasma. A determinação do teor de carbonilas e de grupos sulfidrila, marcadores de dano oxidativo a proteínas, foi realizada no plasma. Para avaliar na urina a oxidação de proteínas, os níveis de di-tirosina foram medidos por autofluorescência. O ensaio da capacidade antioxidante urinária foi realizado utilizando um kit comercial. Os níveis de carnitina livre e isovalerilcarnitina foram analisados em amostras de sangue por espectrometria de massas em tandem usando o método de monitorização de reação múltipla (MRM). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de biureto em amostras de plasma usando um kit comercial. **Resultados e Discussão:** Os resultados demonstraram um aumento significativo nos níveis de isovalerilcarnitina em sangue total, das concentrações plasmáticas de malondialdeído e urinárias de di-tirosina, além de uma redução significativa da capacidade antioxidante urinária e dos níveis sanguíneos de carnitina livre nos pacientes no momento do diagnóstico em relação aos controles. Verificou-se uma diminuição nas concentrações do malondialdeído plasmático e da di-tirosina na urina dos pacientes tratados, o que sugere um efeito de proteção do tratamento sobre a peroxidação de lípidos e do dano oxidativo a proteínas, bem como uma normalização dos níveis de L-carnitina durante o tratamento. **Conclusões:** Esses resultados permitem sugerir que o estresse oxidativo ocorre em pacientes com acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica e que o tratamento com a dieta restrita de proteína e suplementada com L-carnitina pode oferecer proteção contra o dano oxidativo a biomoléculas.

Palavras-Chaves: Estresse Oxidativo, L-Carnitina, 3-Hidroxi-metil-glutaril-CoA-liase, Restrição Protéica.

ABSTRACT

Introduction: The 3-hydroxy-3-methylglutaric acidemia is caused by the deficiency of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA lyase, an enzyme of leucine metabolism, leading to accumulation of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid in tissues. Studies have suggested that oxidative stress may contribute to the neurological damage observed in some organic acidurias. **Objective:** Evaluate oxidative stress parameters in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria patients before and after treatment. **Materials and Methods:** Blood and urine samples were collected from patients at diagnosis and after treatment with restricted protein diet and supplemented with L-carnitine (100mg/kg/dia) and from controls. TBA, an end subproduct of lipid peroxidation, was measured in plasma. Determination of carbonyl and sulphhydryl content, biomarkers of oxidative damage to proteins, was done in plasma. To assess urine protein oxidation, levels of di-tyrosine were measured by autofluorescence. The assay of antioxidant urinary capacity was performed using a commercial kit. The levels of free carnitine and isovalerylcarnitine were analyzed in blood samples by tandem mass spectrometry using the method of multiple reaction monitoring (MRM). Protein content was determined by the biuret method for plasma samples using a commercial kit. **Results and Discussion:** The results demonstrated a significant increase of total blood isovalerylcarnitine, malondialdehyde plasma concentrations and di-tyrosine urinary levels and a significant reduction of the urinary antioxidant capacity and free-carnitine blood levels in patients at diagnosis compared to controls. It was verified a decrease in plasma malondialdehyde concentrations and urinary di-tyrosine levels in treated patients, suggesting a protective effect of the treatment on lipid peroxidation and protein oxidative damage, as well as a normalization of L-carnitine levels during treatment. **Conclusions:** These results allow to suggest that oxidative stress occurs in 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA lyase deficient patients and treatment with restricted protein diet and L-carnitine may offer protection against oxidative damage.

Keywords: Oxidative stress, L-Carnitine, 3-Hydroxy-methyl-glutaryl-CoA lyase, Protein Restriction.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3-HMG – Acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica
- AO – Acidúrias Orgânicas
- ATP – Adenosina trifosfato
- CG – Cromatografia gasosa
- CGMS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- EIM – Erros Inatos do Metabolismo
- ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio
- ERO – Espécies Reativas do Oxigênio
- FUCA 1 – Fucosidase, Alfa-L-1
- GSH – Glutathiona Reduzida
- HMG – ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico
- HMGCL – 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A liase
- HPLC – Cromatografia líquida de alta performance
- LCMSMS - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
- MGA – ácido 3-metilglutárico
- MGT – ácido 3-metilglutacônico
- MPS – Mucopolissacaridose
- MSMS - Espectrometria de massas em seqüência
- OHIVA – ácido 3-hidroxi-isovalérico
- SUS – Sistema Único de Saúde
- TAR – Reatividade antioxidante total
- TBA-RS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
- TCEB3 - Transcription Elongation Factor B Polypeptide
- TRAP – Potencial antioxidante reativo total

SUMÁRIO

1. Introdução.....	19
1.1 Erros Inatos do Metabolismo	21
1.1.1 Acidemias Orgânicas	22
1.1.2 Acidemia 3-Hidroxi-3-Metilglutárica (3-HMG).....	23
1.2 L-carnitina	25
1.3 Radicais livres e espécies reativas.....	26
1.4 Estresse Oxidativo.....	27
2. Objetivos	31
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
2.2.1 Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo em amostras de plasma dos pacientes portadores de 3-HMG, obtidas no momento do diagnóstico e após a instituição do regime terapêutico:.....	33
2.2.2 Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo em amostras de urina dos pacientes portadores de 3-HMG, antes e após a instituição do tratamento:	33
2.2.3 Avaliar os níveis de carnitina livre e isovalerilcarnitina em amostras de sangue total dos pacientes portadores de 3-HMG, antes e após a instituição do tratamento.....	33
3. Resultados	35
4. Discussão Geral	55
5. Conclusões.....	63
6. Perspectivas	67
7. Referências.....	71

1. Introdução

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

Sir Archibald E. Garrod criou o termo Erro Inato do Metabolismo (EIM) para designar a alcaptonúria, há um século. Garrod observou que determinada doença era mais prevalente nas crianças nas quais os pais tinham algum grau de consanguinidade. Através dessa observação e estudos das leis de Mendel sugeriu-se, então, que se tratava de uma desordem com herança autossômica recessiva. (GARROD, 1902).

Denomina-se EIM qualquer defeito hereditário causado devido à deficiência parcial ou total de uma proteína, a qual, geralmente, exerce uma atividade enzimática. O bloqueio resultante do defeito metabólico leva ao acúmulo dos substratos da enzima e seus derivados, bem como deficiência na síntese do produto da reação, levando ao aparecimento de sintomatologia grave, muitas vezes letal (SCRIVER et al., 2001). Dorfman e Lorincz (1957) descreveram o aumento da excreção de ácido mucopolissacarídico em urina de pacientes com síndrome de Hurler, essa síndrome é a mais grave entre três formas da Mucopolissacaridose I (MPS I) e seu nome é uma homenagem à Dra. Gertrude Hurler, médica que descreveu, em 1919, os primeiros pacientes com essa doença. Até então somente descrições fenotípicas desses pacientes haviam sido realizadas, como atraso mental, feições grosseiras, hepatoesplenomegalia e outras.

Os EIM correspondem a mais de 500 distúrbios, o que compreende cerca de 10% do total das doenças genéticas e podem abranger defeitos de síntese, degradação, transporte ou armazenamento de moléculas no organismo. Apesar de serem individualmente raros, os EIM afetam aproximadamente 1 a 2% da população, constituindo-se um importante problema de saúde pública (BARIC et al., 2001). Para a maioria destas doenças, no entanto, a prevenção da morte ou de sequelas neurológicas permanentes nos pacientes é dependente de um diagnóstico precoce e instituição de uma terapia adequada. (JIMENEZ-SANCHEZ et al., 2001; BURTON, 1998).

Os EIM podem ser classificados de diferentes maneiras, sendo a classificação de Saudubray e Charpentier (1995) considerada de fácil compreensão e aplicabilidade. O grupo I são os distúrbios de síntese ou catabolismo de moléculas complexas que apresentam sintomas permanentes que tendem a se acentuar ao longo do tempo, como face grosseira, visceromegalias, alterações ósseas progressivas e neurodegeneração. Já o grupo II corresponde aos EIM intermediários que culminam em intoxicação aguda ou crônica, apresentando intervalos livres de sintomas e relação evidente com o aporte alimentar, onde incluem-se as acidemias orgânicas, alvo de estudo desse trabalho. E, por fim, o grupo III que

inclui patologias que apresentam deficiência na produção ou utilização de energia, comprometendo geralmente o fígado, miocárdio, músculos em geral e cérebro (Tabela 1).

1.1.1 Acidemias Orgânicas

As acidemias ou acidúrias orgânicas (AO) são EIM onde um ou mais ácidos orgânicos acumulam-se nos tecidos e fluidos biológicos dos pacientes afetados devido à ausência ou deficiência grave da atividade de uma enzima do metabolismo de aminoácidos, lipídios ou carboidratos. (CHALMERS and LAWSON, 1982). As acidemias são diversas: propiônica, metilmalônica, glutárica tipo 1, isovalérica, 3-hidro-3-metilglutárica, alcaptonúria, mevalônica, entre outras. (VAIDIANATHAN K. et al., 2011).

Tabela 1 - Classificação dos EIM. Conforme Saudubray e Charpentier (1995)

Grupo I	Grupo II	Grupo III
Doenças lisossomais	Aminoacidopatias	Doenças de depósito do glicogênio
Doenças peroxissomais	Acidemias orgânicas	Defeitos na beta oxidação de ácidos graxos
Defeitos de glicosilação	Defeitos no ciclo da uréia	Hiperlacticemias congênitas
Deficiência de alfa1 anti-tripsina		Doenças mitocondriais / Defeitos da Cadeia respiratória
Defeitos na síntese do colesterol		

Clinicamente, os pacientes portadores desses distúrbios apresentam, predominantemente, disfunção neurológica, convulsões, ataxia, hipotonia, tremores, atraso no desenvolvimento psicomotor, retardo mental, entre outros. Embora cetoacidose, hiperglicinemia, hiperamonemia, hipoglicemia, acidemia láctica e neutropenia sejam achados laboratoriais comuns nessas doenças, o diagnóstico é essencialmente realizado pela demonstração de elevações características de certos ácidos orgânicos na urina, através de técnicas cromatográficas (HPLC, CG) e espectrométricas (GC/MS). (OGIER DE BAULNY and SAUDUBRAY, 2002; DEODATO et al., 2006).

Em geral, os sintomas das acidemias orgânicas costumam aparecer no período neonatal. Entretanto, o período entre o nascimento e os primeiros sinais clínicos varia de horas a anos, dependendo da natureza do defeito. Intolerância proteica e sonolência

normalmente são os primeiros sintomas a chamarem a atenção, embora diversos outros sintomas possam ser apresentados, inclusive edema cerebral. (OGIER DE BAULNY and SAUDUBRAY, 2002).

Assim como para outros EIM, o prognóstico dessas doenças depende do diagnóstico precoce e instituição de um tratamento baseado em restrições dietéticas com suplementação de cofatores das enzimas deficientes e L-carnitina. (WAJNER and GOODMAN, 2011; WAJNER et al., 2001).

Atualmente no Brasil existe a triagem neonatal conhecida como o Teste do Pezinho que é realizada através do Sistema Único de Saúde (SUS). Segundo a portaria número 822, de 06 de junho de 2001, os testes devem ser realizados até o décimo dia de vida do paciente, sendo preferencialmente entre o segundo e o sétimo. O objetivo desse exame é a detecção precoce de doenças genéticas, entretanto, até 2012 o SUS só realizava o diagnóstico de fenilcetonúria, hipotireodismo congênito, hemoglobinopatias e fibrose cística. Em 14 de dezembro de 2012 foi aprovada a portaria nº 2.829 que incluiu a deficiência de biotinidase e a hiperplasia congênita da supra-adrenal ao teste do pezinho, a qual já esta sendo realizada atualmente (BRASIL, 2001 e 2012).

Alguns laboratórios no Brasil realizam a triagem neonatal chamada de teste do pezinho ampliado que inclui outras doenças e mais alguns EIM: aminoacidopatias, galactosemia, toxoplasmose congênita, etc. Também, poucos laboratórios privados disponibilizam a pesquisa de aminoácidos e acilcarnitinas em sangue total coletado em papel filtro. Esse exame é realizado com a metodologia de Espectrometria de Massas em Tandem (MS/MS), que separa e detecta fragmentos ionizados de moléculas de acordo com a sua relação massa/carga. Várias aminoacidopatias, defeitos de beta oxidação mitocondrial de ácidos graxos e acidemias orgânicas são diagnosticadas por este método, incluindo a acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica, a qual é detectada pelo acúmulo de 3-metilglutarilcarnitina e 3-hidroxisovalerilcarnitina no sangue total impregnado em papel filtro. (DASOUKI et al., 1987).

1.1.2 Acidemia 3-Hidroxi-3-Metilglutárica (3-HMG)

A 3-HMG é um EIM que foi descrito pela primeira vez em 1976 por Faull et al. É uma doença de herança autossômica recessiva que afeta o gene hidroximetilglutaril-Coa liase e causa a deficiência da enzima HMGCL, uma enzima mitocondrial e peroxissomal do

metabolismo da leucina. Assim, ocorre um déficit na clivagem do 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA em acetil-CoA e ácido acetoacético, última etapa da cetogênese (BARASH et al., 1990, ASHMARINA et al., 1999) (figura 1). A prevalência da 3-HMG é estimada em menos que 1/100.000 recém-nascidos vivos. (PIE et al., 2007).

O gene hidroximetilglutaril-Coa liase (Genomic Acession No. NT_004610.17), que codifica a enzima mitocondrial HMGCL está localizado no cromossomo 1, entre a posição 1p36.1-p35, entre FUCA1, gene que codifica o alfa-fucosidase lisossomal, e TCEB3 (“transcription elongation factor B polypeptide 3”), que codifica uma proteína de alongação, e possui 9 exons, 8 introns e 24.336 pares de bases. (PIE et al., 2007). Segundo estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa há uma elevada incidência da acidemia 3-HMG no nosso país. Duas mutações (E37X e V168fs -2) comuns em indivíduos de origem portuguesa foram encontradas nos pacientes brasileiros. (PIE et al, 2007; VARGAS et al, 2007).

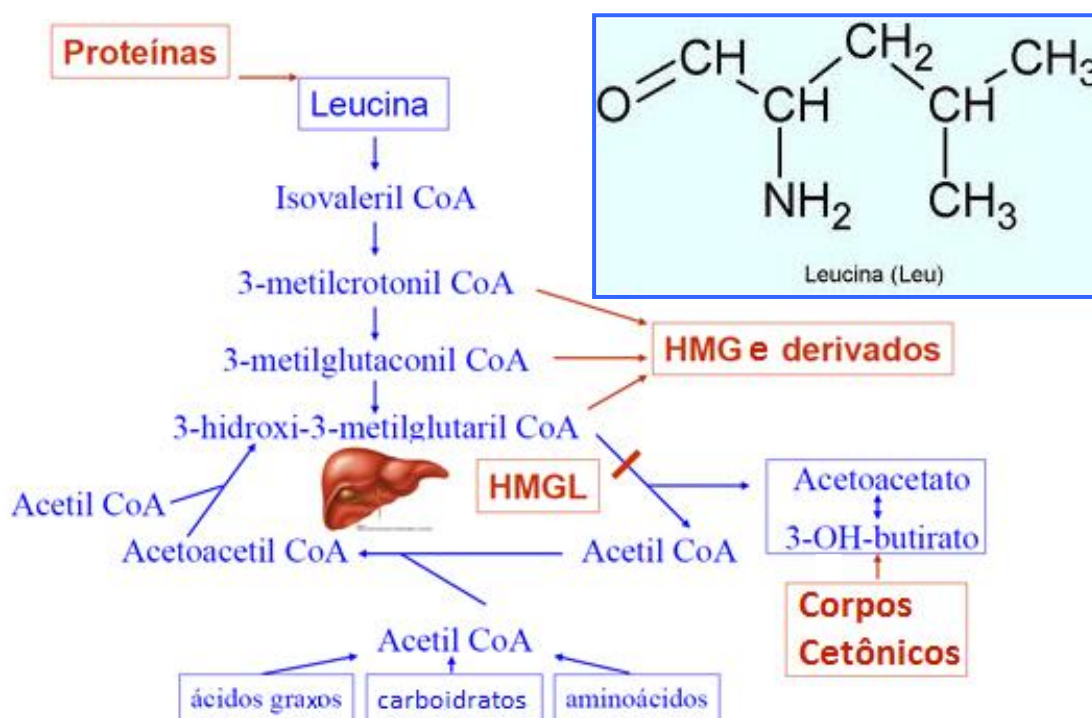


Figura 1 - Rota metabólica e estrutura química da leucina. Adaptado de HOSPITAL SANT JOAN DE DEU BARCELONA, 2014.

Pacientes acometidos por esta doença sofrem pela ausência de corpos cetônicos, uma fonte de energia alternativa a glicose, e por acúmulo de metabólitos tóxicos como os ácidos 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMG), 3-metilglutacônico (MGT) e 3-hidroxi-isovalérico (OHIVA)

e 3-metilglutárico (MGA) originados do catabolismo da leucina. O fígado e o cérebro são os órgãos mais afetados. Entretanto, o pâncreas e o coração podem também estar envolvidos. As características clínicas mais comuns são hipoglicemia infantil severa, acidose metabólica, hepatomegalia, letargia ou coma e apnéia. (GIBSON et al., 1988).

O diagnóstico da 3-HMG é realizado através da análise de ácidos orgânicos na urina, pois nesta enfermidade há um aumento na concentração urinária dos ácidos HMG, MGT e OHIVA e MGA. (SWEETMAN e WILLIAMS, 2001). O diagnóstico também pode ser realizado através da análise de acilcarnitinas em sangue de pacientes afetados utilizando espectrometria de massas em tandem (LC/MS/MS), onde se observa uma elevação dos níveis de 3-metilglutarilcarnitina e 3-hidroxisovalerilcarnitina. A atividade da HMGCL pode ser analisada em vários tecidos incluindo linfócitos e fibroblastos. (RASHED et al., 1995). O tratamento da 3-HMG inclui uma dieta com ingestão restrita de gorduras e de proteínas, em especial leucina, e com elevada ingesta de carboidratos. A terapia com L-carnitina tem sido recomendada em alguns casos. Além disso, durante as crises pode haver a administração de bicarbonato de sódio e de glicose intravenosa. (ROE et al., 1986).

1.2 L-carnitina

A L-carnitina (ácido 4-N-trimetilamônio-3-hidróxi-butírico) (figura 2) é um componente endógeno que desempenha um importante papel fisiológico no transporte de ácidos graxos de cadeia longa do citoplasma para o interior da mitocôndria, permitindo a formação de adenosina trifosfato (ATP) através da β -oxidação. (BAHL and BRESSLER, 1987). A L-carnitina é bastante utilizada no tratamento das acidemias orgânicas, entre as quais a 3-HMG, uma vez que promove a remoção (detoxificação) de grupamentos acil acumulados, através da ação da enzima carnitina aciltransferase, que catalisa a formação de glutarilcarnitina e outros ésteres de carnitina, restaurando, dessa forma, a concentração de CoA livre intramitocondrial. As doses geralmente empregadas variam entre 100 a 200 mg/kg/dia. (NYHAN et al., 2005).

Além de sua importância em processos bioenergéticos, nos últimos anos, alguns trabalhos têm demonstrado efeitos antioxidantes e antiperoxidativos para a L-carnitina, incluindo em alguns EIM. (RIBAS et al., 2010; SITTA et al., 2009). Diversos mecanismos têm sido propostos, entre eles uma ação sequestradora de espécies reativas do oxigênio (ERO)

e um efeito estabilizador do dano em membranas celulares. (FRITZ and ARRIGONI-MARTELLI, 1993).

Aproximadamente 75% da L-carnitina presente no nosso organismo é obtida a partir da dieta, que inclui principalmente produtos de origem animal, como carne vermelha e laticínios, sendo o restante originado da biossíntese endógena no fígado, rins e cérebro, a partir de aminoácidos precursores. (BREMER, 1983; HOPPEL, 2003).

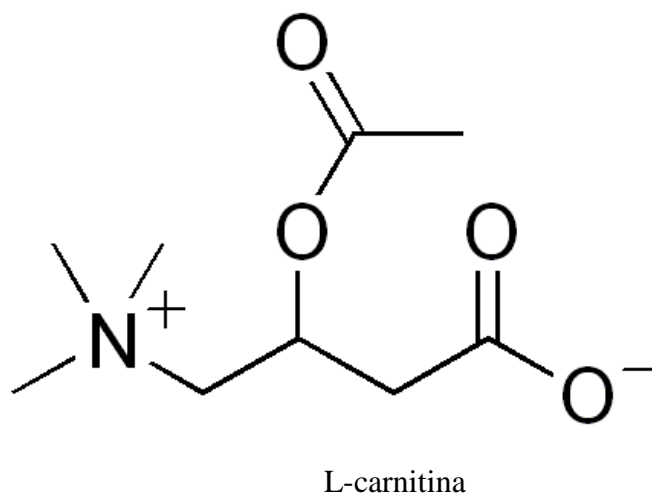


Figura 2 - Estrutura química da L-carnitina (adaptado de Evans e Fornasini, 2003)

1.3 Radicais livres e espécies reativas

Os átomos são compostos por um núcleo e por elétrons que se movem, em geral, aos pares ao redor do núcleo. Moléculas ou átomos que possuem elétrons não pareados no seu orbital mais externo são chamados de radicais livres. O desemparelhamento dos elétrons gera uma espécie com alta reatividade e energeticamente instável, tendendo, assim, a iniciar reações em cadeia a fim de retirar elétrons de moléculas vizinhas para preencher seu próprio orbital. (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O radical livre pode ter origem no ganho ou perda de um elétron de um não-radical, ou pode ser formado por um processo de fissão homolítica, em que uma ligação covalente é quebrada e cada elétron do par compartilhado permanece com cada um dos átomos envolvidos. (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

As espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas são parte integrante do metabolismo humano e sua produção é observada em diversas condições, por exemplo, na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria das células.

(HALLIWELL, 1994). Entre as principais ERO existe o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}). O H_2O_2 não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) por meio de reações enzimáticas. (ANDERSON, 1996). Além das ERO, também existem as ERN, as quais são representadas, principalmente, pelo óxido nítrico (NO^{\bullet}) e pelo peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$).

O radical hidroxila (OH^{\bullet}) é provavelmente o mais reativo entre as ERO. Este radical, quando formado, reage rapidamente e de forma inespecífica, podendo ser prejudicial a qualquer biomolécula. O radical hidroxila tem origem na reação entre o radical superóxido e o H_2O_2 ou através da reação deste último com metais de transição (reação de Fenton). Esse radical inicia reações em cadeia que originarão peróxidos lipídicos e radicais orgânicos. (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O $O_2^{\bullet-}$ também possui uma elevada reatividade. No entanto, sua solubilidade em lipídeos é limitada, mas mesmo assim é capaz de gerar o OH^{\bullet} por reação não-enzimática com o H_2O_2 , via reação de Haber-Weis. Em geral, o radical superóxido é gerado fisiologicamente pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou pela ação da fagocitose celular. No que diz respeito à reatividade radicalar, o óxido nítrico (NO) não se destaca, mas, entretanto, é de suma importância na vasoregulação e na neurotransmissão, onde o excesso desse radical livre pode muitas vezes ser citotóxico. (HALLIWELL, 1996; HALLIWELL, 2001).

As ERO e as ERN são indispensáveis para muitos processos bioquímicos, como comunicação intracelular, defesa contra agentes infecciosos, apoptoses, desde que essas espécies se encontrem em baixos níveis. Já uma produção excessiva desses radicais pode dar origem a um estado pró-oxidante que favorece o dano a biomoléculas. (HALLIWELL, 1996; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

1.4 Estresse Oxidativo

As espécies reativas do oxigênio são originadas no organismo humano como subprodutos inevitáveis do metabolismo aeróbico (figura 3) ou a partir de fontes exógenas, como dieta inadequada, consumo exagerado de álcool, tabaco, uso de quimioterápicos, exposição às radiações ionizante e eletromagnética. Para evitar a ação tóxica desses compostos, os seres vivos desenvolveram, ao longo de sua evolução, mecanismos de defesa, tanto enzimáticos, representados pela atividade das enzimas catalase, superóxido-dismutase e

glutationa-peroxidase, quanto não-enzimáticos, representados por diversos compostos como a glutationa reduzida (GSH), o ácido ascórbico, α -tocoferol, bilirrubina, ubiquinol, entre outros. (HALLIWELL e GUTERRIDGE, 2007; HALLIWELL, 2006). O organismo humano está, normalmente, em equilíbrio entre a produção e degradação de radicais livres, que existem em baixas concentrações em todos os tecidos biológicos. (WULF, 2001).

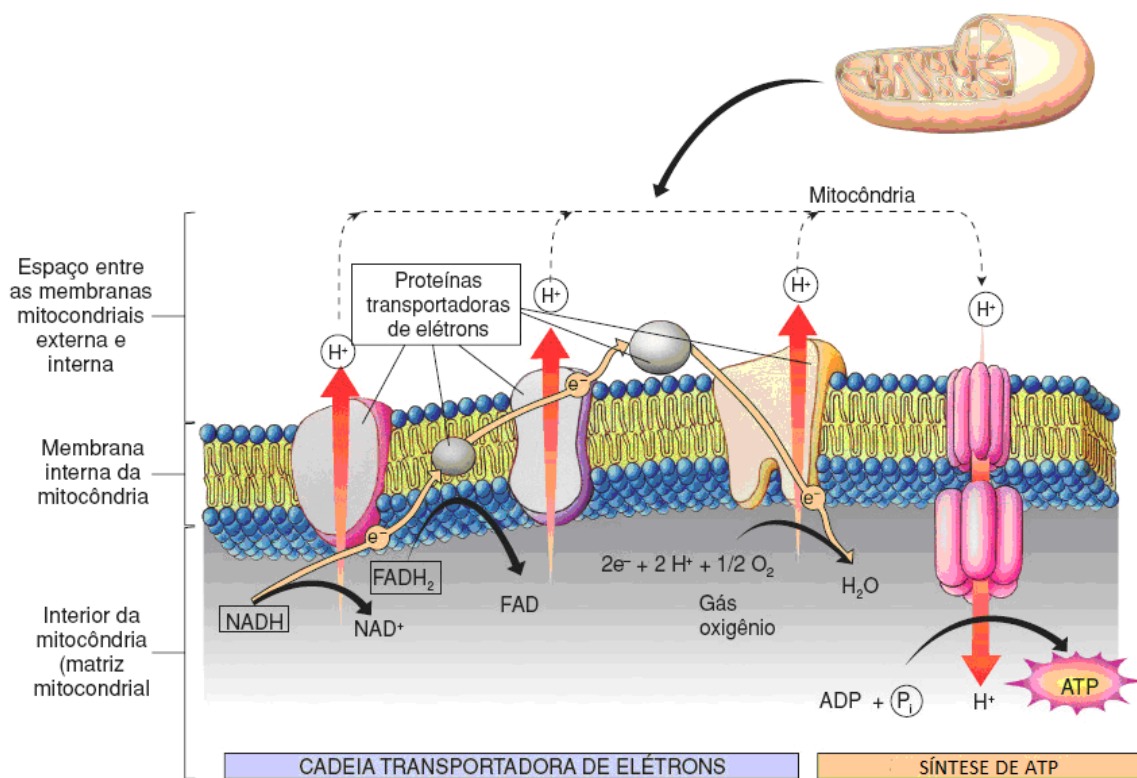


Figura 3 - Cadeia transportadora de elétrons. (LEMM, 2011)

No entanto, algumas situações patológicas podem levar a um desequilíbrio, seja diminuindo as defesas antioxidantes, seja por uma maior produção de espécies reativas ou até de uma combinação de ambas as situações. Assim sendo, o termo estresse oxidativo refere-se a um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a ação das defesas antioxidantes, levando a um dano potencial. O estresse oxidativo pode resultar em danos a diversas biomoléculas no organismo, tais como lipídeos, proteínas e DNA, acarretando em alterações em suas estruturas ou funções e, conseqüentemente, interferindo na homeostase celular. (HALLIWELL e GUTERRIDGE, 2007) (figura 4).

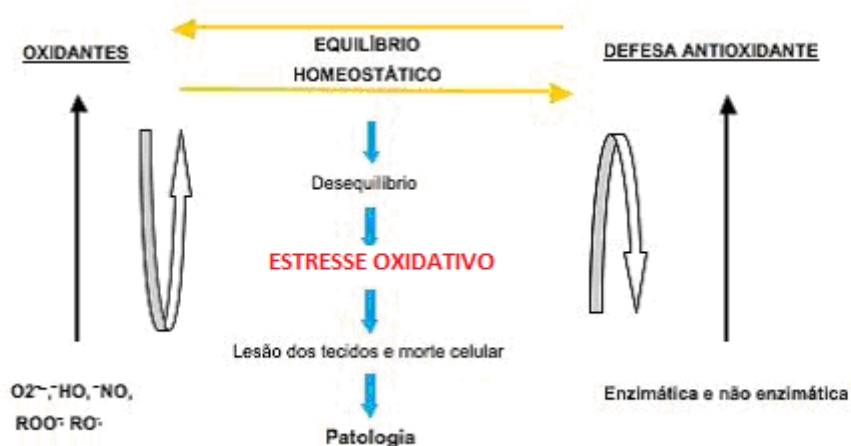


Figura 4 - O processo do estresse oxidativo. (SISTEMA ORGÂNICO HUMANO, 2014)

Nos últimos anos, muita atenção tem sido focada nos radicais livres como mediadores do dano tecidual em doenças humanas. O estresse oxidativo já foi demonstrado em diversas doenças crônico-inflamatórias, vasculares, neoplásicas e neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla. (HENRIQUES e SALVADOR, 2005).

O dano oxidativo pode ocorrer em todos os tecidos humanos, entretanto, o cérebro parece ser o mais suscetível a este tipo de lesão, provavelmente por ser um tecido com elevado consumo de oxigênio. Além disso, há uma grande quantidade de lipídios poliinsaturados nas membranas neuronais, sendo assim muito propensas a lipoperoxidação. Junto a isso, existem também neurotransmissores auto-oxidáveis e geram radicais livres e um baixo nível de defesas antioxidantes a nível cerebral. (HALLIWELL and GUTTERIDGE, 2007).

1.4.1 Estresse Oxidativo nas Acidúrias Orgânicas e Outros Erros Inatos do Metabolismo

Diversos autores demonstraram que o estresse oxidativo tem um papel importante em vários EIM. O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes ocorrem em algumas acidemias, como na acidemia glutárica. (KOLKER et al., 2001; LATINI et al., 2005; LATINI et al., 2007), propiônica e metilmalônica. (FONTELLA et al., 2000), em aminoacidopatias como a homocistinúria (STRECK et al., 2001; STEFANELLO et al., 2005, VANZIN et al., 2011), tirosinemia tipo 1 (BIRD et al., 1995), fenilcetonúria (SIERRA et al., 1998; ARTUCH et al., 2001; HAGEN et al., 2002; ARTUCH et al., 2004; SIRTORI et al., 2005; SITTA et al., 2006), e doença da urina do xarope do bordo (FONTELLA et al., 2002,

BARSCHAK et al., 2008) e na doença peroxissomal adrenoleucodistrofia ligada ao X. (VARGAS et al., 2004; DEON et al., 2006).

Estudos têm sugerido que o estresse oxidativo pode contribuir para o dano neurológico observado nestas doenças, uma vez que o acúmulo de metabólitos tóxicos que ocorre nessas desordens pode levar a uma excessiva produção de espécies reativas. (WAJNER et al., 2004; RIBAS et al., 2010). Nesse contexto, estudos *in vitro* e em modelos animais demonstraram que os ácidos glutárico e 3-hidróxi-glutárico são capazes de estimular a produção de ERO e a lipoperoxidação, bem como diminuir as defesas antioxidantes em cérebro de ratos. (LATINI et al., 2005; LATINI et al., 2007; MAGNI et al., 2009; FIGHERA et al., 2006; OLIVEIRA MARQUES et al., 2003; FERREIRA et al., 2007; WAJNER et al., 2004). É importante enfatizar que, apesar dos estudos em animais, não há dados na literatura sobre a ocorrência de estresse oxidativo em pacientes com 3-HMG.

Fontella et al (2002) observaram que os aminoácidos leucina, isoleucina e valina e os respectivos alfa-cetoácidos acumulados na Doença do Xarope do Bordo são capazes de estimular a lipoperoxidação em homogeneizados de cérebro de ratos. Em 2013, Fernandes et al (2013) observaram que o ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico e o ácido 3-metilglutárico induzem danos oxidativos em proteínas e lipídeos no córtex de ratos Wistar. No que tange as defesas antioxidantes enzimáticas, estes autores demonstraram que os dois ácidos orgânicos foram capazes de reduzir as concentrações de GSH e as atividades da superóxido-dismutase e da glutatona-redutase, além de aumentar a atividade da glutatona-peroxidase.

Considerando, os estudos em modelos animais mostrando evidências de estresse oxidativo na 3-HMG, e a inexistência de estudos em pacientes portadores desta doença, tornam-se importantes estudos que abordem a investigação de dano oxidativo em pacientes com 3-HMG, bem como a avaliação do efeito da carnitina sobre este processo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral foi avaliar parâmetros de estresse oxidativo em pacientes portadores de 3-HMG bem como o efeito da terapêutica com L-carnitina sobre o dano oxidativo.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo em amostras de plasma dos pacientes portadores de 3-HMG, obtidas no momento do diagnóstico e após a instituição do regime terapêutico:

- a. Dano a lipídios através da dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS);
- b. Dano a proteínas através de:
 - i. Dosagem de tiois totais;
 - ii. Dosagem de proteínas carboniladas.

2.2.2 Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo em amostras de urina dos pacientes portadores de 3-HMG, antes e após a instituição do tratamento:

- a) Dano a proteínas através de dosagem de di-tirosina;
- b) Avaliação de antioxidantes através da capacidade antioxidante.

2.2.3 Avaliar os níveis de carnitina livre e isovalerilcarnitina em amostras de sangue total dos pacientes portadores de 3-HMG, antes e após a instituição do tratamento.

3. Resultados

INCREASED OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARIC ACIDURIA

Artigo submetido à revista Molecular and Cellular Biochemistry.

Mariana dos Santos Mello^{a,b}, Graziela Schmitt Ribas^b, Carlos Alberto Yasin Wayhs^b, Tatiane Hammerschmidt^b, Gilian Batista Balbuena Guerreiro^b, Jéssica Lamberty Favenzani^b, Ângela Sitta^b, Daniella de Moura Coelho^b, Moacir Wajner^{b,c}, Carmen Regla Vargas^{a, b, c}

Corresponding authors:

Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos 2350.

Bairro: Bom Fim

Porto Alegre, RS, 90035-903 – Tel/Fax: (55-51) 33598309

E-mail: msmello2508@gmail.com (Mariana dos Santos Mello)

crvargas@hcpa.ufrgs.br (Carmen Regla Vargas)

Abstract

3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria (3-HMG) is a rare autosomal recessive disorder, caused by the deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase, which results in the accumulation of 3-hydroxy-3-methylglutaric (HMG) and 3-methylglutaric (MGA) acids in tissues and biological fluids of affected individuals. Recent *in vivo* and *in vitro* animal studies have demonstrated that the accumulation of these metabolites can disturb the cellular redox homeostasis, which can contribute to the neurological manifestations presented by the patients. So, in the present work, we investigated oxidative stress parameters in plasma and urine samples from 3-HMG patients, obtained at the moment of the diagnosis of this disorder and during the therapy with low-protein diet and L-carnitine supplementation. It was verified that untreated 3-HMG patients presented higher levels of urinary di-tyrosine and plasma

^a Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Ipiranga 2752, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil.

^b Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil.

^c Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Ramiro Barcelos 2700, Porto Alegre, RS, 90035-000, Brazil.

thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), which are markers of protein and lipid oxidative damage, respectively, as well as a reduction of urinary antioxidant capacity. Treated 3-HMG patients also presented an increased protein oxidative damage, as demonstrated by their higher concentrations of plasma protein carbonyl group and urinary di-tyrosine, as well as by the reduction of total sulfhydryl groups in plasma, in relation to controls. On the other hand, 3-HMG patients under therapy presented normal levels of TBA-RS and urinary antioxidant capacity, which can be related, at least in part, to the antioxidant and antiperoxidative effects exerted by L-carnitine. The results of this work are the first report showing that a redox imbalance occurs in patients with 3-HMG what reinforces the importance of the antioxidant therapy in this disorder.

Keywords: 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria; organic acidurias; carnitine; oxidative stress; oxidative damage

1. Introduction

3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria (3-HMG) is an autosomal recessive neurometabolic disorder caused by a deficient activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL, EC 4.1.3.4), which catalyzes the cleavage of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) in the final step of leucine catabolism and in the ketogenic pathway [1,2]. As a consequence of this defect, high amounts of 3-hydroxy-3-methylglutaric (HMG), 3-methylglutaric (MGA), 3-methylglutaconic and 3-hydroxyisovaleric acids accumulate in the tissues of the affected patients and these organic acids are excreted in high concentrations in the urine of them [3]. Besides, smaller, but appreciable levels of glutaric, adipic and other dicarboxylic acids may also be excreted in the urine, especially during metabolic decompensation [4]. Although 3-HMG is a rare disease, it has a high incidence in Saudi Arabia and it is among the most prevalent organic acidurias detected in Brazilian and Portuguese population [5,6].

3-HMG often leads to life-threatening illness in the neonatal period and in childhood, with acute episodes characterized by vomiting, diarrhea, dehydration, hypothermia, apnea, hepatomegaly and cardiomyopathy, as well as neurological dysfunction manifested by macrocephalia, lethargy, hypotonia, seizures and developmental delay [6-10]. Biochemically, patients present metabolic acidosis, hyperammonaemia, elevated transaminases and hypoketotic hypoglycemia during the crises which are caused especially by infections,

prolonged fasting or digestive disorders [6,11]. 3-HMG may progress rapidly to coma and death or result in permanent neurological damage, unless promptly treated [12]. Long-term treatment consists in limited fasting time, continuous low protein diet, high carbohydrate intake and L-carnitine supplementation [13].

The pathophysiology of this disease is only partially understood, but it is believed that the deficit of ketone bodies, the intracellular accumulation of toxic organic acids and secondary carnitine deficiency may contribute in some way to the damage observed in this disorder [14-16]. In this context, previous *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that HMG and MGA may induce lipid and protein oxidation and reduce the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in cerebral cortex, striatum and liver of rats [17-19]. Furthermore, the administration of antioxidants such as N-acetylcysteine, melatonin, vitamins C and E and N-nitro-L-arginine methyl ester (a nitric oxide synthase inhibitor) was able to prevent the lipid peroxidation and also the alterations in the antioxidant defenses elicited by HMG, suggesting the involvement of reactive oxygen and nitrogen species in these damages [20]. However, despite the findings obtained from animal studies, the occurrence of oxidative stress in patients with 3-HMG has not been confirmed.

L-carnitine is a vital endogenous component of lipid metabolism necessary for ATP production through the β -oxidation of fatty acids in the mitochondrial matrix [21,22]. In addition to its role in the energy metabolism, L-carnitine has been used as an important adjuvant for the therapy of patients with some organic acidurias, including 3-HMG, in an attempt to facilitate the elimination of toxic acyl groups and presumably to replenish the decreased stores of free carnitine, as well as to release CoASH for essential oxidative pathways. Furthermore, antioxidant properties have been demonstrated for L-carnitine in several pathologies, including in some inborn errors of metabolism [22-24].

Therefore, in the present work, we investigated parameters of lipid and protein oxidation, as well as antioxidant defenses, in plasma and urine from 3-HMG patients at the moment of diagnosis and during the treatment with low-protein diet and L-carnitine supplementation (100 mg/kg/day) in order to verify if oxidative oxidative stress occurs *in vivo* in the affected patients and if therapy with carnitine and protein restriction may exert a protective role on this process.

2. Material and Methods

2.1 Patients and controls

Subjects with 3-HMG were recruited from the Medical Genetic Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Blood and urine samples were obtained at diagnosis (Group A) and during treatment (Group B). Total blood and plasma samples obtained from 5 patients at diagnosis (median age 1.8 years, range 0.25-3.3 years), and from 6 patients under treatment (median age 9 years, range 0.3-17.8 years) and urine samples from 7 patients at diagnosis (median age 4.5 years, range 0.1 - 9 years) and from 7 patients under treatment (median age 6.4 years, range 0.3-13 years) were used to evaluate the different parameters of oxidative stress. The median of treatment duration was 3 years (range 0.1 -6 years). All patients were diagnosed in our laboratory by identification of abnormal patterns of organic acids in urine by gas chromatography coupled to mass spectrometry according Sweetman (1991) [25], with slight modifications, and by the profile of acylcarnitines in plasma by tandem mass spectrometry. Treatment consisted of a protein-restricted diet supplemented with L-carnitine (100 mg/kg/day). The control group consisted of total blood plasma and urine from 6 aged-matched healthy children (median age 5 years, range 2 months - 10 years). The main clinical and laboratorial features presented by patients at diagnosis were hypoglycemia, metabolic acidosis, vomiting, lethargy.

The present study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (n°13-0284), RS, Brazil. Informed consent was obtained according to the guidelines of our Committee.

2.2 Samples collection and preparation

Whole blood samples obtained from fasting individuals (controls and patients) by venous puncture with heparinized vials were centrifuged at 1000 g for 20 min at 4°C and plasma was removed by aspiration and frozen at -80°C until analysis. Urine samples were collected in sterile flask and frozen at -80 °C until analysis.

2.3 Free L-carnitine and isovalerylcarnitine determination

Free L-carnitine and isovalerylcarnitine levels were determined in blood spots by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) using the multiple reaction monitoring (MRM) mode and the results were reported in $\mu\text{mol/L}$ [26].

2.4 Protein carbonyl groups determination

Protein carbonyl groups were measured according to the method described by Levine et al. (1990) [27]. Briefly, triplicate aliquots of plasma (100 μL) were treated with 100 μL of 28% trichloroacetic acid. The tubes were centrifuged at 8000 g for 10 min to obtain the protein pellet. The supernatant was carefully aspirated and discarded. One milliliter of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) prepared in 2 M HCl or 1.0 mL of 2 M HCl (blank) were added to the precipitate and incubated at 37°C for 90 min. After the samples were centrifuged (8000 g, 10 min) and the dinitrophenylhydrazine excess was removed with ethanol–ethyl acetate 1:1 (v/v). The final protein pellet was dissolved in 200 μL of 6 M guanidine hydrochloride. Quantification was performed using a spectrophotometer at 370 nm. The carbonyl content was calculated using a millimolar absorption coefficient of the hydrazone ($21.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Values of carbonyl content were expressed in nmol carbonyl/mg protein.

2.5 Total sulfhydryl (SH) groups determination

This assay is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative whose absorption is measured spectrophotometrically at 412nm [28]. Thirty microliters of plasma were incubated with an equal volume of DTNB at room temperature for 30min in a dark room. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were reported as nmol TNB/mg protein.

2.6 Thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) measurement

Thiobarbituric acid-reactive substances were determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979) [29]. Briefly, in a properly labeled tube was added 100 μl of plasma, 50 μl of sodium dodecyl sulfate (SDS) 8%, 375 μl of acetic acid 20% pH 3.5 and 375 μl of 0.8% thiobarbituric acid. The test tube was incubated at 100 °C for 60 min. The mixture was allowed to cool on water for 5 min. The samples were centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min. The resulting pink stained TBA-RS were determined in a spectrophotometer at 535 nm. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane subjected to the same treatment as that of the samples. Results were expressed as nmol TBA-RS/mg protein.

2.7 Di-tyrosine autofluorescence determination

In order to determine in urine the levels of protein oxidation, the intensity of fluorescence of di-Tyr was measured according to the method described by Kirschbaum (2002) [30] using a SpectraMax M2e (MolecularDevices, USA) microplate reader at wavelengths of 315 and 410 nm (excitation and emission, respectively). Results were expressed as fluorescence units per mg urinary creatinine (FU/mg Cr).

2.8 Urinary antioxidant capacity determination

The urinary antioxidant capacity was determined using a chemical assay (Antioxidant Assay Kit, Cayman Chemical, 709001). This assay relies on the ability of antioxidants in the sample to inhibit the oxidation of ABTS (2,2'-azino-di-3-ethylbenzothiazoline sulphonate) by metmyoglobin. The amount of oxidized ABTS can be monitored by detecting the absorbance at 750 nm or 405 nm. The antioxidants in the sample cause suppression of the absorbance to a degree which is proportional to their concentration. The capacity of the antioxidants in the sample to prevent ABTS oxidation is compared to that of trolox, a water-soluble tocoferol analogue, allowing to evaluate the urinary antioxidant status to be expressed as micromolar trolox equivalents per mg urinary creatinine.

2.9 Protein determination

Plasma protein concentrations were determined by the Biuret method using the commercial kit of Labtest® (Labtest Diagnóstica, MG, Brazil).

2.10 Urinary creatinine

Creatinine was determined by picric acid method — Creatinine K kit of Labtest® (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil). Urinary creatinine reacts with picric acid under alkaline conditions producing an orange color whose absorbance was determined in a spectrophotometer at 492 nm.

2.11 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation. Comparison between means was analyzed by one-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test when the F value was significant. A P value lower than 0.05 was considered significant. All analyses were

performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software, version 15.0, in a PC-compatible computer.

3. Results

In this study we evaluated *in vivo* oxidative stress parameters in plasma and urine from untreated 3-HMG patients (group A) and in patients treated with protein-restricted diet and L-carnitine supplementation (group B). Diagnosis was established by high levels of organic acids in urine as well as by elevated concentrations of blood isovalerylcarnitine (controls 0.45 ± 0.18), group A 4.81 ± 0.47 , group B 3.90 ± 3.32 , average \pm standard deviation) [F (2,10) = 7.53, P<0.05]. The parameters of lipid and protein oxidative damage, as well as the urinary antioxidant capacity and blood free carnitine levels, were compared to those of controls with similar ages. Table 1 shows free carnitine levels in total blood of patients and controls. It can be observed a significant decrease of free carnitine at diagnosis when compared to controls. Otherwise L-carnitine supplementation was able to significantly increase free carnitine levels, that became similar to controls [F (2,13) = 12.53, P<0.01]. As demonstrated in figure 1, we initially verified that TBA-RS, a parameter of lipid peroxidation, was markedly increased in plasma from 3-HMG patients at diagnosis as compared to controls [F(2,11) = 4.68, P< 0.05]. These patients also presented increased levels of di-tyrosine [F(2,13) = 6.04, P< 0.05] (figure 2) and reduced antioxidant capacity in the urine [F(2,16) = 8.83, P< 0.01] (figure 3), indicating a possible imbalance between the production of reactive species and the antioxidant defenses in this disease, which is probably inducing to protein and lipid oxidative damages observed in these patients.

Furthermore, we also observed that 3-HMG patients under treatment presented lower levels of TBA-RS and higher urinary antioxidant capacity when compared to the untreated patients, indicating a protective role of the treatment on these processes. In addition, TBA-RS and the urinary antioxidant capacity levels in the patients of group B were similar to controls, suggesting the correction of lipid peroxidation by the therapy. On the other hand, the parameter of protein oxidative damage di-tyrosine was higher in the urine, from group B patients in relation to controls, as well as carbonyl formation [F(2,13) = 5.87, P< 0.05] (figura 4). Corroborating with these findings, total plasma sulfhydryl groups were also reduced in the treated patients [F(2,11) = 4.90, P< 0.05] (figure 5), confirming the occurrence of oxidative damage to proteins in 3-HMG patients even during the treatment.

4. Discussion

Although 3-hydroxy-3-methylglutaric and 3-methylglutaric acids are considered neurotoxic agents in 3-HMG, the mechanisms underlying the neurological symptoms and the brain abnormalities presented by the patients are poorly known. In an attempt to contribute to the understanding of the pathophysiology of this disease, previous studies have demonstrated that these metabolites compromise the redox homeostasis in cerebral cortex, striatum and liver from rats [17,18,31]. Furthermore, MGA was able to inhibit the activity of Na^+, K^+ -ATPase in rat brain, and this effect was associated with an increased free radicals generation [32]. So, in this work, we aimed to investigate oxidative stress parameters in biological fluids from 3-HMG patients and verify if the therapy with protein restriction and L-carnitine supplementation could exert some influence on this process.

We initially verified that TBA-RS, which reflects the malondialdehyde formation, an end product of membrane fatty acid peroxidation [33], was increased in untreated 3-HMG patients, suggesting an increase of lipid peroxidation in these patients. This observation is in accordance with previous *in vitro* findings showing that both HMG and MGA acids increase TBA-RS levels in rat brain [19], and with a recent work showing that the *in vivo* intrastriatal administration of these organic acids in rats induce a higher MDA formation in this brain tissue [17]. Besides increased lipid peroxidation, untreated 3-HMG patients also presented increased protein oxidative damage, demonstrated by their higher levels of di-tyrosine, when compared to healthy individuals. Di-tyrosine is formed by free-radical attack on a wide range of proteins and it has been proposed as a good indicator of protein oxidation [34]. It arises from the tyrosine radical, which can be generated by many reactive species, including hydroxyl radicals and peroxynitrite [35].

Although untreated 3-HMG patients have presented normal levels of protein carbonyl groups, increased protein carbonyl formation and reduced levels of plasma sulfhydryl groups were observed in 3-HMG patients during the treatment, which suggest that protein oxidative damage occurs in this disorder. It's important to emphasize that there is a tendency of reduction in sulfhydryl groups at the diagnosis moment in these patients. This hypothesis is reinforced by previous studies showing that *in vivo* administration of HMG and MGA acids induces protein oxidative damage in rat brain. It was also demonstrated that these metabolites can provoke a decrease in the reduced glutathione concentrations (GSH) in rat brain [17,31]. If GSH is also reduced in the blood of 3-HMG patients, it may be probably contributing to the lower levels of total sulfhydryl groups presented by them.

The results of this work also showed that untreated 3-HMG patients present reduced urinary antioxidant capacity when compared to the controls. This reduction can be a consequence of a reduced bioavailability of antioxidants in the blood of these patients, such as vitamins, dietary antioxidants and endogenous antioxidants as albumin, uric acid and coenzymeQ10 in an attempt to neutralize the increased production of reactive species that occurs in this disorder. This observation is in accordance with previous data published by Leipnitz et al. (2008) [18] showing that 3-hydroxy-3-methylglutarate significantly reduced the non enzymatic antioxidant defenses total-radical trapping antioxidant potential (TRAP), the total antioxidant reactivity (TAR) and GSH levels in rat cerebral cortex.

It is important to emphasize that secondary deficiency of free carnitine, that was observed in our study, is a common finding in patients with organic acidurias (including in 3-HMG), since carnitine conjugates with the accumulating organic acids in these disorders in order to facilitate their elimination in the urine as acylcarnitines. Carnitine is a vital component of the energy metabolism and it has demonstrated antioxidant properties in several *in vitro* and *in vivo* studies, and also in neurodegenerative pathologies [36]. Therefore, considering this aspect, it is possible that the increased lipid peroxidation and reduced urinary antioxidant capacity observed in untreated 3-HMG patients can be related, at least in part, to the deficiency of free carnitine, as well as to the accumulation of toxic metabolites which can lead to mitochondrial dysfunction and oxidative stress by mechanisms not yet well established [37].

Taken together the present data strongly suggest that an imbalance in the redox homeostasis occurs in 3-HMG patients, which can damage biomolecules and can lead to cell death. These alterations in the protein structure by oxidants may affect the function of receptors, enzymes and transport proteins, resulting in a partial or complete loss of the protein functionality [27,38]. Moreover, peroxidative damage to membrane lipids is known to affect membrane viscosity and barrier function and can cause diminished ATP production with subsequent neuronal dysfunction [39]. Therefore, it is conceivable that the protein and lipid oxidative damages verified in the present work may underlie the tissue injury found in 3-HMG patients, especially because during acute metabolic decompensation the concentrations of the accumulating organic acids may increase dramatically [37].

On the other hand, we verified in this work that 3-HMG patients under treatment with low protein diet and L-carnitine supplementation presented lower levels of lipid peroxidation and increased urinary antioxidant capacity in relation to the untreated patients. Although we

can not affirm that these effects were only due to L-carnitine supplementation, in the last years several works have demonstrated that this compound can prevent lipid oxidative damage by different mechanisms, such as by inhibiting xanthine oxidase activity, by scavenging free radicals and chelating the iron required for the generation of hydroxyl radicals [40,41] or by facilitating fatty acid transport, thereby lowering the availability of lipids for peroxidation [42]. Reinforcing our findings, L-carnitine supplementation was also able to prevent lipid peroxidation in other inborn errors of metabolism, such as in phenylketonuria [43], in maple syrup urine disease [24,44] and in disorders of propionate metabolism [45].

However, we verified that protein oxidation remained high in 3-HMG patients during the treatment. Interestingly, protein carbonyl groups can circulate for longer periods in the blood of patients when compared with other parameters of oxidative stress, such as the lipid peroxidation product malondialdehyde [46]. Furthermore, carbonyl groups are relatively difficult to induce and may be reflective of more severe cases of oxidative stress [47]. Because the relative stability of oxidised proteins, it is possible that the antioxidant properties of L-carnitine are not sufficient to counter such damage.

5. Conclusions

In conclusion, we reported for the first time that oxidative stress is increased in patients with 3-HMG, which corroborates with previous studies realized in animal tissues. This finding reinforces the importance of the antioxidant therapy in this disorder and demonstrates the fundamental role of L-carnitine supplementation to 3-HMG affected patients, not only by helping to remove the intracellular toxic compounds accumulating in this organic aciduria, but also by contributing to the redox status regulation and prevention of lipid oxidative damage.

6. Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

7. Acknowledgements

The authors are grateful to the patients, their families and the physicians of the patients. This work was supported in part by grants from CNPq, FAPERGS and FIPE/HCPA-Brazil.

8. References

- K. F. Faull, P. D. Bolton, B. Halpern, J. Hammond, D. M. Danks. The urinary organic acid profile associated with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, *Clin Chim Acta*. (1976) (3) 553-559.
- S. J. Wysocki, S. P. Wilkinson, R. Hähnel, C. Y. Wong, P. K. Panegyres. 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria, combined with 3-methylglutaconic aciduria, *Clin Chim Acta*. (1976) (3) 399-406.
- R. A. Chalmers and A. M. Lawson. Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias. 1st ed. London: Chapman and Hall. (1982) 221–229.
- K. M. Gibson, J. Breuer, W. L. Nyhan. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: review of 18 reported patients, *Eur J Pediatr*. (1988) 180-186.
- M. Wajner, D. M. Coelho, R. Ingrassia, A. B. de Oliveira, E. N. Busanello, K. Raymond, R. Flores Pires, C. F. de Souza, R. Giugliani, C. R. Vargas. Selective screening for organic acidemias by urine organic acid GC-MS analysis in Brazil: fifteen-year experience, *Clin Chim Acta*. (2009) 77-81.
- C. R. Vargas, A. Sitta, G. Schmitt, G. C. Ferreira, M. L. Cardoso, D. Coelho, K. M. Gibson, M. Wajner. Incidence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase (HL) deficiency in Brazil, South America, *J Inherit Metab Dis*. (2007).
- L. Sweetman, J. C. Williams. Branched chain organic acidurias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill. (2001) 1387–1422.
- D. I. Zafeiriou, E. Vargiami, E. Mayapetek, P. Augoustidou-Savvopoulou, G. A. Mitchell. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase deficiency with reversible white matter changes after treatment, *Pediatr Neurol*. (2007) 47-50.
- K. M. Gibson, S. B. Cassidy, L. H. Seaver, R. J. Wanders, N. G. Kennaway, G. A. Mitchell, R. P. Spark. Fatal cardiomyopathy associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency, *J Inherit Metab Dis*. (1994) 291-294.
- S. Funghini, E. Pasquini, M. Cappellini, M. A. Donati, A. Morrone, C. Fonda, E. Zammarchi. 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria in an Italian patient is caused by a new nonsense mutation in the HMGCL gene, *Mol Genet Metab*. (2001) 268-275.
- S. Pierron, H. Giudicelli, M. Moreigne, A. Khalfi, G. Touati, C. Caruba, M. O. Rolland, C. Acquaviva. Late onset 3-HMG-CoA lyase deficiency: a rare but treatable disorder, *Arch Pediatr*. (2010) 10-13.
- G. Lyon, R. D. Adams, E. H. Kolodny. The neurology of neonatal hereditary metabolic diseases. In: Lyon G. *Neurology of hereditary metabolic diseases of children*. 2.Ed. New York: Mc Graw-Hill. (1996) 6-44.

M. Dasouki, D. Buchanan, N. Mercer, K. M. Gibson, J. Thoene. 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria: response to carnitine therapy and fat and leucine restriction. *J Inher Metab Dis.* (1987) 142-146.

S. G. Kahler, W. G. Sherwood, D. Woolf, S. T. Lawless, A. Zaritsky, J. Bonham, C. J. Taylor, J. T. Clarke, P. Durie, J. V. Leonard. Pancreatitis in patients with organic acidemias, *J Pediatr.* (1994) 239-243.

G. A. Mitchell, C. Jakobs, K. M. Gibson, M. F. Robert, A. Burlina, C. Dionisi-Vici, L. Dallaire. Molecular prenatal diagnosis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency, *Prenat Diagn.* (1995) 725-729.

A. A. Leung, A. K. Chan, J. A. Ezekowitz, A. K. Leung. A Case of Dilated Cardiomyopathy Associated with 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A (HMG CoA) Lyase Deficiency, *Case Rep Med.* (2009) 183125.

C. G. Fernandes, M. S. da Rosa, B. Seminotti, P. Pierozan, R. W. Martell, V. L. Lagranha, E. N. Busanello, G. Leipnitz, M. Wajner. *In vivo* experimental evidence that the major metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency induce oxidative stress in striatum of developing rats: a potential pathophysiological mechanism of striatal damage in this disorder, *Mol Genet Metab.* (2013) 144-153.

G. Leipnitz, B. Seminotti, J. Haubrich, M. B. Dalcin, K. B. Dalcin, A. Solano, G. de Bortoli, R. B. Rosa, A. U. Amaral, C. S. Dutra-Filho, A. Latini, M. Wajner. Evidence that 3-hydroxy-3-methylglutaric acid promotes lipid and protein oxidative damage and reduces the nonenzymatic antioxidant defenses in rat cerebral cortex, *J Neurosci Res.* (2008) 683-693.

G. Leipnitz, B. Seminotti, C. G. Fernandes, A. U. Amaral, A. P. Beskow, da L. B. Silva, A. Zanatta, C. A. Ribeiro, C. R. Vargas, M. Wajner. Striatum is more vulnerable to oxidative damage induced by the metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency as compared to liver, *Int J Dev Neurosci.* 2009 351-356.

S. Ulker, P. P. McKeow, U. Bayraktutan. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of NOS and NADPH oxidase activities, *Hypertension.* (2003) 534-539.

A. Vanella, A. Russo, R. Acquaviva, A. Campisi, C. Di Giacomo, V. Sorrenti, M. L. Barcellona. L-propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector, *Cell Biol Toxicol.* (2000) 99-104.

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

G. S. Ribas, C. R. Vargas, M. Wajner. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders, *Gene* (2014) 469-476.

C. P. Mescka, C. A. Wayhs, C. S. Vanzin, G. B. Biancini, G. Guerreiro, V. Manfredini, C. Souza, M. Wajner, C. S. Dutra-Filho, C. R. Vargas. Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: l-carnitine effect, *Int J Dev Neurosci.* (2013) 21-24.

L. Sweetman. Organic acid analysis. In: *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics.* Edited by FA Hommes. Wiley-Liss, New York, 1991, pp 143-176.

- D.H. Chace, S. L. Hillman, J. L. Van Hove and E.W. Naylor. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry, *Clin Chem.* (1997) 2106-2113.
- R.L. Levine, D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. G. Lenz, B. W. Ahn. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* (1990) 464–478.
- M.Y. Aksenov, W. R. Markesbery. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci Lett.* (2001) 141–145.
- H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem.* (1979) 351-358.
- B. Kirschbaum. Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicators, *Clin Nephrol.* (2002) 344-349.
- M. S. da Rosa, B. Seminotti, A. U. Amaral, C. G. Fernandes, J. Gasparotto, J. C. Moreira, D. P. Gelain, M. Wajner, G. Leipnitz. Redox homeostasis is compromised *in vivo* by the metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency in rat cerebral cortex and liver, *Free Radic Res.* (2013) 1066-1075.
- C. A. Ribeiro, F. H. Hickmann, M. Wajner. Neurochemical evidence that 3-methylglutaric acid inhibits synaptic Na⁺, K⁺-ATPase activity probably through oxidative damage in brain cortex of young rats, *Int J Dev Neurosci.* (2011) 1-7.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Clarendon Press, Oxford.
- D. Il'yasova, P. Scarbrough, I. Spasojevic. Urinary biomarkers of oxidative status, *Clin Chim Acta.* (2012) 1446-1453.
- A. Van der Vliet, D. Smith, C. A. O'Neill, H. Kaur, V. Darley-Usmar, C. E. Cross, B. Halliwell. Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion, *Biochem J.* (1994) 295-301.
- V. Calabrese, A. M. Giuffrida Stella, M. Calvani, D. A. Butterfield. Acetylcarnitine and cellular stress response: Roles in nutritional redox homeostasis and regulation of longevity genes, *J Nutr Biochem.* (2006) 73–88.
- M. Wajner, A. Latini, A. T. Wyse, C. S. Dutra-Filho. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies, *J Inherit Metab Dis.* (2004) 427-248.
- B. Halliwell, M. Whiteman. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *Br J Pharmacol.* (2004) 231–255.
- M. P. Mattson. Metal-catalyzed disruption of membrane protein and lipid signaling in the pathogenesis of neurodegenerative disorders, *Ann N Y Acad Sci.* (2004) 37-50.

- I. Gülçin. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci.* (2006) 803–811.
- A. D. Muthuswamy, K. Vedagiri, M. Ganesan, P. Chinnakannu. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: role of L-carnitine and DL-alpha-lipoic acid, *Clin Chim Acta.* (2006) 84–92.
- P. J. Rani, C. Panneerselvam. Effect of L-carnitine on brain lipid peroxidation and antioxidant enzymes in old rats, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* (2002) 134–137.
- A. Sitta, C. S. Vanzin, G. B. Biancini, V. Manfredini, A. B. de Oliveira, C. A. Wayhs, G. O. Ribas, L. Giugliani, I. V. Schwartz, D. Bohrer, S. C. Garcia, M. Wajner, C. R. Vargas. Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients, *Cell Mol Neurobiol.* (2011) 429-436.
- C. Mescka, T. Moraes, A. Rosa, P. Mazzola, B. Piccoli, C. Jacques, G. Dalazen, J. Coelho, M. Cortes, M. Terra, C. Regla Vargas, C. S. Dutra-Filho. *In vivo* neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease, *Metab Brain Dis.* (2011) 21-28.
- G. S. Ribas, V. Manfredini, J. F. de Mari, C. Y. Wayhs, C. S. Vanzin, G. B. Biancini, A. Sitta, M. Deon, M. Wajner, C. R. Vargas. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation, *Int J Dev Neurosci.* (2010) 127-132.
- U. Pantke, T. Volk, M. Schmutzler, W. J. Kox, N. Sitte, T. Grune. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery, *Free Radic Biol Med* (1999) 1080–1086.
- I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, R. Colombo. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clin Chim Acta.* (2003) 23-38.

Table 1. Free carnitine concentrations in plasma from 3-HMG patients at diagnosis (group A) and during treatment with L-carnitine and low-protein diet (group B) and controls.

	Free carnitine ($\mu\text{mol/L}$)
Controls	40.43 ± 3.65
Group A	20.54 ± 1.85 *
Group B	32.06 ± 10.65

Data represent the mean \pm SD (controls: n=6; Group A: n=4, Group B: n=4). *p<0.05, compared to controls and treated patients (ANOVA, followed by Duncan multiple range test).

Legends

Fig 1. TBA-RS content in plasma from patients with 3-HMG and controls. Groups A and B represents 3-HMG patients at diagnosis and during treatment, respectively. Data represent the mean \pm SD (controls: n=5; Group A: n=3, Group B: n=6). *p<0.05, compared to controls; #p<0.05, compared to group A (ANOVA, followed by Duncan multiple range test).

Fig 2. Di-Tyrosine measurement in urine from patients with 3-HMG and controls. Groups A and B represents 3-HMG patients at diagnosis and during treatment, respectively. Data represent the mean \pm SD (controls: n=4; Group A: n=7, Group B: n=5). *p<0.05, compared to controls (ANOVA, followed by Duncan multiple range test).

Fig 3. Antioxidant capacity measurement in urine from patients with 3-HMG and controls. Groups A and B represents 3-HMG patients at diagnosis and during treatment, respectively. Data represent the mean \pm SD (controls: n=5; Group A: n=6, Group B: n=7). *p<0.05, compared to controls; #p<0.05, compared to group A (ANOVA, followed by Duncan multiple range test).

Fig 4. Carbonyl formation in plasma from patients with 3-HMG and controls. Groups A and B represents 3-HMG patients at diagnosis and during treatment, respectively. Data represent the mean \pm SD (controls: n=5; Group A: n=5, Group B: n=6). *p<0.05, compared to controls (ANOVA, followed by Duncan multiple range test).

Fig 5. Sulfhydryl content in plasma from patients with 3-HMG and controls. Groups A and B represents 3-HMG patients at diagnosis and during treatment, respectively. Data represent the mean \pm SD (controls: n=5; Group A: n=3, Group B: n=6). *p<0.05, compared to controls (ANOVA, followed by Duncan multiple range test).

Figure 1.

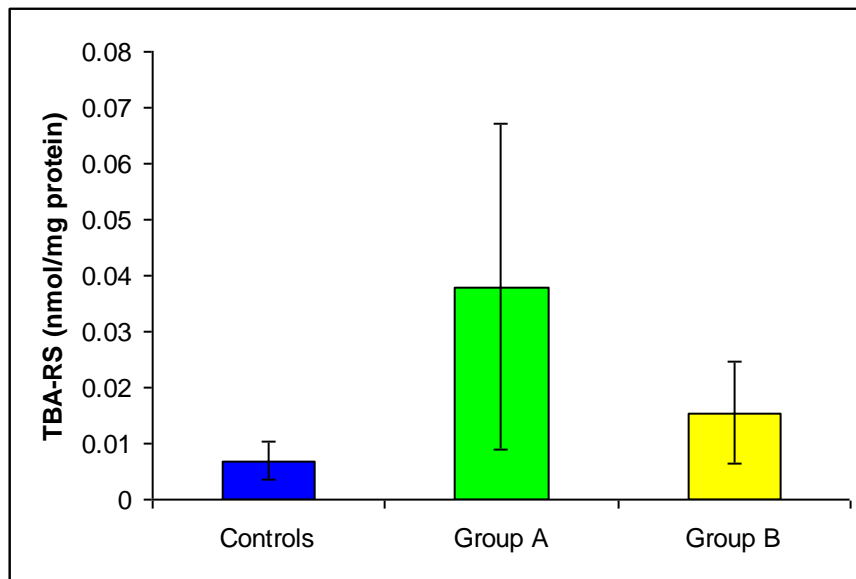


Figure 2.

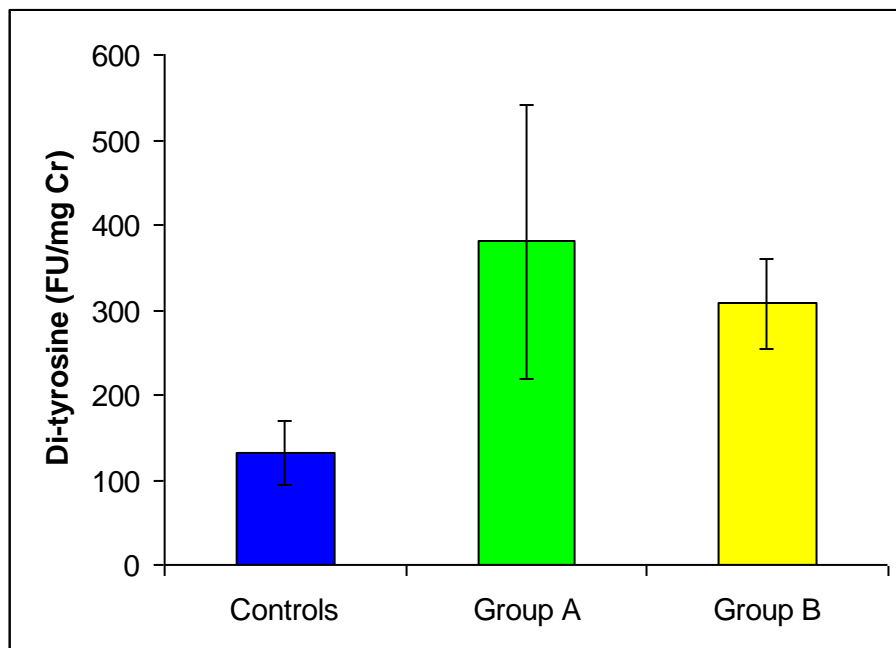


Figure 3.

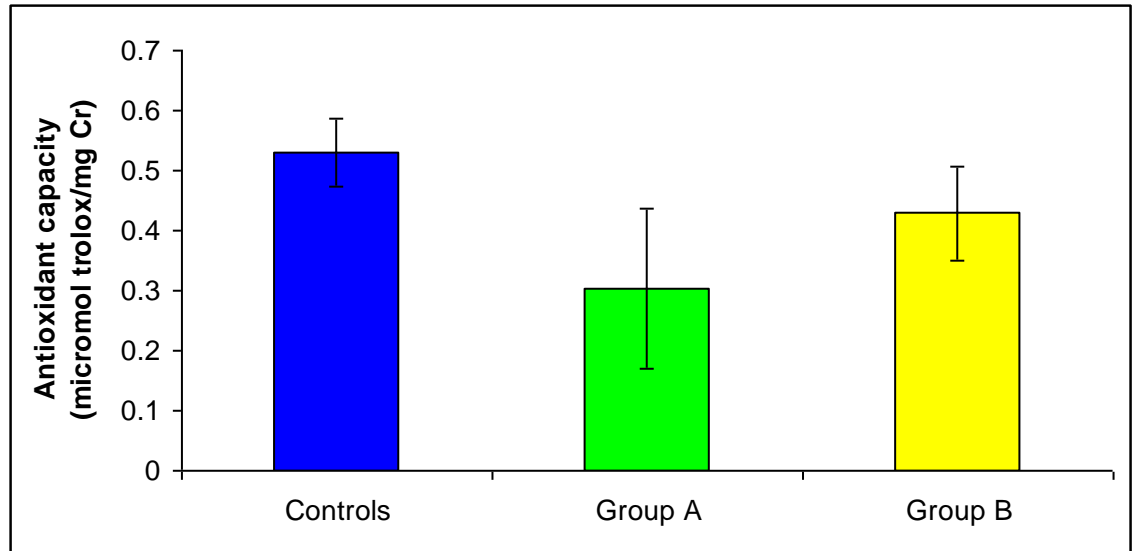


Figure 4.

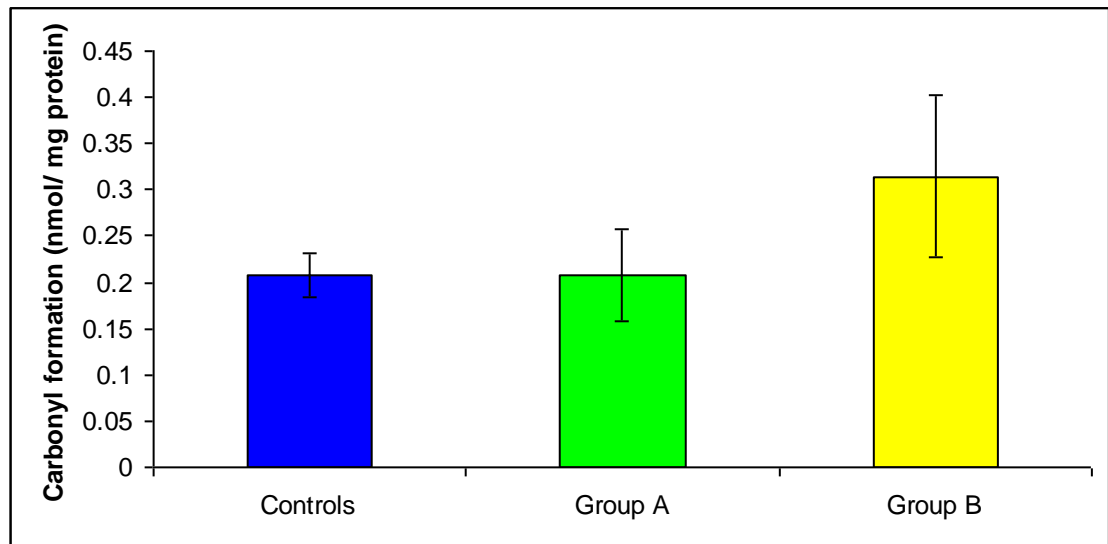
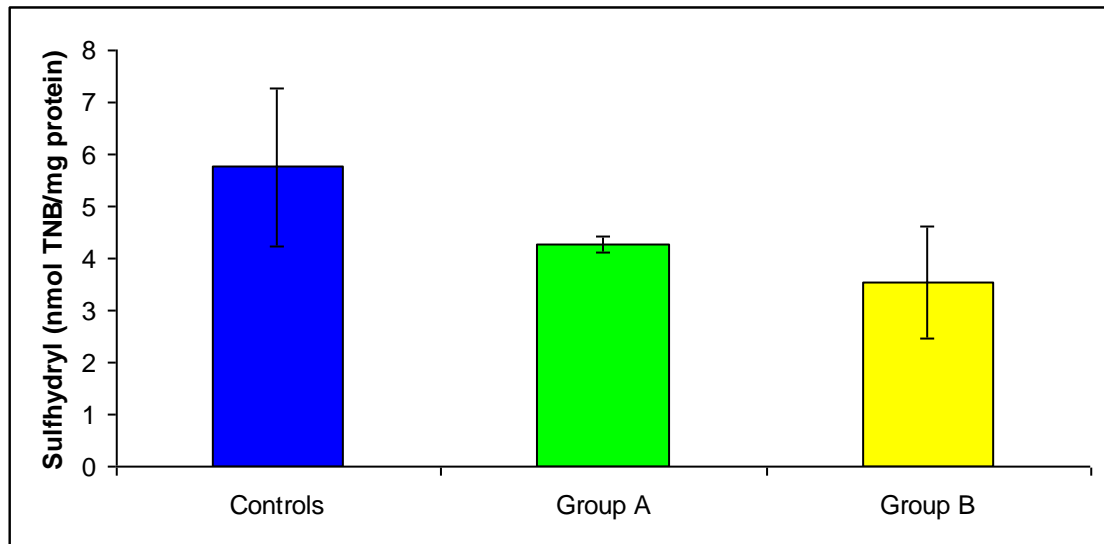


Figure 5.



4. Discussão Geral

A 3-HMG é um EIM de herança autossômica recessiva causada pela deficiência da HMGCL, uma enzima envolvida na degradação da leucina, levando ao acúmulo de ácidos orgânicos em tecidos e fluidos biológicos e uma deficiência de corpos cetônicos. (FAULL et al., 1976). Os pacientes portadores dessa patologia apresentam sintomas neurológicos graves podendo evoluir a morte. A patofisiologia deste EIM ainda não está esclarecida. Assim sendo, é de suma importância estudos sobre a doença para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nessa doença neurometabólica. O tratamento dos pacientes preconiza uma dieta com restrição de proteínas, em especial de leucina, e de lipídeos, além de uma suplementação de carnitina. (CASELLA et al., 1998).

Estudos em humanos e em animais indicam que os metabólitos que se acumulam em diversos EIM induzem a produção excessiva de radicais livres e reduzem as defesas antioxidantes dos tecidos. (COLOME et al 2000, WAJNER et al 2004). Neste contexto, o estresse oxidativo já foi demonstrado na fenilcetonúria (SIRTORI et al. 2005), adrenoleucodistrofia (VARGAS et al. 2004), doença da urina do xarope do bordo (BARSCHAK et al., 2006), homocistinúria (VANZIN et al., 2011), bem como em algumas acidemias orgânicas como acidúria propiônica e metilmalônica (RIBAS et al., 2010) e acidemia glutárica tipo 1. (LATINI et al., 2005).

Alguns estudos em modelos animais foram realizados a fim de avaliar o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da 3-HMG. Leipnitz et al. (2008) avaliaram os efeitos *in vitro* do ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMG) sobre o estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos e observaram um aumento de TBA-RS, um parâmetro de lipoperoxidação, na concentração de 1mM deste ácido. Nesse mesmo estudo foi, ainda, observado que os níveis de TBA-RS em preparados de mitocôndrias não são alterados pelo HMG, sugerindo que o dano ocorra através de mecanismos citosólicos, e que a formação de proteínas carboniladas e a oxidação de proteínas (sulfidrilas) foram induzidas pelo ácido, sugerindo, então, um dano protéico.

Em 2009, Leipnitz et al. verificaram que os metabólitos HMG, MGA, MGT e OHIVA aumentam *in vivo* os níveis de TBA-RS, produto final da peroxidação dos ácidos graxos de membranas, em estriado de ratos, e que apenas o HMG foi capaz de induzir a lipoperoxidação em fígado de ratos. Esses autores também observaram que o HMG, o MGT e o MGA reduziram a GSH e o teor de sulfidrilas no estriado. Cabe salientar que só o HMG reduziu a GSH e aumentou o TBA-RS no fígado. Da Rosa et al. (2013) mostraram que a administração *ex vivo* de HMG e MGA acarretou em um aumento da formação de carbonil e carbonil-metil-

lisina em córtex cerebral e fígado de ratos, indicando um dano protéico. Fernandes et al. (2013) estudaram a administração *ex vivo* estriatal em ratos destes ácidos orgânicos. Esse estudo demonstrou que os efeitos de dano celular e status redox destes ácidos foram mais importantes no tecido estriatal do que no fígado e que o HMG, o qual é o principal metabólito acumulado nesta doença, teve efeitos mais importantes.

Considerando, que alguns trabalhos em modelos animais demonstraram uma relação entre os metabólitos da 3-HMG e estresse oxidativo e que poucos são os estudos que investigaram o dano oxidativo nesta patologia, o objetivo do presente trabalho foi avaliar parâmetros de estresse oxidativo em sangue e urina de pacientes portadores de 3-HMG no momento do diagnóstico e submetidos a tratamento, no intuito de avaliar a eficácia da L-carnitina sobre este processo. Para tanto, amostras de sangue total, plasma e urina de pacientes com 3-HMG no momento do diagnóstico e durante o tratamento, além de amostras de indivíduos saudáveis com idade e sexo comparáveis aos dos pacientes (controles) foram analisadas quanto a parâmetros de dano protéico (di-tirosina, carbonila e sulfidrilas), dano a lipídeos (TBA-RS) e capacidade antioxidante, bem como níveis sanguíneos de carnitina livre.

Um aumento dos níveis de TBA-RS foi observado nos pacientes no momento do diagnóstico, o que reflete a formação de malondialdeído, produto final da peroxidação de ácidos graxos de membrana, sugerindo um dano lipídico nesses pacientes. Esse achado está de acordo com os estudos anteriores *in vitro* de Leinnitz et al. (2009) e com um trabalho recente que demonstrou que a administração intraestriatal destes ácidos orgânicos em ratos induz a formação de malondialdeído no tecido cerebral. (FERNANDES et al., 2013). Os pacientes portadores de 3-HMG não tratados também apresentaram um elevado nível de di-tirosina, demonstrando, então, um dano oxidativo a proteínas. Segundo Il'yasova (2012), a di-tirosina é um bom indicador de dano protéico, pois é formada pelo ataque dos radicais livres a uma variedade de proteínas. Esses achados de dano à proteína avaliados pelos níveis de di-tirosina estão de acordo com os estudos de Ribas et al. (2011) que demonstraram um aumento deste biomarcador em pacientes com acidúria propiônica e acidúria metilmalônica.

Embora pacientes não tratados tenham apresentado níveis não significativamente alterados de grupos carbonilas, os pacientes com 3-HMG em tratamento apresentaram uma redução de grupos sulfidrilas no plasma e um aumento na formação de proteínas carboniladas, reforçando que há um dano protéico associado a essa patologia. É importante enfatizar que existe uma tendência a redução dos grupamentos sulfidril no diagnóstico destes pacientes. Estudos anteriores mostraram que a administração *in vivo* de ácidos HMG e MGA induzem

danos oxidativos a proteínas em cérebro de ratos, corroborando, assim, com resultados encontrados em nosso estudo. (FERNANDES et al, 2013). Além disso, estes metabólitos podem provocar uma diminuição nas concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no cérebro de ratos (FERNANDES et al., 2013; DA ROSA et al, 2013). Se GSH também estiver reduzida no sangue de pacientes com 3-HMG, possivelmente isto contribua para os baixos níveis de grupos sulfidrilas apresentados pelos mesmos.

Os resultados do nosso estudo mostraram que os pacientes portadores de 3-HMG não tratados apresentam uma reduzida capacidade antioxidante urinária, quando comparada com os controles. Esta redução pode ser uma conseqüência de uma baixa biodisponibilidade de antioxidantes no sangue desses pacientes, tais como as vitaminas, os antioxidantes dietéticos, bem como os antioxidantes endógenos como a albumina, o ácido úrico e a coenzima Q10, um efeito secundário a tentativa de neutralizar o aumento da produção de espécies reativas que ocorre nesta desordem metabólica. Esse achado está de acordo com os dados encontrados por Leipnitz et al. (2008), mostrando que o 3-HMG reduziu as defesas antioxidantes não-enzimáticas, o potencial antioxidante reativo total (TRAP), a reatividade antioxidante total (TAR) e os níveis de GSH no córtex cerebral de ratos.

É relevante destacar que a deficiência secundária de carnitina livre, que foi verificada nos pacientes deste estudo no momento diagnóstico, é um achado comum em pacientes com acidúrias orgânicas (inclusive 3-HMG), uma vez que a carnitina conjuga-se com os ácidos orgânicos acumulados, a fim de facilitar a sua eliminação na urina como acilcarnitinas. A carnitina é um componente vital do metabolismo energético e tem sido demonstrado suas propriedades antioxidantes em vários estudos *in vitro* e *in vivo*, e também em patologias neurodegenerativas. (CHALMERS et al., 1984, RIBAS et al., 2013). Por conseguinte, é possível que o aumento da peroxidação lipídica e a reduzida capacidade antioxidante urinária observada em pacientes 3-HMG não tratados estejam relacionados, pelo menos em parte, à carência de carnitina livre, bem como ao acúmulo de metabólitos tóxicos que podem levar à disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo por mecanismos ainda não bem estabelecidos. (WAJNER et al., 2004).

Analisando conjuntamente os resultados obtidos em nosso estudo, é possível sugerir fortemente que um desequilíbrio na homeostase redox ocorre em pacientes portadores de 3-HMG, e que essa descompensação pode danificar as biomoléculas e pode conduzir à morte celular. Estas alterações na estrutura proteica por espécies oxidantes podem afetar a função dos receptores, das enzimas e das proteínas de transporte, resultando, assim, numa perda

parcial ou completa da funcionalidade da proteína. (LEVINE et al, 1990; HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). Ademais, a lipoperoxidação é conhecida por afetar a viscosidade das membranas e da função de barreira, podendo causar uma diminuição da produção de ATP com subsequente disfunção neuronal. (MATTSON, 2004). Assim, é concebível que os danos oxidativos protéicos e lipídicos verificados no presente trabalho podem ser a base da lesão tecidual encontrada em pacientes com 3-HMG, especialmente porque, durante a descompensação metabólica aguda, as concentrações dos ácidos orgânicos que se acumulam nesta doença podem aumentar dramaticamente. (WAJNER et al., 2004).

Por outro lado, verificou-se neste trabalho que os pacientes com 3-HMG em tratamento com dieta hipoproteica e suplementação de L-carnitina apresentaram menores níveis de lipoperoxidação e aumento da capacidade antioxidante urinária em relação aos pacientes não tratados. Embora não se possa afirmar que estes efeitos foram apenas devido à suplementação de L-carnitina, nos últimos anos vários trabalhos têm demonstrado que este composto pode prevenir o dano oxidativo lipídico por diferentes mecanismos, como pela inibição da atividade da xantina oxidase, por eliminação de radicais livres e quelantes de ferro necessários para a geração de radicais hidroxila (GÜLÇIN, 2006; MUTHUSWAMY et al., 2006) ou por facilitar o transporte de ácidos graxos, reduzindo, assim, a disponibilidade dos lípidos para peroxidação. (RANI e PANNEERSELVAM, 2002). Reforçando nossos achados, a suplementação de L- carnitina também foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica em outros EIM, como na fenilcetonúria (SITTA et al., 2011), na doença da urina de xarope de bordo (MESCKA et al., 2011 e 2013) e em distúrbios do metabolismo do propionato. (RIBAS et al., 2010).

Em 2011, Sitta et al. investigaram alguns parâmetros de estresse oxidativo em pacientes fenilcetonúricos antes e 6 meses após o tratamento com uma fórmula sintética de aminoácidos (isenta de fenilalanina) e suplementada com L-carnitina e selênio. A suplementação reverteu a peroxidação lipídica e o dano oxidativo a proteínas. A atividade da glutatona peroxidase foi normalizada pela suplementação. Ainda, uma correlação inversa entre peroxidação lipídica e L-carnitina foi observada, assim como uma correlação positiva entre a atividade da glutatona peroxidase e os níveis de selênio no sangue.

Ribas et al. (2010) avaliaram os níveis de isoprostanos, di-tirosina e a capacidade antioxidante na urina de pacientes com acidemia propiônica (PA) e metilmalônica (MMA) no momento diagnóstico e durante o tratamento com L-carnitina e dieta com restrição de proteínas. Os resultados demonstraram que o tratamento com dieta com baixo teor de

proteínas e L-carnitina reduz significativamente biomarcadores urinários de dano oxidativo a proteína e lipídios em pacientes com distúrbios do metabolismo de propionato e que a suplementação com L-carnitina pode estar envolvida nesta proteção.

Mescka et al (2012) investigaram o efeito da dieta com restrição dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) suplementadas ou não com L-carnitina em pacientes com Doença do Xarope do Bordo sobre a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas. Foi verificado um aumento significativo de malondialdeído (índice de lipoperoxidação) e do teor de carbonila (dano oxidativo a proteína) no plasma desses pacientes em dieta com restrição de BCAA em relação aos controles. Além disso, os pacientes sob dieta com suplementação de L-carnitina e restrição de BCAA apresentaram uma redução acentuada do conteúdo de malondialdeído em relação aos controles, reduzindo a peroxidação lipídica.

No presente estudo, verificou-se que a oxidação das proteínas permaneceu elevada nos pacientes com 3-HMG durante o tratamento. Curiosamente, os grupos carbonilas das proteínas podem circular por períodos mais longos no sangue dos pacientes, quando comparados com os outros parâmetros de estresse oxidativo, tais como o malondialdeído, subproduto da peroxidação lipídica. (PANTKE et al., 1999). Além disso, os grupos carbonila são relativamente difíceis de induzir e podem ser o reflexo de casos mais graves de estresse oxidativo. (DALLE-DONNE et al., 2003). Por causa da relativa estabilidade das proteínas oxidadas, é possível que as propriedades antioxidantes da L-carnitina, não sejam suficientes para reverter tais danos.

5. Conclusões

Em conclusão, os resultados desse trabalho demonstram de forma pioneira o envolvimento do estresse oxidativo em pacientes portadores de 3-HMG, corroborando com os estudos em modelos animais. Estes resultados reforçam a importância do uso de antioxidantes como adjuvante no tratamento desta patologia, em especial da L-carnitina, não somente por promover a excreção dos compostos tóxicos acumulados nos pacientes, mas também por promover o equilíbrio do status redox e prevenir o dano oxidativo a lipídeo.

6. Perspectivas

Este trabalho tem como perspectivas futuras dar continuidade a investigação de estresse oxidativo em pacientes com 3-HMG tratados com L-carnitina:

- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase em eritrócitos;
- Avaliar a concentração de glutathione reduzida em eritrócitos;
- Avaliar o dano ao DNA e o reparo em leucócitos de pacientes através do ensaio cometa, investigando o efeito da carnitina sobre este processo;
- Medir os níveis dos ácidos orgânicos acumulados na urina;
- Medir citocinas pró-inflamatórias no soro;
- Medir carnitina total, livre e esterificada na urina e no soro;
- Correlacionar os parâmetros de estresse oxidativo, as citocinas inflamatórias, os ácidos orgânicos excretados na urina e a carnitina (total, livre e esterificada) entre si.

7. Referências

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**. V.350, n. 1, p.103-108, 1996.

ARTUCH, R.; COLOME, C.; SIERRA, C.; BRANDI, N.; LAMBRUSCHINI, N.; CAMPISTOL, J.; UGARTE, D.; VILASECA, M.A. A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. **Clinical Biochemistry**. V. 37, p198-203, 2004.

ARTUCH, R.; COLOME, C.; VILASECA, M.A.; SIERRA, C.; CAMBRA, F.J.; LAMBRUSCHINI, N.; CAMPISTOL, J. Plasma phenylalanine is associated with decreased serum ubiquinone-10 concentrations in phenylketonuria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. V. 24, p359-366, 2001.

ASHMARINA, L.I.; PSHESHETSKY, A.V.; BRANDA, S.S.; ISAYA, G.; MITCHELL, G.A. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase: targeting and processing in peroxisomes and mitochondria. **Journal of Lipid Research**. V. 40, p70-75, 1999.

BAHL, J.J.; BRESSLER, R. The pharmacology of L-carnitine. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. V. 24, p257-277, 1987.

BARASH, V.; MANDEL, H.; SELLA, S.; GEIGER, R. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: biochemical studies and family investigation of four generations. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. V. 13, p156-164, 1990.

BARIC, I.; FUMIC, K.; HOFFMANN, G.F. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. **Croatian Medical Journal**. V. 42, p379-383, 2001.

BARSCHAK, A.G.; MARCHESAN, C.; SITTA, A.; DEON, M.; GIUGLIANI, R.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. Maple syrup urine disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles. **Clinical Biochemistry**. V. 9, p317-324, 2008.

BARSCHAK, A.G.; SITTA, A.; DEON, M.; DE OLIVEIRA, M.H.; HAESER, A.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. **Metabolic Brain Disease**. V. 21, p279-286, 2006.

BIRD, S.; MILLER, N.J.; COLLINS, J.E.; RICE EVANS, C.A. Plasma antioxidant capacity in two cases of tyrosinemia type 1: one case treated with NTBC **Journal of Inherited Metabolic Disease**. V. 18, p123-126, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.829** de 14 de dezembro de 2012. Inclusão da triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita e deficiência de biotinidase no Programa Nacional de Triagem Neonatal. Disponível em:
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt2829_14_12_2012.html

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 822** de 6 de junho de 2001. Sistema Único de Saúde, Programa Nacional de Triagem Neonatal. Disponível em:
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2001/prt0822_06_06_2001.html

BREMER, J. Carnitine - metabolism and functions. **Physiological Reviews**. V.63, p1420-1480, 1983.

- BURTON, B. K. Inborn Errors of Metabolism in infancy: A Guide to Diagnosis. **Pediatrics**. V. 102, V. 6, p69-80, 1998.
- CASELLA, E.B.; MARTINS, F.R.P.; MIURA, I.K.; VIEIRA, M.A.; PORTA, G. Deficiência da 3-OH-3-Metil-Glutaryl-Coa-Liase como causa de coma no período neonatal. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**. V. 56, p472-475, 1998.
- CHALMERS, R. A. AND LAWSON, A. M. Organic Acids in Man, Analytical Chemistry, Biochemistry and Diagnosis of the Organic Acidurias. Chapman&Hall, London, p 221–229, 1982.
- CHALMERS, R.A.; ROE, C.R.; STACEY, T.E.; HOPPEL, C.L. Urinary excretion of l-carnitine and acylcarnitines by patients with disorders of organic acid metabolism: evidence for secondary insufficiency of l-carnitine. **Pediatric Research**. V. 18, p1325–1328, 1984.
- COLOME, C.; SIERRA, C.; VILASECA, M.A. Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? **Medicina Clinica**. V. 115, p111–117, 2000.
- DALLE-DONNE I., ROSSI R., GIUSTARINI D., MILZANI A., COLOMBO R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**. V. 329, p.23-38, 2003.
- DASOUKI M., BUCHANAN D., MERCER N., GIBSON K. M., THOENE J. 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria: response to carnitine therapy and fat and leucine restriction. **J Inherited Metabolic Disease**. V.10, p.142-146, 1987.
- DEODATO, F.; BOENZI, S.; SANTORELLI, F.M.; DIONISI-VICI, C. Methylmalonic and propionic aciduria. **American Journal of Medical Genetics**. Part C, Seminars in Medical Genetics, v.142C, p.104-112, 2006.
- DEON, M.; SITTA, A.; BARSCHAK, A.G.; COELHO, D.M.; PIGATTO, M.; SCHMITT, G.O.; JARDIM, L.B.; GIUGLIANI, R.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. **International Journal of Developmental Neuroscience**. V. 25, p441–444, 2007.
- DEON, M.; WAJNER, M.; SIRTORI, L.R.; FITARELLI, D.; COELHO, D.M.; SITTA, A.; BARSCHAK, A.G.; FERREIRA, G.C.; HAESER, A.; GIUGLIANI, R.; VARGAS, C.R. The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**. V. 247, p157–164, 2006.
- DORFMAN, A. AND LORINCZ, H.E. Occurrence of urinary acid mucopolysaccharides in the Hurler syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 43, p443, 1957.
- EVANS, A.M.; FORNASINI, G. Pharmacokinetics of L-carnitine. **Clinical Pharmacokinetics**. V. 42, p941-967, 2003.
- FAULL, K.F.; BOLTON, P.D.; HALPERN, B.; HAMMOND, J.; DANKS, D.M.; HÄHNEL, R.; WILKINSON, S.P.; WYSOCKI, S.J.; MASTERS, P.L. Letter: Patient with defect in leucine metabolism. **New England Journal of Medicine**. Vol. 294, p1013, 1976.

FERREIRA, G.C.; TONIN, A.; SCHUCK, P.F.; VIEGAS, C.M.; CEOLATO, P.C.; LATINI, A.; PERRY, M.L.; WYSE, A.T.; DUTRA-FILHO, C.S.; WANNMACHER, C.M.; VARGAS, C.R.; WAJNER, M. Evidence for a synergistic action of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids disturbing rat brain energy metabolism. **International Journal of Developmental Neuroscience**. V. 25, p391–398, 2007.

FIGHERA, M.R.; ROYES, L.F.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; FIORENZA, N.G.; FRUSSA-FILHO, R.; PETRY, J.C.; COELHO, R.C.; MELLO, C.F. GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺,k⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole. **Neurobiology of Disease**. V. 22, p611-623, 2006.

FONTANELLA, F.; PULRONICK, V.; GASSEN, E.; WANNMACHER, C.M.D.; KLEIN, A.B.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. **Neuroreport**. V. 11, p541-544, 2000.

FONTELLA, F.U.; GASSEN, E.; PULROLNIK, V.; WANNMACHER, C.M.D.; KLEIN, A.B.; WAJNER, M.; DUTRA, C.S. Stimulation of lipid peroxidation *in vitro* in rat brain by metabolites accumulating in maple syrup urine disease. **Metabolic Brain Disease**. V. 17, p47–54, 2002.

FRITZ, I. B. AND ARRIGONI-MARTELLI, E. Sites of action of carnitine and its derivatives on the cardiovascular system. Interactions with membranes. **Trends in Pharmacological Sciences**. V. 14, p355–360, 1993.

GARROD, A.E. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. **Journal of Biology and Medicine**. V. 2002, p221–231, 1902.

GIBSON, K.M.; BREUER, J.; NYHAN, W.L. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: review of 18 reported patients. **European Journal of Pediatrics**. V.148, p180–186, 1988.

GULCIN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life Sciences**. V. 78, p803-811, 2006.

HAGEN, M.E.K.; PEDERZOLLI, C.D.; SGARAVATTI, A.M.; BRIDI, R.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WYSE, A.T.S.; DUTRA-FILHO, C.S. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta**. V.1586, p344-352, 2002.

HALLIWELL, B. AND WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**. V. 142, p231–255, 2004.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**. V.52, p253-265, 1994.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**. V. 97, p1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Research**. V. 25, 1–32, 1996.

- HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs Aging**. V.18, p685-716, 2001.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.
- HENRIQUES, J.A.P. E SALVADOR, M. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas, Ed. Ulbra, 2004.
- HOPPEL, C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. **American Journal of Kidney Diseases**. V. 41, p4-12, 2003.
- HOSPITAL SANT JOAN DE DÉU BARCELONA. Disponível em: <http://www.guiametabolica.org/informacion/que-ocurre-en-la-aciduria-3-hidroxi-3-metilglutarica>. Acesso em: 16 de jul 2014.
- JIMENEZ-SANCHEZ,G.; CHILDS, B.; VALLE, D. Human disease genes. **Nature**. V. 409, p853–855, 2001.
- KÖLKER, S.; AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J.; HOFFMANN, G.F. Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. **Pediatric Research**. V. 50, p76-82, 2001.
- LATINI, A.; FERREIRA, G. C.; SCUSSIATO, K.; SCHUCK, P.F.; SOLANO, A.F.; DUTRA-FILHO, C.S.; VARGAS, C.R.; WAJNER, M. Induction of oxidative stress by chronic and acute glutaric acid administration to rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**. Vol. 27, n. 4, p. 423–438, 2007.
- LATINI, A.; SCUSSIATO, K.; LEIPNITZ, G.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M. Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. V. 28, p57–67, 2005.
- LEMM, Hans. **Estudando Biologia** (2011). Disponível em: <http://thinkbio.wordpress.com/2011/12/31/processos-energeticos-celulares/>. Acesso em: 16 de jul 2014.
- MAGNI, D.V.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; SOUZA, M.A.; LUNARDI, F.; FERREIRA, J.; MELLO, C.F.; ROYES, L.F.; FIGHERA, M.R. Kinetic characterization of l-[³H]glutamate uptake inhibition and increase oxidative damage induced by glutaric acid in striatal synaptosomes of rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**. V. 27, p65-72, 2009.
- MATTSON, M.P.; DUAN, W.; WAN, R.; GUO, Z. Prophylactic activation of neuroprotective stress response pathways by dietary and behavioral manipulations. **Neurotherapeutics**. V.1, p111–116, 2004.
- MUTHUSWAMY, A.D.; VEDAGIRI, K.; GANESAN, M.; CHINNAKANNU, P. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: role of L-carnitine and DL-alpha-lipoic acid. **Clinica Chimica Acta**. V. 368, p84–92, 2006.

NYHAN, W.L.; BARSHOP, B.; OZAND, P.T. **Atlas of Metabolic Disease**. 2nd ed. Hodder Arnold: London, 2005.

OGIER DE BAULNY, H.; SAUDUBRAY, J.M. Branched-chain organic acidurias. **Seminars in Neonatology**. V. 7, p65-74, 2002.

OLIVEIRA MARQUES, F.; HANGEN, M.E.; PEDERZOLLI, C.D.; SGARAVATTI, A.M.; DURIGON, K.; TESTA, C.G.; WANNMACHER, C.M.; WYSE, A.T.; WAJNER, M., DUTRA-FILHO, C.S. Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. **Brain Research**. V. 964, p153-158, 2003.

PANTKE U., VOLK T., SCHMUTZLER M., KOX W. J., SITTE N., GRUNE T. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. **Free Radical Biology and Medicine**. V.27 , p1080-1086, 1999.

PIÉ, J.; LÓPEZ-VIÑAS, E.; PUISAC, B.; MENAO, S.; PIÉ, A.; CASALE, C.; RAMOS, F.J.; HEGARDT, F.G.; GÓMEZ-PUERTAS, P.; CASALS, N. Molecular genetics of HMG-CoA lyase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**. Vol. 92, p198-209, 2007.

RASHED, M.S.; OZAND, P.T.; BUCKNALL, M.P.; LITTLE, D. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. **Pediatric Research**. V. 38, p324–331, 1995.

RIBAS, G.S.; MANFREDINI, V.; DE MARCO, M.G.; VIEIRA, R.B.; WAYHS, C.Y.; VANZIN, C.S.; BIANCINI, G.B.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes *in vitro*. **Mutation Research**. V. 702, p123–128, 2010.

ROE, C.R.; MILLINGTON, D.S.; MALTBY, D.A. Diagnostic and therapeutic implications of acylcarnitine profiling in organic acidurias associated with carnitine insufficiency. In: Borum, P. R. (ed.), **Clinical Aspects of Human Carnitine Deficiency**, Pergamon Press, New York; 1986.

ROE, C.R.; MILLINGTON, D.S.; MALTBY, D.A.; KAHLER, S.G.; BOHAN, T.P. L-carnitine therapy in isovaleric acidemia. **Journal of Clinical Investigation**. V.74, p2290–2295, 1984.

SAUDUBRAY, J.M.; CHARPENTIER, C. Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 7th edn, New York: McGraw-Hill, 327-400, 1995.

SCRIVER, C.; BEAUDET, A.; SLY, W.; VALLE, D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.

SIERRA, C.; VILASECA, M.A.; MOYANO, D.; BRANDI, N.; CAMPISTOL, J.; LAMBRUSCHINI, N.; CAMBRA, F.J.; DEULOFEU, R.; MIRA, A. Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. **Clinica Chimica Acta**. V. 276, p1-9, 1998.

SIRTORI, L.R.; DUTRA-FILHO, C.S.; FITARELLI, D.; SITTA, A.; HAESER, A.; BARSCHAK, A.G.; WAJNER, M.; COELHO, D.M.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A.; GIUGLIANI, R.; DEON, M.; VARGAS, C.R. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1740, p68-73, 2005.

SISTEMA ORGÂNICO HUMANO. Disponível em:
<http://sistemaorganicohumano.blogspot.com.br/2012/10/estresse-oxidativo-no-cancer.html>.
Acesso em: 16 de jul 2014.

SITTA, A.; BARSCHAK, A.G.; DEON, M.; DE MARI, J.F.; BARDEN, A.T.; VANZIN, C.S.; BIANCINI, G.B.; SCHWARTZ, I.V.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. L-Carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. **Cellular and Molecular Neurobiology**. V. 29, p211–218, 2009.

SITTA, A.; BARSCHAK, A.G.; DEON, M.; TERROSO, T.; PIRES, R.; GIUGLIANI, R.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. **Metabolic Brain Disease**. V. 21, p287-96, 2006.

STEFANELLO, F.M.; FRANZON, R.; TAGLIARI, B.; WANNMACHER, C.; WAJNER, M.; WYSE, A.T. Reduction of butyrylcholinesterase activity in rat serum subjected to hyperhomocystinemia. **Metabolic Brain Disease**. V. 20, p97–103, 2005.

STRECK, E.L.; ZUGNO, A.I.; TAGRIARI, B.; FRANZON, R.; WANNMACHER, C.M.; WAJNER, M.; WYSE, A.T. Inhibition of rat brain Na⁺, K⁺-ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. **Neurochemical Research**. V. 26, p1195-1200, 2001.

SWEETMAN, L.; WILLIAMS, J.C. BRANCHED CHAIN ORGANIC ACIDURIAS. IN: SCRIVER CR, BEAUDET AL, SLY WS, VALLE D. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill; 2001. pp. 2125–2163.

ULKER, S.; MCKEOWN, P.P.; BAYRAKTUTAN, U. Vitamins Reverse Endothelial Dysfunction Through Regulation of eNOS and NAD(P)H Oxidase Activities. **Hypertension**. V. 41, p534-539, 2003.

VAIDYANATHAN, K.; NARAYANAN, M.P.; VASUDEVAN, D.M. Organic acidurias: An updated review. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**. V. 26, p319 – 325, 2011.

VANZIN, C.S.; BIANCINI, G.B.; SITTA, A.; WAYHS, C.A.; PEREIRA, I.N.; ROCKENBACH, F.; GARCIA, S.C.; WYSE, A.T.; SCHWARTZ, I.V.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. Experimental evidence of oxidative stress in plasma of homocystinuric patients: a possible role for homocysteine. **Molecular Genetics and Metabolism**. V. 104, p112-117, 2011.

VARGAS, C.R.; SITTA, A.; SCHMITT, G.; FERREIRA, G.C.; CARDOSO, M.L.; COELHO, D.; GIBSON, K.M.; WAJNER, M. Incidence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase (HL) deficiency in Brazil, South America. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. 2007.

VARGAS, C.R.; WAJNER, M.; SIRTORI, L.R.; GOULART, L.; CHIOCHETTA, M.; COELHO, D.; LATINI, A.; LLESUY, S.; BELLO-KLEIN, A.; GIUGLIANI, R.; DEON, M.; MELLO, C.F. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 20, p26-32, 2004.

WAJNER, M.; GOODMAN, S. Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from animal studies. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. V. 43, p31–38, 2011.

WULF D. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**. V. 82, p47–95, 2002.