

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

**Avaliação dos efeitos da L-carnitina sobre o estresse oxidativo em pacientes
com desordens do metabolismo do propionato**

GRAZIELA DE OLIVEIRA SCHMITT RIBAS

PORTO ALEGRE, 2011

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

**Avaliação dos efeitos da L-carnitina sobre o estresse oxidativo em pacientes
com desordens do metabolismo do propionato**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul como requisito à obtenção do
título de Doutor.**

Orientador: Profa. Dra. Carmen Regla Vargas

CIP - Catalogação na Publicação

Ribas, Graziela

Avaliação dos efeitos da L-carnitina sobre o estresse oxidativo em pacientes com desordens do metabolismo do propionato. / Graziela Ribas. -- 2011.

103 f.

Orientadora: Carmen Vargas.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. estresse oxidativo. 2. acidemia propiônica. 3. acidemia metilmalônica. 4. L-carnitina. 5. erros inatos do metabolismo. I. Vargas, Carmen, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Aos meus pais, Valdonir e Delma, pelo exemplo e amor incondicional.

Ao meu esposo, Leonardo, pelo amor, companheirismo e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Carmen Vargas, pela amizade, confiança, incentivo e, acima de tudo, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Moacir Wajner pelos ensinamentos, sugestões, apoio e colaboração.

A Prof^a Vanusa Manfredini pela amizade e colaboração.

A UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmecêuticas e a todos os professores que contribuíram na minha formação.

Aos meus amigos de laboratório, Giovana, Camila, Carlos, Angela, Marion, Daiane, Letícia, Carol e Diana, pela amizade, pelos momentos divertidos e por toda ajuda na realização desse trabalho.

Aos meus amigos do Serviço de Genética Médica do HCPA, Daniela, Jurema, Anderson, Régis e Cristiane, agradeço pelo carinho e amizade.

A minha grande amiga Emilene, agradeço pelo companheirismo, amizade e apoio nessa trajetória.

Aos meus sobrinhos por encherem de alegria a minha vida.

Aos meus pais e aos meus irmãos pela torcida e amizade.

Ao meu esposo Leonardo por me fazer mais feliz a cada dia que passa.

A Deus, por me dar coragem para seguir em frente...

A todos, MUITO OBRIGADA!

Agradeço à CAPES, pela bolsa concedida, ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, que disponibilizaram todos os equipamentos e recursos necessários para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XIX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	1
1.2 DESORDENS DO METABOLISMO DO PROPIONATO: ACIDEMIA PROPIONICA E ACIDEMIA METILMALÔNICA	4
1.2.1 Fisiopatogenia	9
1.2.2 Tratamento.....	10
1.3 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS.....	13
1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES	16
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO	17
1.6 ESTRESSE OXIDATIVO E NEURODEGENERAÇÃO	19
1.7 BUTIRILCOLINESTERASE.....	21
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. CAPÍTULO 1: REDUCTION OF LIPID AND PROTEIN DAMAGE IN PATIENTS WITH DISORDERS OF PROPIONATE METABOLISM UNDER TREATMENT: A POSSIBLE PROTECTIVE ROLE OF L-CARNITINE SUPPLEMENTATION.....	27
CAPÍTULO 2: OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN URINE FROM PATIENTS WITH DISORDERS OF PROPIONATE METABOLISM: A BENEFICIAL EFFECT OF L-CARNITINE SUPPLEMENTATION.....	31
3. CAPÍTULO 3: PREVENTION BY L-CARNITINE OF DNA DAMAGE INDUCED BY PROPIONIC AND L-METHYLMALONIC ACIDS IN HUMAN PERIPHERAL LEUKOCYTES <i>IN VITRO</i>.....	39
3. CAPÍTULO 4: REDUCTION OF BUTYRYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN PLASMA FROM PATIENTS WITH DISORDERS OF PROPIONATE METABOLISM IS PREVENTED BY TREATMENT WITH L-CARNITINE AND PROTEIN RESTRICTION.....	47
4. DISCUSSÃO GERAL	51

5. CONCLUSÕES	65
6. PERSPECTIVAS.....	69
REFERÊNCIAS	71
ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE.....	97
ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO DA EDITORA PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO NA TESE	101
ANEXO 3 - AUTORIZAÇÃO DA EDITORA PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO NA TESE	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância de uma via
ATP	Adenosina trifosfato
BuChE	Butirilcolinesterase
CAT	Catalase
CuZn-SOD	Cobre, zinco-superóxido dismutase
DI	DNA damage index (índice de dano ao DNA)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSBs	“Double-strand breaks” (quebras de fita dupla do DNA)
DXB	Doença do xarope do bordo
EIM	Erros inatos do metabolismo
ERN	Espécies reativas do nitrogênio
ERO	Espécies reativas do oxigênio
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
HNE	4-OH-2-trans-nonenal
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
MDA	Malondialdeído
MMA	Ácido metilmalônico
MMAemia	Acidemia metilmalônica
Mn-SOD	Manganês superóxido dismutase
NO	Óxido nítrico
PA	Ácido propiônico

PAemia	Acidemia propiônica
O₂^{•-}	Radical superóxido
O₃	Ozônio
OH[•]	Radical hidroxila
ONOO⁻	Peroxinitrito
RNA	Ácido ribonucleico
SH	Grupamentos sulfidrila
SOD	Superóxido dismutase
SSBs	“Single-strand breaks” (quebras de fita única do DNA)
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRAP	Potencial antioxidante total

RESUMO

As desordens do metabolismo do propionato, acidemia propiônica (PAemia) e acidemia metilmalônica (MMAemia), são doenças hereditárias, autossômicas recessivas, bioquimicamente caracterizadas pelo acúmulo predominante dos ácidos propiônico (PA) e metilmalônico (MMA), respectivamente, nos tecidos e fluidos biológicos dos indivíduos afetados. Esses distúrbios comprometem o catabolismo dos aminoácidos isoleucina, valina, metionina e treonina, ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono e colesterol. Estas alterações no metabolismo levam a episódios de acidose metabólica grave no período neonatal, hiperamonemia, hipo/hiperglicemia, além de manifestações neurológicas, como letargia, hipotonia, convulsões e atraso no desenvolvimento psicomotor. O tratamento dessas acidemias orgânicas consiste na restrição da ingestão de proteínas e dos aminoácidos precursores do propionato, suplementada com uma fórmula semi-sintética contendo aminoácidos essenciais e L-carnitina. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os ácidos propiônico e metilmalônico estimulam a oxidação lipídica e protéica e reduzem as defesas antioxidantes em cérebro de ratos. Entretanto, os efeitos oxidantes desses ácidos orgânicos sobre o DNA e a ocorrência de estresse oxidativo em pacientes com desordens do metabolismo do propionato têm sido pouco investigados. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o dano oxidativo a proteínas e a lipídios, bem como a atividade da enzima butirilcolinesterase em pacientes com PAemia e MMAemia, avaliando o efeito do tratamento com L-carnitina e dieta hipoprotéica sobre esses parâmetros e investigar o efeito *in vitro* dos ácidos propiônico e metilmalônico sobre o dano ao DNA, na presença e ausência de L-carnitina. Para tanto, foram utilizadas amostras de plasma e urina de pacientes com essas desordens obtidas no momento do diagnóstico e durante o tratamento com L-carnitina (100 mg/Kg/dia) e dieta hipoprotéica. Os resultados demonstraram um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de malondialdeído e de proteínas carboniladas, e nas concentrações urinárias de di-

tirosina e isoprostanos, bem como uma redução significativa de tióis totais e da capacidade antioxidante, no plasma e urina respectivamente, de pacientes com PAemia e MMAemia no momento do diagnóstico dessas doenças. Por outro lado, os pacientes com PAemia e MMAemia em tratamento com dieta hipoprotéica, L-carnitina e fórmula semi-sintética de aminoácidos apresentaram concentrações significativamente menores de malondialdeído, proteínas carboniladas, isoprostanos e di-tirosina em relação aos pacientes não-tratados. Além disso, foi observada uma relação inversa entre as concentrações plasmáticas de L-carnitina livre ($r = -0,67$, $p < 0,05$) e total ($r = -0,66$, $p < 0,05$) com as concentrações de malondialdeído, bem como entre os marcadores urinários de dano oxidativo e as concentrações de carnitina total e livre. Na continuidade do trabalho, foi investigado o efeito *in vitro* da L-carnitina, em concentrações detectadas no sangue de pacientes com PAemia e MMAemia não-tratados (30 μM) e tratados (60-150 μM), sobre o dano ao DNA em leucócitos periféricos humanos saudáveis induzido pelos ácidos propiônico e metilmalônico, através do ensaio do cometa. Os resultados desse estudo demonstraram que os ácidos propiônico (2-5 mM) e metilmalônico (0,5-5 mM) foram capazes de estimular significativamente *in vitro* o dano ao DNA quando comparado ao grupo controle. O tratamento *in vitro* com L-carnitina reduziu significativamente os índices de dano ao DNA induzidos por PA e MMA 5 mM, de maneira dose-dependente. Ainda, o tratamento com L-carnitina evitou a indução de dano classes 3 e 4 pelo MMA, e a concentração de 150 μM de L-carnitina preveniu os efeitos lesivos de ambos os ácidos sobre o DNA. Por último, foi investigada a atividade da enzima butirilcolinesterase e as concentrações de malondialdeído no plasma de pacientes com desordens do metabolismo do propionato não-tratados (no momento do diagnóstico) e em uso de L-carnitina e dieta hipoprotéica. Os resultados encontrados mostraram que a atividade da butirilcolinesterase está significativamente reduzida, enquanto as concentrações de malondialdeído estão aumentadas no plasma dos pacientes no diagnóstico. Por outro lado, pacientes em tratamento apresentaram concentrações de malondialdeído e atividade da butirilcolinesterase estatisticamente similar ao grupo controle. Também foi observada uma correlação negativa significativa entre

a atividade da enzima e as concentrações de malondialdeído no plasma dos pacientes afetados. Concluindo, os resultados desse trabalho permitem inferir que o tratamento com L-carnitina e dieta hipoprotéica é capaz de conferir proteção contra o dano oxidativo a biomoléculas (lipídios, proteínas e DNA) e a redução da atividade da enzima butirilcolinesterase que podem contribuir, ao menos em parte, na fisiopatogenia das desordens do metabolismo do propionato.

ABSTRACT

The disorders of propionate metabolism, propionic acidemia (PAemia) and methylmalonic acidemia (MMAemia), are inherited autosomal recessive diseases, biochemically characterized by the predominant accumulation of propionic acid (PA) and methylmalonic acid (MMA), respectively, in tissues and biological fluids of affected individuals. These disorders impair the catabolism of amino acids isoleucine, valine, methionine and threonine, odd-chain fatty acids and cholesterol. These alterations in the metabolism lead to severe metabolic acidosis in the neonatal period, with hyperammonemia, hypo/hyperglycemia and neurological manifestations, such as lethargy, hypotonia, seizures, and delayed psychomotor development. The treatment of these organic acidemias consists of a low-protein diet, restricted in amino acids precursors of propionate, supplemented with a semi-synthetic formula containing essential amino acids and L-carnitine. *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that methylmalonic and propionic acids stimulate lipid and protein oxidation and reduce antioxidant defenses in rat brain. However, the oxidant effects of these organic acids on DNA and the occurrence of oxidative stress in patients with disorders of propionate metabolism have been poorly investigated. So, the objective of the present study was to investigate lipid and protein oxidative damage, as well as the butyrylcholinesterase activity in patients with PAemia MMAemia, verifying the effect of treatment with L-carnitine and low-protein diet on these parameters, and to investigate *in vitro* the effect of propionic and methylmalonic acids on DNA damage, in the presence or absence of L-carnitine. For this purpose, plasma and urine samples were obtained from patients with Paemia and MMAemia at the moment of diagnosis and during the treatment with L-carnitine (100 mg/Kg/day) and low-protein diet. The results demonstrated a significant increase of malondialdehyde plasma concentrations and carbonylated proteins, and of urinary concentrations of di-tyrosine and isoprostanes, as well as a significant reduction of total sulfhydryl groups and the antioxidant capacity, in plasma and urine, respectively, from patients with PAemia and MMAemia at diagnosis. On the other hand, patients with PAemia and MMAemia under treatment

with L-carnitine, low-protein diet and amino acids semi-synthetic formula presented a significant reduction of malondialdehyde, protein carbonyl groups, isoprostanes and di-tyrosine in relation to untreated patients. Furthermore, it was observed an inverse correlation between free ($r = -0,67$, $p < 0,05$) and total ($r = -0,66$, $p < 0,05$) plasma L-carnitine concentrations and the malondialdehyde levels, as well as between the urinary biomarkers of oxidative damage and the free and total L-carnitine concentrations. Subsequently, it was investigated the *in vitro* effect of L-carnitine, at concentrations detected in blood of untreated (30 μM) and treated patients with PAemia and MMAemia (60-150 μM) on DNA damage induced by propionic and methylmalonic acids in human healthy peripheral leukocytes, using the comet assay. The results of this study showed that propionic (2-5 mM) and methylmalonic (0.5-5 mM) acids were able to significantly stimulate *in vitro* DNA damage index (DI) when compared to the control group. *In vitro* treatment with L-carnitine significantly reduced DNA damage induced by 5 mM PA and MMA, in a concentration-dependent manner. Furthermore, L-carnitine prevented cells with damage classes 3 and 4 induced by 5 mM MMA, and the dose of 150 μM of this compound prevented the harmful effects on DNA by both acids. Finally, it was investigated the butyrylcholinesterase activity and the malondialdehyde concentrations in plasma from patients with disorders of propionate metabolism at diagnosis and under therapy with L-carnitine and low-protein diet. The found results showed that the butyrylcholinesterase activity is significantly reduced, whereas the malondialdehyde concentrations are increased in plasma from patients at diagnosis. On the other hand, patients under treatment presented malondialdehyde levels and butyrylcholinesterase activity statistically similar to controls. It was also observed a significant negative correlation between this enzyme activity and the malondialdehyde concentrations in plasma from the affected patients. In conclusion, these results allow to suggest that the treatment with L-carnitine and protein restricted diet may offer protection against the oxidative damage to biomolecules (lipids, proteins and DNA) and the reduced butyrylcholinesterase activity that may contribute, at least in part, to the pathophysiology of the disorders of propionate metabolism.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

O termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi utilizado pela primeira vez em 1908 pelo inglês Archibal Garrod, quando observou que indivíduos portadores de alcaptonúria, na sua maioria filhos de pais consanguíneos, excretavam na urina quantidades aumentadas de ácido homogentísico. Baseado na observação de que o ácido homogentísico era produzido a partir do catabolismo da tirosina, Garrod propôs que o acúmulo ocorria devido a um bloqueio na rota de degradação dessa molécula e sugeriu o caráter mendeliano recessivo para explicar a acentuada prevalência em irmãos (Waber, 1990; Scriver *et al.*, 2001). Em 1945, Beadle demonstrou que a síntese protéica está intimamente relacionada a genes específicos, permitindo explicar a causa de mutações nos genes das enzimas envolvidas (Mueller e Young, 1995).

Os EIM ocorrem devido a mutações genéticas que resultam em anormalidades na síntese de uma proteína, geralmente uma enzima, alterando as suas funções. Tal alteração leva a um bloqueio de uma determinada via metabólica, com conseqüente acúmulo de substratos da enzima deficiente e derivados deles, bem como diminuição da síntese do produto. Dependendo da rota afetada, esse bloqueio repercute de maneira clínica muito variável, sendo geralmente de sintomatologia grave e muitas vezes letal. A tabela 1 apresenta as manifestações clínicas e laboratoriais mais frequentes nos EIM. Além de enzimas, os EIM podem ocorrer devido à função deficiente de outras proteínas, como proteínas transportadoras, receptores, fatores de coagulação e transcrição, entre outros (Scriver *et al.*, 2001).

Tabela 1. Principais manifestações clínicas e laboratoriais dos erros inatos do metabolismo no período neonatal (Burton, 1987).

<i>Manifestações clínicas</i>	<i>Manifestações laboratoriais</i>
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Vômitos ➤ Diarréia ➤ Letargia ➤ Coma ➤ Convulsões ➤ Hipotonia muscular ➤ Hepatomegalia ➤ Deficiência de crescimento ➤ Dificuldade alimentar ➤ Dificuldade respiratória e apnéia ➤ Anormalidades oculares ➤ Dismorfias 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Acidose metabólica ➤ Hipoglicemia ➤ Hiperamonemia ➤ Elevação de transaminases ➤ Trombocitopenia ➤ Neutropenia ➤ Anemia ➤ Presença de substâncias reductoras na urina

Os EIM correspondem cerca de 10% do total de doenças genéticas, sendo descritos aproximadamente 500 distúrbios envolvendo defeitos de síntese, degradação, transporte ou armazenamento de moléculas no organismo (Gimenez-Sanchez *et al.*, 2001).

Em 2001, Saudubray e Charpentier classificaram os EIM em três grandes grupos:

a) Doenças cujos sintomas são devidos a uma deficiência na produção ou utilização de energia que ocorre no fígado, miocárdio, músculos, encéfalo ou outros tecidos. Este grupo pode ser dividido em defeitos do metabolismo mitocondrial ou citoplasmático. Os defeitos mitocondriais incluem as acidemias lácticas congênitas, os defeitos na oxidação de ácidos graxos ou no metabolismo respiratório mitocondrial. Os transtornos citoplasmáticos incluem defeitos na glicólise, no metabolismo do glicogênio, os hiperinsulinismos, as anomalias no metabolismo da creatinina, entre outros. Os sinais comuns deste grupo

compreendem hipoglicemia, hiperlactecemia, hepatomegalia, hipotonia generalizada intensa, cardiomiopatia e morte súbita.

b) Distúrbios na síntese ou degradação de macromoléculas complexas: caracterizam-se, na sua maioria, pela deficiência de proteínas relacionadas com o complexo de Golgi ou lisossomos, acarretando no acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos e manifestando-se, geralmente, de forma crônica e progressiva. Fazem parte desse grupo as doenças lisossômicas de depósito (ex: doença de Gaucher, mucopolissacaridoses, etc.), as doenças peroxissomais (ex: adrenoleucodistrofia ligada ao X, doença de Refsum, etc.) e os erros congênitos da síntese de colesterol.

c) Erros inatos do metabolismo intermediário: caracterizam-se por defeitos no metabolismo intermediário de moléculas pequenas, levando a um acúmulo de componentes tóxicos próximos ao bloqueio metabólico. Os pacientes afetados por esses distúrbios alternam períodos livres de sintomas com sinais clínicos de “intoxicação”, que podem ser agudos (vômitos, coma, insuficiência hepática, complicações tromboembólicas) ou crônicos (atraso no desenvolvimento, retardo mental, cardiomiopatia, etc.). Os episódios de crise metabólica são geralmente precedidos por condições de catabolismo acelerado, tais como febre, cirurgias, infecções, jejum e ingestão de alimentos. Pertencem a esse grupo as aminoacidopatias (ex: fenilcetonúria, tirosinemia, homocistinúria, etc.), as acidemias orgânicas (ex: acidemia propiônica, metilmalônica, isovalérica, etc.), os defeitos do ciclo da uréia (ex: citrulinemia, argininemia, etc.) e as porfirias.

Alguns estudos que investigaram a incidência relativa dos vários grupos de EIM revelaram que dois terços destes distúrbios correspondem às aminoacidopatias e acidemias orgânicas, sendo outro terço correspondente a todas as outras doenças (Hoffmann, 1994). Para a maioria dessas desordens, o prognóstico é dependente do diagnóstico precoce e instituição de uma terapia adequada. Quando isso não é possível, a ocorrência de novos casos pode ser evitada pelo aconselhamento genético a casais de risco (Burton, 1998).

Este trabalho tratará de dois erros inatos do metabolismo pertencentes ao grupo das acidemias orgânicas, a acidemia propiônica (PAemia) e a acidemia metilmalônica (MMAemia), as quais são chamadas, em conjunto, de desordens do metabolismo do propionato.

1.2 DESORDENS DO METABOLISMO DO PROPIONATO: ACIDEMIA PROPIÔNICA E ACIDEMIA METILMALÔNICA

Nos mamíferos, a maior parte do propionil-CoA é gerada pelo catabolismo dos aminoácidos isoleucina, valina, metionina e treonina, dos ácidos nucleicos timina e uracila, pela β -oxidação de ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono e pela degradação da cadeia lateral do colesterol (Ogier *et al.*, 1990; Fenton *et al.*, 2001), que ocorre no músculo, fígado, rim, cérebro e muitos outros órgãos. Para ser utilizado como fonte energética, o propionil-CoA deve ser inicialmente carboxilado a D-metilmalonil-CoA, pela enzima propionil-CoA carboxilase, o qual é convertido à configuração L pela metilmalonil-CoA racemase. O substrato L-metilmalonil-CoA sofre uma reação de isomerização catalisada pela enzima metilmalonil-CoA mutase, produzindo succinil-CoA, que é utilizado no ciclo de Krebs para produção de ATP (figura 1) (Fenton *et al.*, 2001).

A PAemia é uma doença autossômica recessiva, causada pela atividade deficiente da enzima propionil-CoA carboxilase (EC 6.4.1.3), cuja prevalência é estimada em 1:40.000 recém nascidos vivos. Esta enzima mitocondrial é composta por duas subunidades, α e β , codificadas, respectivamente, pelos genes *PCCA* do cromossomo 13 e *PCCB* do cromossomo 3, e requer como cofatores biotina e Mg^{+2} , que se encontram ligados exclusivamente à subunidade α . Já foram descritas cerca de 40 mutações no *PCCA* e 60 no *PCCB* (Fenton *et al.*, 2001; Sass *et al.*, 2004; Deodato *et al.*, 2006).

A atividade deficiente da enzima propionil-CoA carboxilase leva ao acúmulo nos tecidos e fluidos biológicos de propionil-CoA e, conseqüentemente, de propionato, o qual pode atingir concentrações entre 2,5 e 5 mM, no plasma e

no líquor, e de 11 a 14,5 mol/mg de creatinina na urina dos pacientes afetados (Hoffmann *et al.*, 1993). Outros metabólitos como metilcitrato, propionilglicina e propionilcarnitina, produzidos pela condensação do propionil-CoA com oxaloacetato, glicina e carnitina, respectivamente, além do ácido 3-OH-propiónico e de intermediários do catabolismo da leucina (ácido tíglico, tiglilglicina, 2-metil-3-hidroxi-butirato, 3-hidroxi-butirato e metilmalonato) também podem aparecer em concentrações aumentadas, principalmente durante os episódios de crise (Chalmers e Lawson, 1982; Fenton *et al.*, 2001).

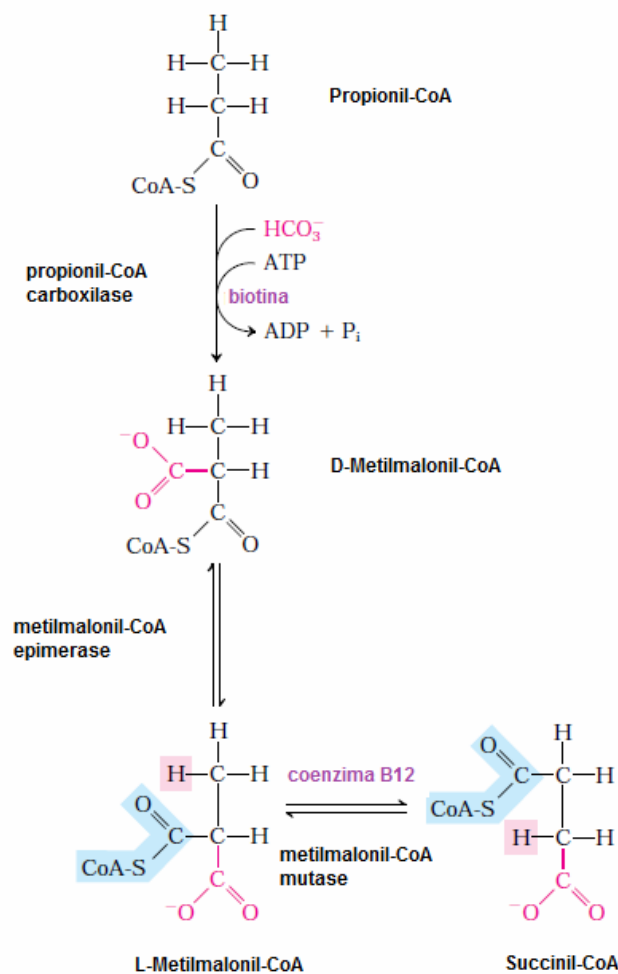


Figura 1. Metabolismo do propionil-CoA. Adaptado de Fenton *et al.*, 2001.

A MMAemia compreende um grupo heterogêneo de desordens do metabolismo do metilmalonato e da cobalamina, com uma prevalência aproximada de 1:48.000 recém-nascidos vivos (Coulombe *et al.*, 1981; Deodato *et al.*, 2006). Aproximadamente 50% dos casos se devem à atividade deficiente da enzima metilmalonil-CoA mutase (EC 5.4.99.2), codificada pelo gene *MUT* localizado no cromossomo 6. A enzima é um dímero de subunidades idênticas (α_2) e requer como cofator adenosilcobalamina, uma das formas da vitamina B₁₂ (Nham *et al.*, 1990; Fenton *et al.*, 2001). Mutações no gene *MUT* podem resultar na deficiência parcial, mut (-), ou total, mut (0), da atividade enzimática (Van Gosen, 2008). Mais de 80 mutações para esse gene já foram descritas. Os demais casos de MMAemia se devem a defeitos na síntese e ativação (*cblA*, *cblB*, *cblC*, *cblD* e *cblE*) ou transporte da cobalamina (Fenton *et al.*, 2001).

Tanto a deficiência da enzima metilmalonil-CoA mutase, como de seu cofator, levam ao acúmulo de metilmalonil-CoA e, por conseguinte, de ácido metilmalônico nos tecidos dos pacientes, o qual pode atingir concentrações de até 5 mM, no plasma e no líquor, e de 1.000 – 10.000 mmol/mol de creatina na urina dos pacientes (Hoffmann *et al.*, 1993; Manoli e Venditti, 2010). Além do ácido metilmalônico, outros metabólitos, característicos da PAemia, também se acumulam secundariamente na MMAemia, como os ácidos propiônico, 3-OH-propionico, tíglico e metilcítrico (Chalmers e Lawson, 1982; Nyhan *et al.*, 2005).

As manifestações clínicas da PAemia e da MMAemia são semelhantes e normalmente ocorrem na primeira semana de vida, podendo também manifestar-se mais tardiamente. No período neonatal os sintomas incluem problemas gastrointestinais, vômitos, recusa alimentar, desidratação, ataxia, apnéia, taquipnéia e hepatomegalia, além de manifestações neurológicas como postura e movimentos anormais, hipotonia generalizada, letargia e convulsões. Se não forem adequadamente tratados, os pacientes podem progredir até o coma e morrerem dentro de poucos dias ou desenvolverem dano neurológico permanente (Deodato *et al.*, 2006).

Nas formas tardias dessas doenças, a apresentação clínica é variável, podendo manifestar-se por uma encefalopatia aguda, potencialmente fatal, ou até

mesmo por sintomas intermitentes e crônicos, tais como ataxia intermitente, distúrbios comportamentais, como, por exemplo, agressividade e déficit de atenção, anorexia, vômitos recorrentes, insuficiência renal, bem como atraso no crescimento e no desenvolvimento. As crises de descompensação metabólica são normalmente desencadeadas por situações de catabolismo acelerado (infecções, cirurgias, etc.) ou por ingesta excessiva de proteínas (Fenton *et al.*, 2001; Deodato *et al.*, 2006).

Os achados laboratoriais mais frequentes nesses pacientes são cetoacidose metabólica, hiperglicinemia, hiperamonemia, episódios alternados de hipo ou hiperglicemia, acidose láctica, anemia, leucopenia, trombocitopenia, deficiência de carnitina livre, bem como aumento de acilcarnitinas (Lehnert *et al.*, 1994; Van Gosen, 2008). Os achados neuropatológicos das acidemias metilmalônica e propiônica são similares e incluem desmielinização, atrofia cerebral, anormalidades na substância branca e nos gânglios basais (Fenton *et al.*, 2001; Harting *et al.*, 2008).

Embora a prevalência da acidemia propiônica e da acidemia metilmalônica no Brasil não estejam ainda bem estabelecidas, sabe-se que essas duas desordens estão entre as mais frequentes acidemias orgânicas diagnosticadas em crianças brasileiras (tabela 2), bem como em outros países (Wajner *et al.*, 2009). O diagnóstico consiste, basicamente, na identificação de padrões anormais na excreção dos ácidos propiônico e metilmalônico, bem como de seus metabólitos, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, ou pela análise do perfil de acilcarnitinas no sangue, especificamente propionilcarnitina e metilmalonilcarnitina, por espectrometria de massas em tandem. Também são observadas outras anormalidades através de cromatografia, tais como hiperglicinemia e hiperalaninemia (Ogier de Baulny e Saudubray, 2002; Deodato *et al.*, 2006). O diagnóstico definitivo também pode ser realizado através da determinação da atividade das enzimas deficientes, propionil-CoA carboxilase na PAemia e metilmalonil-CoA mutase na MMAemia, em leucócitos e/ou fibroblastos dos pacientes. Além disso, em casos de risco durante a gravidez, o diagnóstico pré-natal rápido e confiável pode ser realizado pela medida direta dos

metabólitos no líquido amniótico, ou pela determinação da atividade enzimática em cultura de células amnióticas ou biópsia de vilosidades coriônicas (Nyhan *et al.*, 2005). A análise molecular tem demonstrado uma variedade de mutações causadoras dessas doenças (Worgan *et al.*, 2006; Desviat *et al.*, 2009).

Tabela 2. Acidemias orgânicas diagnosticadas na população pediátrica brasileira durante o período de janeiro de 1994 a julho de 2008 (Wajner *et al.*, 2009).

Doenças	Número de pacientes (%)
Número de pacientes analisados	6866
Número de pacientes diagnosticados	218 (3.17%)
Acidemias láticas	57 (26.1%)
<i>Acidemia metilmalônica</i>	34 (15.6%)
Acidemia glutárica tipo I	33 (15.1%)
<i>Acidemia propiônica</i>	18 (8.26%)
Acidúria 3-hidróxi-3-metilglutárica	17 (7.80%)
Acidúria L-2-hidróxi-glutárica	9 (4.13%)
Deficiência de múltiplas carboxilases	9 (4.13%)
Acidemia glutárica tipo II	8 (3.67%)
Acidemia isovalérica	7 (3.21%)
Alcaptonúria	5 (2.29%)
Deficiência de 3-hidróxi-acil-CoA-desidrogenase	5 (2.29%)
Doença de Canavan	4 (1.83%)
Acidúria 3-metilglutacônica	4 (1.83%)
Deficiência de 3-metil-crotonilglicina-CoA carboxilase	2 (0.92%)
Acidúria D-2-hidróxi-glutárica	1 (0.46%)
Acidúria D-glicérica	1 (0.46%)
Deficiência de glutatona sintetase	1 (0.46%)
Deficiência de 3-cetotiolase	1 (0.46%)
Deficiência de carnitina palmitoil transferase II	1 (0.46%)

1.2.1 Fisiopatogenia

O acúmulo de metabólitos tóxicos nas acidemias propiônica e metilmalônica resulta em efeitos inibitórios em várias vias do metabolismo intermediário. A inibição do complexo piruvato desidrogenase (Gregersen, 1981), da carbamoil fosfato sintase (Filipowicz *et al.*, 2006), da N-acetilglutamato sintase (Lehnert *et al.*, 1994) e do sistema de clivagem da glicina em serina pelo propionil-CoA (Fenton *et al.*, 2001), assim como a inibição das enzimas piruvato carboxilase (Oberholzer *et al.*, 1967), β -hidroxibutirato desidrogenase (Dutra *et al.*, 1993) e lactato desidrogenase (Saad *et al.*, 2006) pelo metilmalonil-CoA, podem explicar alguns achados clínicos observados nessas doenças, como hipoglicemia, hiperamonemia, cetoacidose, hiperglicinemia e acidemia láctica (Ogier de Baulny e Saudubray, 2002).

Embora o ácido metilmalônico seja predominantemente produzido no fígado e nos rins, pequenas quantidades desse metabólito também são geradas no cérebro. Assim, é possível que a neurodegeneração observada em pacientes com acidemia metilmalônica possa resultar do acúmulo intracerebral desse ácido orgânico (Melo *et al.*, 2011). Durante as crises agudas de encefalopatia, os pacientes com MMAemia apresentam quantidades aumentadas de ácido láctico no globo pálido, sugerindo uma inibição *in vivo* da oxidação mitocondrial do piruvato (Trinh *et al.*, 2001). Os efeitos tóxicos do ácido metilmalônico sobre o metabolismo mitocondrial e, conseqüentemente sobre a produção de ATP, têm sido atribuídos à inibição de complexos da cadeia respiratória, enzimas do ciclo de Krebs e do complexo Na^+, K^+ -ATPase evidenciados através de modelos experimentais da doença (Wajner e Coelho, 1997; Brusque *et al.*, 2002; Wyse *et al.*, 2000). Nesse sentido, de Keyzer e colaboradores (2009) demonstraram deficiências nos complexos da cadeia respiratória em fígado, rins, coração e músculo esquelético de pacientes portadores da acidúria metilmalônica. Também foi demonstrado que o ácido metilmalônico inibe a enzima creatina quinase mitocondrial em córtex cerebral de ratos (Schuck *et al.*, 2004), o que pode estar relacionado à menor produção de ATP observada em culturas de células de estriado expostas ao ácido

metilmalônico (McLaughlin *et al.* 1998). Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que excitotoxicidade secundária, alterações na fosforilação de proteínas do citoesqueleto, diminuição no conteúdo de gangliosídeos cerebrais, bem como estresse oxidativo podem estar envolvidos na etiologia do dano neurológico observado na MMAemia (De Mello *et al.*, 1996; Fighera *et al.*, 1999; Fontella *et al.*, 2000; Okun *et al.*, 2002; de Almeida *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2005; Wajner *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2011).

De maneira semelhante, os metabólitos acumulados na PAemia também provocam alterações no metabolismo energético cerebral. Foi demonstrado que o propionil-CoA e um dos seus derivados, o 2-metilcitrato, inibem enzimas do ciclo de Krebs, como a succinil-CoA sintase, citrato sintase, aconitase e isocitrato desidrogenase (Morath *et al.*, 2008). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o propionil-CoA inibe a atividade dos complexos da α -cetoglutarato desidrogenase e piruvato desidrogenase (Schwab *et al.*, 2006), enquanto o propionato diminui a captação de corpos cetônicos pelo cérebro e a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos (Dutra *et al.* 1991; Wyse *et al.* 1998; Schwab *et al.* 2006). Em pacientes com acidemia propiônica também foi encontrada disfunção mitocondrial caracterizada por deficiências na cadeia respiratória em diversos tecidos (Schwab *et al.*, 2006; de Keyzer *et al.*, 2009) e aumento de lactato no globo pálido (Burlina *et al.*, 2003). Ainda, foi demonstrado que a injeção intraestriatal de ácido propiônico em cérebro de ratos provoca convulsões e dano oxidativo proteico através de mecanismos glutamatérgicos (Rigo *et al.*, 2006).

1.2.2 Tratamento

O tratamento dos pacientes portadores de acidemia propiônica ou metilmalônica consiste, basicamente, em restringir a alimentação protéica (0,5 a 1,5 g/Kg/dia) ou, preferencialmente, reduzir a ingestão dos aminoácidos precursores do propionato (Thomas *et al.*, 1994). Os episódios de cetoacidose devem ser tratados com a retirada total de proteínas da dieta, administração

parenteral de bicarbonato de sódio, bem como de soro glicosado para evitar o catabolismo. Antibióticos, como a neomicina ou metronidazol, podem ser utilizados para diminuir a flora intestinal que contribui para a elevação das concentrações plasmáticas de propionato. A hiperamonemia pode ser corrigida com a administração de carbamilglutamato (50-100 mg/kg/dia) ou benzoato de sódio (150-250 mg por dia). Além disso, o excesso de metabólitos tóxicos pode ser eliminado através de diálise peritoneal ou hemodiálise (de Baulny *et al.*, 2005; Van Gosen, 2008).

Outra estratégia terapêutica é a administração dos cofatores das enzimas deficientes, biotina (5-20 mg/dia), nos casos de PAemia, e hidroxicoalamina, via oral (1-2 mg/dia) ou intramuscular, aos pacientes com as variantes cblA, cblB, cblC, cblD e cblE da MMAemia. O transplante de fígado tem sido realizado em alguns pacientes com PAemia e MMAemia, na tentativa de corrigir o defeito metabólico básico. Entretanto, embora o transplante melhore a qualidade de vida dos pacientes, a atividade enzimática em outros órgãos, particularmente no SNC e nos rins, não é corrigida e os pacientes permanecem com um alto risco de desenvolverem as complicações dessas doenças (Deodato *et al.*, 2006; Van Gosen, 2008).

A L-carnitina possui um papel relevante no tratamento das acidemias orgânicas, entre elas a propiônica e metilmalônica. Esta substância é capaz de se conjugar e aumentar a excreção dos ácidos orgânicos acumulados nessas doenças, através da ação da enzima carnitina aciltransferase, que catalisa a formação de ésteres de carnitina, como a propionilcarnitina e metilmalonilcarnitina. Além disso, o tratamento com L-carnitina pode resultar em outros efeitos bioquímicos benéficos aos pacientes, como a restauração da razão acil-CoA/CoA livre intramitocondrial e a correção da deficiência secundária de carnitina (Hoppel, 2003; Walter, 2003). As doses empregadas variam de 100 a 200 mg/Kg/dia via oral ou intravenosa (Saudubray *et al.*, 2006). A L-carnitina (ácido 3-hidróxi-4-(*N*-trimetilamônio) butírico) (figura 2) é um componente de baixo peso molecular, presente nos mamíferos na forma de carnitina livre e carnitina acilada, que é o produto da reação de transferência de grupamentos acil da acil coenzima A (acil-

CoA). Tipicamente, nos indivíduos saudáveis, aproximadamente 80 a 85% da L-carnitina está presente em sua forma livre no plasma, correspondendo a concentrações de aproximadamente 40 a 50 $\mu\text{mol/L}$. Cerca de 75% da L-carnitina presente no nosso organismo é obtida a partir de fontes dietéticas, que incluem principalmente produtos animais, particularmente carne vermelha e laticínios, sendo o restante gerado a partir de biossíntese endógena no fígado, rins e cérebro, a partir dos aminoácidos precursores, lisina e metionina (Bremer, 1983; Hoppel, 2003).

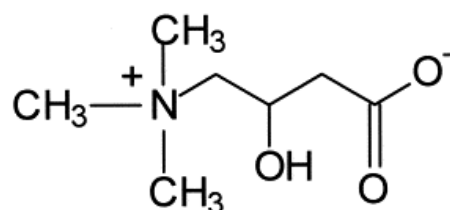


Figura 2. Estrutura química da L-carnitina.

A L-carnitina desempenha um importante papel no metabolismo energético, uma vez que essa molécula transporta ácidos graxos de cadeia longa presentes no citosol para a matriz mitocondrial, onde são utilizados na produção de ATP através da β -oxidação. A L-carnitina também participa na oxidação peroxissomal de ácidos graxos, na produção de corpos cetônicos e na oxidação de aminoácidos de cadeia ramificada. Devido a sua interação em diversos processos bioenergéticos, a L-carnitina assume especial importância em doenças associadas com comprometimento metabólico e a deficiência desse composto pode provocar efeitos deletérios sobre o SNC (Hoppel, 2003; Virmani e Binienda, 2004).

Além dessas funções, nos últimos anos muitos pesquisadores têm demonstrado propriedades antioxidantes e antiperoxidativas para a L-carnitina. A ação antiperoxidativa da L-carnitina é atribuída a sua capacidade de quelar íons Fe^{+2} , evitando a formação de espécies reativas através da reação de Fenton

(Reznick *et al.*, 1992; Muthuswamy *et al.*, 2006). Outros estudos mostraram que a L-carnitina é capaz de sequestrar algumas espécies reativas do oxigênio, como o radical superóxido (Gülçin, 2006), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^*) (Reznick *et al.*, 1992; Gülçin, 2006; Derin *et al.*, 2004), impedindo suas ações oxidantes. A L-carnitina também demonstrou potencial efeito na prevenção da peroxidação lipídica e oxidação protéica, no aumento das concentrações de glutathione (GSH) e da atividade de enzimas antioxidantes em algumas doenças, incluindo a doença de Alzheimer (Rani e Panneerselvam, 2002; Abdul e Butterfield, 2007; Gómez-Amores *et al.*, 2007; Tastekin *et al.*, 2007; Sitta *et al.*, 2009a).

1.3 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS

Os átomos contêm um núcleo e os elétrons movem-se ao redor desse núcleo, usualmente aos pares. Os radicais livres são moléculas ou átomos, capazes de uma existência independente, que possuem elétrons não pareados no seu orbital mais externo. Esse desemparelhamento de elétrons, situação energeticamente instável, confere alta reatividade a essas espécies, fazendo com que adquiram uma forte tendência a iniciar reações em cadeia pela retirada de um elétron da molécula vizinha para completar seu próprio orbital (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Os radicais livres podem ser formados pela perda ou ganho de um elétron de um não-radical. Radicais podem também ser formados em um processo de fissão homolítica, no qual uma ligação covalente é quebrada e cada elétron do par compartilhado permanece com cada um dos átomos envolvidos (Halliwell e Gutteridge, 1999a,b).

O termo espécies reativas do oxigênio (ERO) abrange não somente espécies radicalares derivadas do oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical OH^* , mas também espécies não radicalares potencialmente oxidantes, como o H_2O_2 , o ozônio (O_3), o ácido hipocloroso (HOCl), entre outras. Além

destas, existem as espécies reativas do nitrogênio (ERN), representadas principalmente pelo óxido nítrico (NO^{\bullet}) e pelo peroxinitrito (ONOO^{-}) (Halliwell e Gutteridge, 2007). O óxido nítrico é um radical livre, gerado nos sistemas biológicos pela enzima óxido nítrico sintase, que desempenha um papel fundamental na neurotransmissão, na vasodilatação e na resposta imune (Giulivi *et al.*, 1998). Apesar de ser um fraco oxidante, o óxido nítrico pode ser convertido a peroxinitrito, ao reagir com o radical superóxido, o qual é capaz de oxidar tióis, lipídios e resíduos de aminoácidos em proteínas (Pryor *et al.*, 1994).

As fontes geradoras de radicais livres podem ser endógenas (subprodutos do metabolismo aeróbico) ou exógenas (dieta inadequada, fumo, uso de quimioterápicos e outras drogas, exposição à radiação ionizante ou eletromagnética, etc.). A fosforilação oxidativa (síntese de ATP direcionada pela transferência de elétrons ao oxigênio) é uma importante fonte geradora de ERO (figura 3). Aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido em intermediários reativos como o H_2O_2 , o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o radical OH^{\bullet} (Ames *et al.*, 1993; Dröge, 2002).

Além da cadeia respiratória mitocondrial, o H_2O_2 também pode ser produzido *in vivo* pela ação de várias enzimas, como NADPH oxidases, monoaminoxidase, a glicolato oxidase e a xantina oxidase (Brodie e Reed, 1987; Forman, 2007). Embora não seja um radical livre, o H_2O_2 é capaz de produzir, ao reagir com metais de transição como o Fe^{+2} e o Cu^{+2} , a espécie reativa do oxigênio mais danosa, o radical hidroxila, que, ao contrário do ânion $\text{O}_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 , pode atacar e danificar todas as biomoléculas, incluindo lipídios, proteínas e DNA (Halliwell e Gutteridge, 2007).

As espécies reativas do oxigênio, em baixas concentrações, são indispensáveis em muitos processos fisiológicos, incluindo a regulação da sinalização celular, apoptose e defesa do organismo contra agentes infecciosos. Entretanto, uma produção excessiva dessas espécies, ou sua remoção inadequada, leva a uma condição conhecida como estresse oxidativo, que pode ter como consequências a peroxidação lipídica, a oxidação e inativação de

proteínas, além de lesões no DNA, podendo levar à perda da função ou, até mesmo, à morte celular (Dröge, 2002; Halliwell e Gutteridge, 2007).

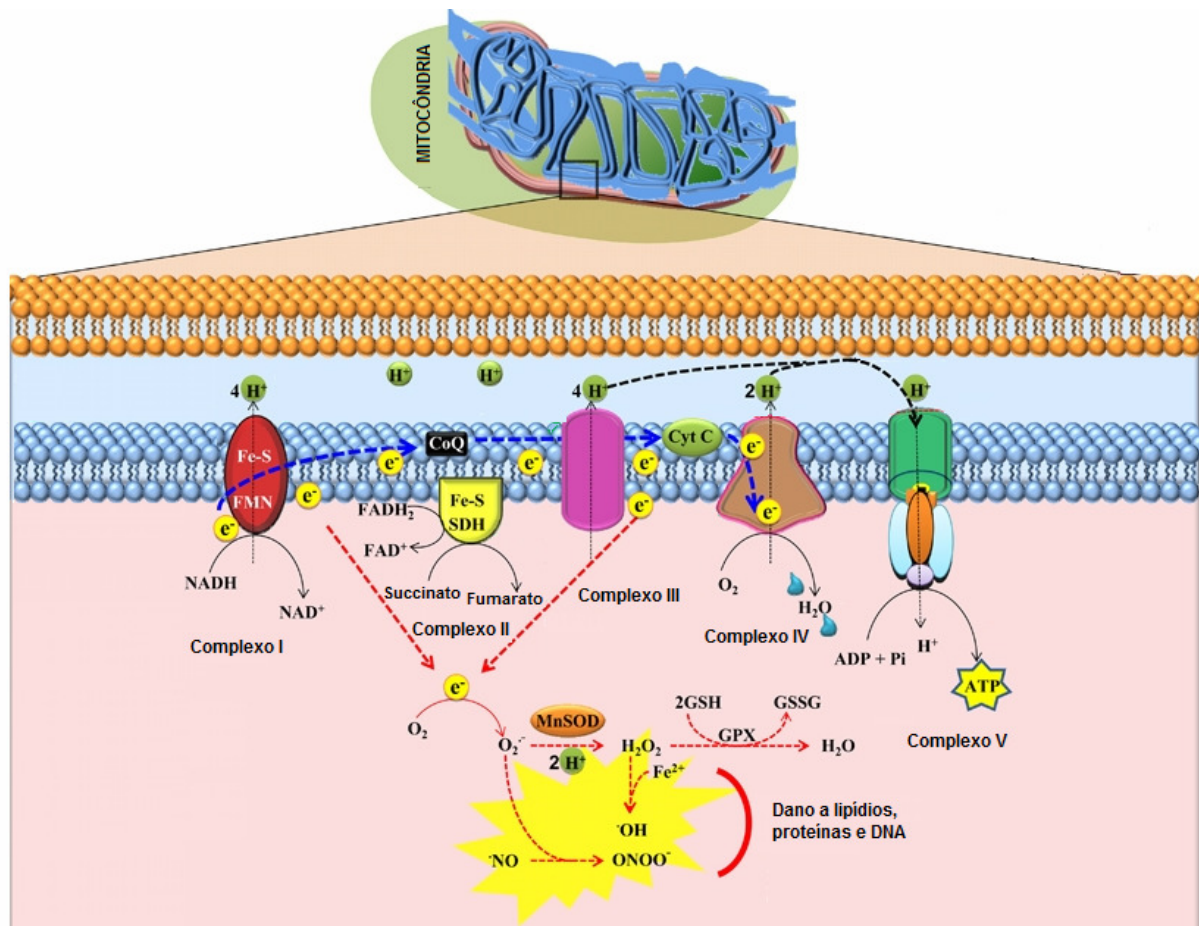


Figura 3. Diagrama esquemático da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, mostrando a formação de espécies reativas do oxigênio e sua remoção por enzimas antioxidantes (Adaptado de Mehta e Li, J. Cereb Blood Flow Metab. 29:1069-1078, 2009).

1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Pequenas quantidades de ERO são constantemente geradas nos organismos aeróbicos em resposta a estímulos internos e externos. Para se proteger do dano celular que pode ser provocado por essas espécies, os sistemas biológicos desenvolveram diversos mecanismos de defesa (Matés *et al.*, 1999). O processo de defesa contra o estresse oxidativo induzido por radicais livres envolve mecanismos de reparo, mecanismos físicos e mecanismos antioxidantes (Valko *et al.*, 2007).

Halliwell e Gutteridge definiram um antioxidante como uma substância que, quando presente em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, significativamente retarda ou previne a oxidação desse substrato. O termo “substrato oxidável” inclui todo o tipo de molécula encontrada *in vivo* (Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007).

As defesas antioxidantes podem atuar impedindo a geração ou removendo as espécies reativas formadas, minimizando a viabilidade de formação de agentes pró-oxidantes, sequestrando ERO e ERN, sequestrando íons metálicos de transição, removendo ácidos graxos peroxidados ou promovendo redução enzimática de peróxidos. Esses sistemas de defesa podem ser divididos em enzimáticos ou não-enzimáticos (Thomas, 2000; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Entre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutationa peroxidase e glutationa redutase. A superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do ânion superóxido a O_2 e a H_2O_2 . Esta enzima apresenta três isoformas, a CuZn-SOD, localizada no citosol, lisossomas, núcleo e peroxissomas; a Mn-SOD, localizada na matriz mitocondrial e a SOD extracelular. O H_2O_2 pode, por sua vez, ser convertido à água e O_2 , através da reação catalisada pela catalase (CAT), enzima presente, principalmente, nos peroxissomos dos hepatócitos. A glutationa peroxidase (GSH-Px) catalisa a decomposição de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos, através da oxidação da glutationa reduzida (GSH) ao dissulfeto correspondente (GSSG). Esta enzima contém um resíduo de seleno-cisteína em cada uma das suas quatro

subunidades, e sua atividade é mais elevada no fígado e eritrócitos em relação a outros tecidos. A glutathiona oxidada, produzida pela ação da GSH-Px, retorna à sua forma reduzida através da reação catalisada pela glutathiona redutase, que utiliza NADPH como coenzima (Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007; Salvador e Henriques, 2004).

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser representados por moléculas sintetizadas no próprio organismo, como a bilirrubina, melatonina, ácido úrico, coenzima Q e GSH, ou por compostos obtidos a partir da dieta, como as vitaminas A, C e E, carotenóides, flavonóides e polifenóis. O mecanismo de atuação desses antioxidantes é bastante diverso, podendo envolver a remoção do oxigênio presente no meio, o sequestro de ERO, a prevenção de reações formadoras de radicais livres, a quelação de íons metálicos, o reparo do DNA, entre outros (Halliwell e Gutteridge, 2007). O tripeptídeo GSH é um dos mais efetivos e abundantes antioxidantes, principalmente no cérebro, onde suas concentrações alcançam 1-10 mmol/L. A GSH também mantém o equilíbrio redox da célula e inativa EROs (Bast, 1993). No plasma sanguíneo, as defesas antioxidantes são representadas pela albumina, bilirrubina, ácido úrico, vitamina E, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, entre outras moléculas (Halliwell e Gutteridge, 2007; Fang *et al.*, 2002).

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO

As EROs são produtos inevitáveis do metabolismo aeróbico. Nosso organismo está, normalmente, em equilíbrio entre a produção e degradação de radicais livres, que existem em baixas concentrações em todos os tecidos biológicos (Dröge, 2002).

O termo estresse oxidativo refere-se a um desbalanço entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. Esse desequilíbrio resulta de situações patológicas que levam a uma diminuição da capacidade antioxidante, ou a um aumento na produção de espécies reativas, ou, ainda, combinação de

ambos, podendo causar danos a todos os tipos de biomoléculas (DNA, RNA, proteínas e lipídios) (Salvador e Henriques, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2007).

A oxidação lipídica (lipoperoxidação) é um processo fisiológico contínuo que ocorre normalmente nas membranas celulares durante sua renovação, além de ser essencial na síntese de prostaglandinas, leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose. No entanto, quando esse processo é exacerbado devido a uma formação acentuada de espécies reativas, ou por uma insuficiência das defesas antioxidantes, podem ocorrer profundas alterações na permeabilidade e fluidez das membranas celulares. Isso poderá causar perda de seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE), entre outros eventos (Ferreira e Matsubara, 1997).

Proteínas também podem ser modificadas, em suas ligações peptídicas ou na cadeia lateral dos aminoácidos, por ação direta de espécies reativas ou pelos produtos da lipoperoxidação (MDA e HNE). A oxidação protéica pode resultar na perda da função catalítica ou estrutural da proteína e pode ser evidenciada pela formação de grupamentos carbonilas nas cadeias laterais de alguns aminoácidos, diminuição de grupamentos tióis (SH) e formação de derivados nitrados, como a 3-nitrotirosina (Wajner *et al.*, 2004).

As espécies reativas de oxigênio, especialmente o radical hidroxila, podem rapidamente atacar o DNA celular, provocando uma variedade de lesões, tais como oxidação e deleção de bases, modificações do grupamento açúcar, formação de ligações cruzadas (base/base ou base/proteína), além de quebras de cadeia do DNA (simples ou duplas), que podem resultar em instabilidade genômica. As lesões do DNA provocadas por espécies reativas, quando não eficientemente reparadas pelos mecanismos de defesa celulares, podem levar à morte celular por apoptose ou necrose, erros de transcrição e replicação, indução de vias de sinalização celular, entre outros eventos, participando, dessa forma, dos estágios de iniciação, promoção e/ou progressão tumoral, além de envelhecimento e neurodegeneração (Klaunig *et al.*, 2011; Halliwell e Gutteridge, 2007).

1.6 ESTRESSE OXIDATIVO E NEURODEGENERAÇÃO

Evidências mostram que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na fisiopatogenia de um número cada vez maior de doenças, como as neoplasias, o diabetes, a aterosclerose, as doenças inflamatórias, além de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer, a esclerose múltipla, a esclerose lateral amiotrófica e alguns erros inatos do metabolismo (Reznick e Packer, 1993; Przedborski *et al.*, 1996; Halliwell, 2006; Valko *et al.*, 2007; Maiese *et al.*, 2007; Wajner *et al.*, 2004).

Diversos estudos reportaram um aumento nas concentrações de biomarcadores de dano oxidativo, bem como concentrações reduzidas de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em pacientes com doenças neurodegenerativas (Liu *et al.*, 1999; Perry *et al.*, 2003). Além disso, estudos demonstraram uma diminuição na atividade do complexo I da cadeia respiratória em cérebros *postmortem* de pacientes com doença de Parkinson, o que contribui para uma maior formação de espécies reativas (Gu *et al.*, 1996). Na doença de Alzheimer, é possível que o peptídeo β -amilóide possui a capacidade de gerar radicais livres espontaneamente. Estudos *in vivo* evidenciaram um aumento nos marcadores de dano oxidativo a proteínas e a lipídios em cérebros humanos *postmortem* de pacientes com doença de Alzheimer (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1999; Lovell *et al.*, 2000).

Nesse sentido, é importante salientar que o cérebro é um órgão altamente suscetível ao dano oxidativo, devido ao seu alto consumo de oxigênio necessário a sua alta demanda energética. Além disso, outros fatores como a presença de altas concentrações de neurotransmissores auto-oxidáveis (ex. dopamina, serotonina e norepinefrina), o alto grau de insaturação dos ácidos graxos das membranas neuronais, os baixos níveis de defesas antioxidantes, as altas concentrações de ferro, o fluxo acentuado de cálcio e a considerável quantidade de microglia, macrófagos residentes do sistema nervoso que podem produzir $O_2^{\cdot-}$

e H₂O₂, também contribuem para o aumento dessa vulnerabilidade (Halliwell, 2006).

Nos últimos anos, estudos *in vitro* e *in vivo* têm sugerido que o estresse oxidativo pode contribuir para o desenvolvimento dos achados neurológicos observados em alguns erros inatos do metabolismo, como, por exemplo, nas acidemias glutárica (Latini *et al.*, 2005), propiônica (Fontella *et al.*, 2000), metilmalônica (Fontella *et al.*, 2000; Richard *et al.*, 2007) e isovalérica (Solano *et al.*, 2008), nas aminoacidopatias homocistinúria (Matté *et al.*, 2009), tirosinemia (Bird *et al.*, 1995; Sgaravatti *et al.*, 2008), fenilcetonúria (Sirtori *et al.*, 2005; Sitta *et al.*, 2006) e doença da urina do xarope do bordo (Fontella *et al.*, 2002; Barschak *et al.*, 2006) e, também na doença peroxissomal adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (Deon *et al.*, 2007).

Nesse sentido, estudos prévios demonstraram que os ácidos propiônico e L-metilmalônico estimulam a peroxidação lipídica e a oxidação protéica e reduzem as defesas antioxidantes em cérebro de ratos (Fontella *et al.*, 2000; Fighera *et al.*, 2003; Rigo *et al.*, 2006). Além disso, a administração *in vivo* de ácido ascórbico, α -tocoferol e creatina, diminuiu a duração dos episódios convulsivos induzidos pela injeção intraestriatal aguda de ácido metilmalônico em ratos, sugerindo que o estresse oxidativo possa contribuir para o aparecimento desse sintoma (Fighera *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2005). Também foi observado um aumento na atividade da MnSOD, bem como diminuição de GSH no fígado de camundongos nocaute para o gene *mut* (Chandler *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2010), enquanto que em camundongos nocaute para a enzima óxido nítrico sintase induzível (NOSII), foi observada uma diminuição do estresse oxidativo e das convulsões causadas pela administração de MMA, sugerindo o envolvimento de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio nos efeitos causados por esse metabólito (Ribeiro *et al.*, 2009). Ainda, foi observado que o MMA induz morte celular em culturas primárias de neurônios corticais e que esse efeito é atenuado pela adição antioxidantes no meio de incubação (McLaughlin *et al.*, 1998).

Contribuindo com os achados obtidos nos estudos em animais, foi demonstrado que o PA estimula *in vitro* a produção de ânion superóxido em

neutrófilos de seres humanos (Nakao *et al.*, 1998). Também foi verificada uma diminuição nos níveis sanguíneos de α -tocoferol e GSH em pacientes com acidemia propiônica e metilmalônica, respectivamente (Moyano *et al.*, 1997; Treacy *et al.*, 1996). Além disso, Richard e colaboradores (2007) demonstraram que fibroblastos de pacientes portadores de MMAemia apresentam um aumento significativo no conteúdo intracelular de espécies reativas do oxigênio e no nível de expressão da Mn-SOD. Recentemente, Mc Guire e colaboradores (2009) observaram um aumento na excreção urinária de isoprostanos e di-tirosina, marcadores de oxidação lipídica e protéica, respectivamente, por pacientes com PAemia e MMAemia. Ainda, um estudo demonstrou uma melhora significativa na neuropatia óptica em um paciente com acidemia metilmalônica em tratamento com coenzima Q10 e alfa-tocoferol, dois conhecidos antioxidantes (Pinar-Sueiro *et al.*, 2010).

Embora o mecanismo responsável pelo estresse oxidativo nos erros inatos do metabolismo não seja totalmente compreendido, é provável que o acúmulo de metabólitos tóxicos que ocorre nessas doenças induza a formação excessiva de espécies reativas. Além disso, o efeito inibitório de alguns metabólitos sobre os complexos da cadeia respiratória e algumas enzimas do metabolismo energético pode levar a uma maior produção dessas espécies (Wajner *et al.*, 2004; Indo *et al.*, 2007).

1.7 BUTIRILCOLINESTERASE

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor sintetizado na terminação nervosa a partir de acetato e colina, por ação da enzima colina-acetiltransferase. O efeito da acetilcolina é finalizado pela atividade de colinesterases presentes na sinapse (Massoulié, 2002; Mack e Robitzki, 2000).

Na década de 30, quando os primeiros estudos envolvendo a hidrólise de ésteres de colina foram realizados, surgiu a idéia da existência da butirilcolinesterase (Stedman *et al.*, 1932). Posteriormente, descobriu-se que havia

duas enzimas com atividade colinesterásica, sendo uma dessas específica para o neurotransmissor acetilcolina, denominada acetilcolinesterase, enquanto a outra catalisava a hidrólise de outros ésteres, denominada butirilcolinesterase (Mendel e Rudney, 1943).

As colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), são constituintes ubíquos do sistema colinérgico o qual apresenta importante papel na função cognitiva (Everitt e Robins, 1997). Essas enzimas diferenciam-se quanto a sua distribuição tecidual, propriedades cinéticas, especificidade por substratos sintéticos e naturais e por inibidores seletivos. A AChE hidrolisa a acetilcolina em maior velocidade que os ésteres de colina com grupos acílicos maiores que o acetato ou propionato. Essa enzima também hidrolisa a metacolina e é inibida seletivamente por baixas concentrações de vários compostos de amônio bis-quaternário. A butirilcolinesterase, por outro lado, hidrolisa outros ésteres de colina além da acetilcolina, como a butirilcolina e a succinilcolina (Massoulié *et al.*, 1993). Além disso, a butirilcolinesterase não hidrolisa a metacolina e é mais sensível que a acetilcolinesterase à inibição por certos agentes organofosforados (Massoulié *et al.*, 1993; Cokugras e Teczan, 1997).

A butirilcolinesterase, também conhecida como pseudocolinesterase ou colinesterase não específica, está presente no soro, células hematopoiéticas, fígado, coração, endotélio vascular, sinapses colinérgicas e também no SNC (Mack e Robitzki, 2000). Estudos também mostraram a presença dessa enzima no córtex cerebral, hipocampo, amígdala e tálamo, estruturas que possuem um papel importante na cognição (Darvesh *et al.*, 1998; Darvesh *et al.*, 2003).

Tanto a AChE quanto a BuChE pertencem à classe das serina hidrolases. Quanto a sua estrutura, a butirilcolinesterase é uma glicoproteína semelhante à acetilcolinesterase, apresentando uma folha β central rodeada por α hélices. A hidrólise ocorre através de uma tríade catalítica envolvendo um grupamento hidroxila de um resíduo de serina, essencial para a atividade enzimática, o grupo imidazol de uma histidina, e um ácido glutâmico, carregado negativamente, que se liga à porção básica da colina (Darvesh *et al.*, 2003) (figura 4).

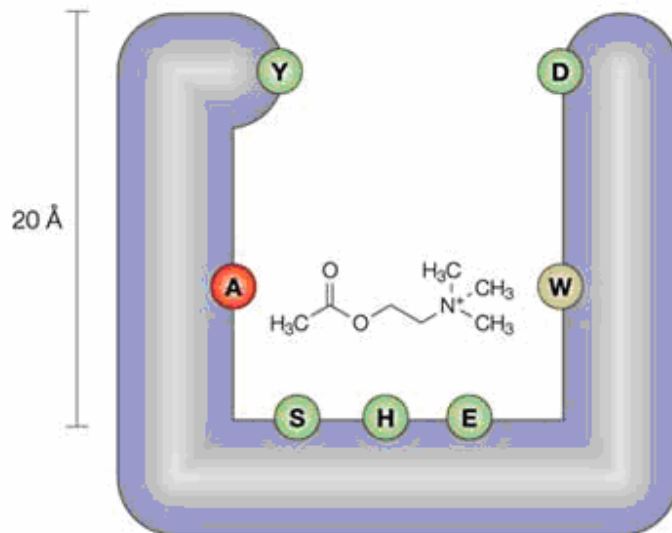


Figura 4. Sítio ativo da enzima butirilcolinesterase. A tríade catalítica consiste dos aminoácidos serina (S), histidina (H) e ácido glutâmico (E). O grupo acil do substrato (nessa figura, a acetilcolina) encaixa na porção acil da enzima (A), enquanto o nitrogênio quaternário interage com o sítio aniônico que é formado pelo aminoácido triptofano (W). Os substratos são guiados em direção ao sítio ativo através da interação com os resíduos de ácido aspártico (D) e tirosina (Y) localizados na superfície central do sítio ativo (Adaptado de Darvesh *et al.*, Nature Reviews Neuroscience 4:131-138, 2003).

Por muito tempo, a butirilcolinesterase foi considerada uma enzima não específica e não essencial para a neurotransmissão colinérgica (Darvesh *et al.*, 2003). Entretanto, nos últimos anos evidências têm sugerido que a BuChE pode atuar como um co-regulador das concentrações de acetilcolina no SNC, uma vez que a inibição dessa enzima aumenta de maneira dose-dependente a concentração desse neurotransmissor no cérebro (Giacobini, 2000). Na ausência da AChE, a BuChE parece substituí-la na manutenção da integridade estrutural e fisiológica do sistema colinérgico. Ainda, a BuChE participa da regulação da proliferação e diferenciação neuronal durante o desenvolvimento do SNC (Mesulam *et al.*, 2002; Darvesh *et al.*, 2003).

Estudos mostraram que a BuChE, juntamente com a acetilcolinesterase, possui um papel importante na agregação do peptídeo β -amilóide e na maturação das placas neuríticas características da doença de Alzheimer (Gómez-Ramos e Morán, 1997). Além disso, as atividades das colinesterases parecem estar associadas às alterações cognitivas encontradas nesses pacientes (Law *et al.*, 2001).

Recentemente, foi demonstrado que a atividade da BuChE está alterada no soro de ratos com hiperprolinemia, hiperargininemia e hiperhomocisteinemia (Wyse *et al.*, 2004; Stefanello *et al.*, 2005; Delwing *et al.*, 2005). Considerando que a BuChE sérica tem sido considerada um marcador periférico do sistema colinérgico central, é possível que a atividade alterada dessa enzima possa estar relacionada com as manifestações neurológicas observadas nessas desordens (Fossi *et al.*, 1992). Ainda, foi demonstrado um efeito protetor da administração de antioxidantes, tais como as vitaminas E e C, na prevenção da inibição da BuChE (Delwing-de Lima *et al.*, 2010). Outros trabalhos têm demonstrado a existência de uma correlação inversa entre marcadores da peroxidação lipídica e a atividade da BuChE no soro de pacientes portadores de algumas doenças, tais como diabetes gestacional, e em pacientes hemodialisados (Garcia *et al.*, 2008; Omu *et al.*, 2010). Em conjunto, esses achados sugerem que uma produção aumentada de espécies reativas pode contribuir para a alteração da atividade da BuChE em diferentes patologias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Baseando-se na hipótese de que o dano oxidativo a biomoléculas pode ocorrer nas desordens do metabolismo do propionato (acidemia propiônica e acidemia metilmalônica) como consequência do acúmulo de metabólitos tóxicos que ocorre nessas doenças, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com L-carnitina sobre o estresse oxidativo e a atividade da enzima butirilcolinesterase em fluidos biológicos (plasma e urina) de pacientes portadores dessas doenças, bem como avaliar o efeito *in vitro* deste composto sobre o dano ao DNA induzido pelos ácidos propiônico e metilmalônico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar parâmetros de estresse oxidativo no plasma e urina de pacientes com PAemia e MMAemia, no momento do diagnóstico e ao longo do tratamento com L-carnitina e dieta hipoprotéica.

2.2.2 Correlacionar as concentrações de carnitina total, livre e esterificada com os parâmetros de dano oxidativo avaliados nos dois grupos de pacientes com PAemia e MMAemia, não-tratados (grupo diagnóstico) e em tratamento com L-carnitina.

2.2.3 Avaliar o efeito *in vitro* dos ácidos propiônico (PA) e L-metilmalônico (MMA), isolado ou na presença de L-carnitina, sobre o dano ao DNA em leucócitos humanos através do ensaio cometa.

2.2.4 Avaliar a atividade da enzima butirilcolinesterase e sua relação com o dano oxidativo a lipídios, no plasma de pacientes com desordens do metabolismo do propionato no momento do diagnóstico dessas doenças e durante o tratamento com L-carnitina e dieta hipoprotéica.

3. CAPÍTULO 1: REDUCTION OF LIPID AND PROTEIN DAMAGE IN PATIENTS WITH DISORDERS OF PROPIONATE METABOLISM UNDER TREATMENT: A POSSIBLE PROTECTIVE ROLE OF L-CARNITINE SUPPLEMENTATION.

Artigo publicado no periódico *International Journal of Developmental Neuroscience* 28 (2010) 127-132.

As desordens do metabolismo do propionato (acidemia propiônica e acidemia metilmalônica) são doenças autossômicas recessivas clinicamente caracterizadas por crises metabólicas agudas no período neonatal e manifestações neurológicas cuja fisiopatologia não está totalmente elucidada. Evidências na literatura têm demonstrado propriedades antioxidantes para a L-carnitina, que é utilizada no tratamento de pacientes com acidemia propiônica e metilmalônica para aumentar a excreção dos ácidos orgânicos acumulados. Neste capítulo foram avaliados marcadores de dano oxidativo a lipídios (dosagem de malondialdeído) e a proteínas (dosagem de proteínas carboniladas e tióis totais) em amostras de plasma de pacientes com acidemia propiônica e metilmalônica obtidas no momento do diagnóstico dessas doenças e ao longo do tratamento com L-carnitina (100mg/Kg/dia) e dieta hipoprotéica. A dosagem desses marcadores também foi correlacionada com as concentrações plasmáticas de L-carnitina total, livre e esterificada. Foi verificado um aumento significativo nas concentrações de malondialdeído e de proteínas carboniladas, bem como uma redução significativa de tióis totais, no plasma dos pacientes não-tratados em relação ao grupo controle. Por outro lado, os pacientes em tratamento apresentaram uma marcante redução na dosagem de proteínas carboniladas e de malondialdeído em relação aos pacientes no momento do diagnóstico. Além disso, foi verificada uma correlação negativa significativa entre os níveis de malondialdeído e as concentrações plasmáticas de L-carnitina total e livre. Analisados em conjunto, os resultados encontrados indicam que o tratamento preconizado reduz significativamente o dano oxidativo a proteínas e a lipídios nos pacientes portadores de desordens do metabolismo do propionato e que a suplementação com L-carnitina pode estar envolvida neste efeito protetor.

Ribas GS, Manfredini V, de Mari JF, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, Sitta A, Deon M, Wajner M, Vargas CR. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int J Dev Neurosci.* 28(2):127-32, 2010.

CAPÍTULO 2: OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN URINE FROM PATIENTS WITH DISORDERS OF PROPIONATE METABOLISM: A BENEFICIAL EFFECT OF L-CARNITINE SUPPLEMENTATION

Artigo publicado no periódico Cellular and Molecular Neurobiology 32 (2012) 77-82

Oxidative Stress Parameters in Urine from Patients with Disorders of Propionate Metabolism: a Beneficial Effect of L-Carnitine Supplementation

Graziela S. Ribas · Giovana B. Biancini ·
Caroline Mescka · Carlos Y. Wayhs ·
Angela Sitta · Moacir Wajner · Carmen R. Vargas

Received: 5 February 2011 / Accepted: 30 June 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Propionic (PA) and methylmalonic (MMA) acidurias are inherited disorders caused by deficiency of propionyl-CoA carboxylase and methylmalonyl-CoA mutase, respectively. Affected patients present acute metabolic crises in the neonatal period and long-term neurological deficits. Treatments of these diseases include a protein restricted diet and L-carnitine supplementation. L-Carnitine is widely used in the therapy of these diseases to prevent secondary L-carnitine deficiency and promote detoxification, and several recent *in vitro* and *in vivo* studies have reported antioxidant and antiperoxidative effects of this compound. In this study, we evaluated the oxidative stress parameters, isoprostane and di-tyrosine levels, and the antioxidant capacity, in urine from patients with PA and MMA at the diagnosis, and during treatment with L-carnitine and protein-restricted diet. We verified a significant increase of isoprostanes and di-tyrosine, as well as a

significant reduction of the antioxidant capacity in urine from these patients at diagnosis, as compared to controls. Furthermore, treated patients presented a marked reduction of isoprostanes and di-tyrosine levels in relation to untreated patients. In addition, patients with higher levels of protein and lipid oxidative damage, determined by di-tyrosine and isoprostanes levels, also presented lower urinary concentrations of total and free L-carnitine. In conclusion, the present results indicate that treatment with low protein diet and L-carnitine significantly reduces urinary biomarkers of protein and lipid oxidative damage in patients with disorders of propionate metabolism and that L-carnitine supplementation may be specially involved in this protection.

Keywords Propionic aciduria · Methylmalonic aciduria · Oxidative stress · L-Carnitine

Introduction

Propionic aciduria (PA) and methylmalonic aciduria (MMA) are relatively frequent organic acidurias caused by defects in the catabolism of propionyl-CoA to succinyl-CoA from the branched-chain amino acids, valine and isoleucine, and other propiogenic substrates, such as methionine, threonine, odd-chain fatty acids, and cholesterol (Pérez et al. 2010). PA results from a severe deficient activity of the enzyme propionyl-CoA carboxylase, which catalyzes the biotin-dependent conversion of propionyl-CoA to methylmalonyl-CoA. MMA results from deficiency of the immediately downstream enzyme methylmalonyl-CoA mutase, which catalyzes the vitamin B₁₂-dependent conversion of methylmalonyl-CoA to succinyl-CoA, or by abnormalities of its cofactor adenosylcobalamin. Inherited deficiency of

G. S. Ribas · C. Mescka · C. Y. Wayhs · C. R. Vargas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
UFRGS, Ipiranga 2752, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil

G. S. Ribas (✉) · G. B. Biancini · C. Mescka ·
C. Y. Wayhs · A. Sitta · M. Wajner · C. R. Vargas (✉)
Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos,
2350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: grazischmitt@terra.com.br

C. R. Vargas
e-mail: crvargas@hcpa.ufrgs.br

G. B. Biancini · A. Sitta · M. Wajner · C. R. Vargas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, UFRGS, Ramiro Barcelos 2700, Porto Alegre,
RS 90035-003, Brazil

propionyl-CoA carboxylase or methylmalonyl-CoA mutase leads to tissue accumulation of propionic or methylmalonic acids respectively, as well as alternative metabolites from propionate oxidation, which are excreted and identified in urine (Fenton et al. 2001; Deodato et al. 2006).

The above two disorders share many symptoms, including chronic neurologic disability, seizures and developmental delay, which are related to the frequencies of the acute episodes in which higher levels of the accumulating metabolites are identified in the biological fluids of the patients (Vivian et al. 2002). Despite the predominant neurologic findings and brain abnormalities, the exact pathomechanisms involved in tissue damages of PA and MMA are not fully established. Previous studies have reported that oxidative stress and impaired energy metabolism can contribute to the pathogenesis of these disorders (Brusque et al. 2002; Schuck et al. 2004; Fontella et al. 2000; Schwab et al. 2006). In this context, *in vitro* and *in vivo* studies showed that propionic and L-methylmalonic acids stimulate lipid and protein oxidation and reduce the antioxidant defenses in rat brain (Fontella et al. 2000; Rigo et al. 2006; Furian et al. 2007). Furthermore, the *in vivo* administration of antioxidants decreased the convulsions, as well as prevented behavioral and cognitive deficits induced by methylmalonic and propionic acids (Rigo et al. 2006; Figuera et al. 1999; Pettenuzzo et al. 2003, 2002). In addition to animal studies, significant increases in the content of intracellular reactive oxygen species (ROS), and of protein- and lipid- oxidation biomarkers were detected in patients with PA and MMA (Richard et al. 2007; Mc Guire et al. 2009; Ribas et al. 2010a).

Therapy for methylmalonic and propionic acidurias is based on the restriction of natural protein and the addition of special amino acid mixtures to maintain normal growth and nutrition (Touati et al. 2006). Since secondary carnitine deficiency has been observed in patients with organic acidurias (Chalmers et al. 1984; Di Donato et al. 1984), L-carnitine supplementation (approximately 100 mg/kg per day) is essential for treatment of PA and MMA patients, not only to replenish the depleted tissue stores, but also for detoxification, since carnitine conjugates with propionyl and methylmalonyl acids, increasing their excretion in the form of carnitine esters (propionylcarnitine and methylmalonylcarnitine) (Yannicelli 2006). In addition, antioxidant properties have also been found for L-carnitine, such as prevention of lipid, protein, and DNA damage, as well as increase of non-enzymatic and enzymatic antioxidant levels (Derin et al. 2004; Vanella et al. 2000; Reznick et al. 1992; Rani and Panneerselvam 2002; Ribas et al. 2010b). In this study, we aimed to evaluate oxidative stress parameters in urine from patients with PA and MMA at diagnosis, and under therapy with protein restriction and L-carnitine supplementation. We also correlated the urinary concentrations

of total L-carnitine with the levels of oxidative damage in these patients.

Methods

Patients and Controls

Patients with PA and MMA were recruited from the Medical Genetic Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Urine samples obtained from seven patients at diagnosis (group A)—three with PA and four with MMA (median age 0.92, range 12 days–3.4 years)—and from eight patients with these disorders under treatment (group B)—five with MMA and three with PA (median age 5.25, range 11 months–9.7 years), were used for evaluating the different parameters of oxidative stress. The median of treatment duration was 1.5 years (range 6 months–5.7 years). Clinical presentation was predominantly characterized by neurological dysfunction, including encephalopathy, delayed neuropsychomotor development, hypoactivity, and convulsions, besides vomiting, dehydration, and hepatomegaly. All the patients were diagnosed in our laboratory by identification of abnormal patterns of organic acids in urine using gas chromatography coupled to mass spectrometry (Sweetman 1991). Treatment consisted of a protein-restricted diet supplemented with L-carnitine (100 mg/Kg per day) and a synthetic amino acid formula. The control group consisted of urine from six age-matched healthy children (median age 3.96, range 2.4–5 years). This study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil. Informed consent was obtained according to the guidelines of the committee.

15-F2t-isoprostane Determination

Isoprostanes are prostaglandin-like compounds which are produced by free radical-mediated peroxidation of lipoproteins. These by-products have a short half-life and are eliminated primarily in the urine. Urine from subjects was thawed and isoprostane levels were determined using a competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) (Oxford Biomed, EA85). In brief, urine samples were mixed with an enhanced dilution buffer that essentially eliminates interference because of non-specific binding. In this assay, the 15-F2t-isoprostane in the samples competes with 15-F2t-isoprostane conjugated to horseradish peroxidase (HRP) for binding to a polyclonal antibody specific for 15-F2t-isoprostane coated on the microplate. The HRP activity results in color development when substrate is added, the intensity of which is inversely proportional to the amount of unconjugated 15-F2t-isoprostane in the samples and may be measured at 630 nm. Results were

expressed as nanograms of isoprostanes per mg urinary creatinine.

Di-tyrosine Autofluorescence Determination

Di-tyrosine (di-tyr) content, a measure of protein oxidation, was determined by autofluorescence. For di-tyr fluorescence determination, 50 μ l of thawed urine was added to 950 μ l, 6 mol/l urea in 20 mmol/l sodium phosphate buffer pH 7.4. After 30 min, di-tyr concentration was measured using a fluorometer (excitation 315 nm, emission 410 nm). Results were expressed as fluorescence units per mg urinary creatinine (Kirschbaum 2002).

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 sulfonate) by metmyoglobin. The amount of oxidized ABTS can be monitored by detecting the absorbance at 750 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 tocopherol analogue, allowing to evaluate the urinary antioxidant status to be expressed as micromolar trolox equivalents per mg urinary creatinine.

Determination of L-Carnitine Levels

Urinary total and free L-carnitine levels were determined based on the method of De Sousa et al. (1990). Initially, 50 μ l of potassium hydroxide 0.20 mol/l was added to 50 μ l of urine, and the mixture was incubated at 37°C for 45 min. The solution to be assayed was added to 50 μ l of HEPES 0.5 mol/l, 20 μ l of *N*-ethylmaleimide 40 mmol/l, and 100 μ l of [1-¹⁴C] acetyl coenzyme A 10 μ mol/l. Then, 30 μ l of L-carnitine acyltransferase (0.5 mg/ml) was added, and the mixture was passed down through a column of Dowex. The total column effluent was collected, the scintillation fluid was added, and the isotope content was determined using a liquid scintillation counter. Free L-carnitine was determined by the same protocol, but without incubation with potassium hydroxide. Results were expressed as μ mol/l.

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, and by the Student's *t* test for unpaired samples. A *P* value lower than 0.05 was considered significant. All the analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Software, version 15.0, in a PC-compatible computer.

Results

In this study, we evaluated in vivo oxidative stress parameters in urine from untreated MMA and PA patients (at the moment of diagnosis) (group A), and from patients under treatment with protein-restricted diet and L-carnitine plus amino acid formula supplementation (group B). The parameters of lipid (isoprostanes levels) and protein (di-tyrosine levels) oxidative damage, as well as the urinary antioxidant capacity (AOx) were compared to those of controls.

We first verified that the levels of isoprostanes, an end product of arachidonic acid peroxidation [$F(2,18) = 10.31$, $P < 0.01$], and the di-tyrosine levels [$F(2,18) = 5.65$, $P < 0.05$], a biomarker of oxidative damage to proteins, were markedly increased in untreated (at diagnosis) MMA and PA patients (group A) as compared with treated patients (group B) and controls (Fig. 1a, b, respectively). Furthermore, MMA and PA patients under therapy (group B) presented isoprostanes and di-tyrosine levels similar to those of the control group, and significantly lower than those of group A. We also found that MMA and PA patients with higher levels of isoprostanes and di-tyrosine had significantly reduced urinary concentrations of total and free L-carnitine (Table 1).

Next, we measured the urinary antioxidant capacity (AOx) in both the groups of patients. We found that untreated and treated MMA and PA patients had lower urinary AOx levels in relation to controls [$F(2,15) = 7.02$, $P < 0.01$], although these AOx levels in MMA and PA patients under treatment did not differ from those of patients at diagnosis (Fig. 1c).

Discussion

Although chronic neurological disability is observed in patients with MMA and PA (Fenton et al. 2001), the pathomechanisms responsible for tissue damage in these diseases are still not fully understood. Studies using cell cultures and animal disease models have indicated that mitochondrial dysfunction occurs in these disorders, potentially contributing to increased free radicals' production (Brusque et al. 2002; Fontella et al. 2000; Dutra et al. 1993; Wajner and Coelho 1997; McLaughlin et al.

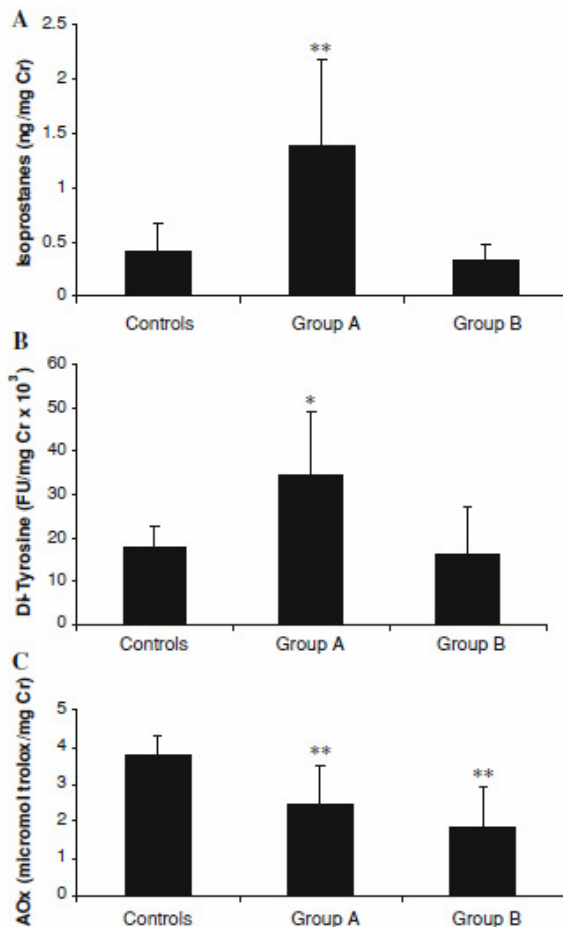


Fig. 1 Isoprostanes (a), di-tyrosine (b) and antioxidant capacity (c) measurement in urine from patients with disorders of propionate metabolism and controls. Group A and B represent MMA and PA patients at diagnosis and under treatment, respectively. Data represent the mean \pm SD (controls $n = 6$, group A $n = 6-7$, group B $n = 6-8$). $**P < 0.01$, $*P < 0.05$ compared to controls (ANOVA, followed by the Duncan multiple range test)

1998). Recently, it was demonstrated that lipid and protein oxidative damage is increased in plasma and urine from patients with disorders of propionate metabolism (Ribas et al. 2010a; Mc Guire et al. 2009). Accordingly, Richard et al. (2007) observed a significant increase of intracellular reactive oxygen species and of MnSOD expression levels in fibroblasts from patients with MMA, supporting a possible role of oxidative stress in the pathophysiology of this disease. In this study, we quantified markers of oxidative stress in urine from patients with PA and MMA to investigate the effect of L-carnitine supplementation on this pathologic process, correlating these parameters with the urinary concentrations of L-carnitine.

Table 1 Concentrations of total and free L-carnitine in patients with disorders of propionate metabolism according to their urinary levels of isoprostanes and di-tyrosine

	Total L-carnitine (μ M)	Free L-carnitine (μ M)
Isoprostanes < 0.5 ng/mg Cr ($n = 6$)	135.73 \pm 10.52	123.44 \pm 10.42
Isoprostanes 0.5–1.0 ng/mg Cr ($n = 3$)	54.56 \pm 27.97 ^a	19.54 \pm 22.00 ^a
Isoprostanes > 1.0 ng/mg Cr ($n = 4$)	48.83 \pm 30.97 ^a	9.66 \pm 4.56 ^a
Di-tyrosine $< 20,000$ FU/mg Cr ($n = 5$)	123.17 \pm 20.24	106.88 \pm 36.49
Di-tyrosine $> 20,000$ FU/mg Cr ($n = 8$)	69.69 \pm 49.62 ^b	37.94 \pm 54.20 ^b

^a $P < 0.01$ compared to isoprostanes < 0.5 ng/mg Cr group (ANOVA, followed by the Duncan multiple range test). ^b $P < 0.05$ compared to di-tyrosine $< 20,000$ FU/mg Cr group (Student's t test for unpaired samples)

We observed a marked increase of isoprostanes, which are formed by the non-enzymatic peroxidation of arachidonic acid, in urine from MMA and PA patients at diagnosis. The measure of urinary isoprostanes is a reliable indicator of lipid oxidative damage (Nourooz-Zadeh 2008). These results are in accordance with previous studies showing that malondialdehyde formation, another parameter of lipid oxidative damage, is induced in vivo and in vitro in animal tissues by methylmalonic and propionic acids (Fontella et al. 2000; Malfatti et al. 2003), and was found to be increased in plasma and urine from MMA and PA patients (Ribas et al. 2010a; Mc Guire et al. 2009). Besides, Mc Guire et al. (2009) showed that urine samples collected from PA and MMA patients had higher levels of isoprostanes. We also verified that patients under treatment with L-carnitine and protein-restricted diet plus essential amino acids presented significantly lower levels of urinary isoprostanes in relation to untreated MMA and PA patients. Besides, MMA and PA patients with higher isoprostanes levels presented lower concentrations of total and free L-carnitine in their urine. These results reinforce our recent findings, showing that L-carnitine is correlated with the reduction of lipid peroxidation in plasma from MMA and PA patients (Ribas et al. 2010a).

Next, we demonstrated that protein oxidative damage, measured by di-tyrosine formation, was significantly increased in urine from PA and MMA patients at diagnosis. Di-tyrosine is formed by the oxidation of adjacent protein tyrosine residues, leading to the formation of a highly stable inter-phenolic bond that does not undergo further metabolism (Kirschbaum 2002). It was also found that patients under therapy presented lower urinary levels of di-tyrosine, as compared with untreated patients, reflecting the protective

role of treatment on protein oxidation. These data also agree with those of animal studies, showing that methylmalonic and propionic acids induce protein-oxidative damage in brains of rats, as determined by carbonyl formation (Rigo et al. 2006; Furian et al. 2007). The recent findings, demonstrating that protein carbonyl formation and sulfhydryl oxidation are increased in plasma from patients with MMA and PA further reinforce the view that oxidative damage to proteins may be involved in the pathophysiology of these diseases (Ribas et al. 2010a). Our data in this study demonstrated that L-carnitine supplementation and low protein diet prevent oxidation of protein tyrosine residues in these patients. Since MMA and PA patients with higher di-tyrosine levels also showed lower concentrations of total and free L-carnitine, it is possible that treatment with L-carnitine was involved in this protective effect.

Decreased urinary AOX was also observed in patients with disorders of propionate metabolism at diagnosis. Similar results were obtained by Fontella and colleagues (2000), who demonstrated that propionic and methylmalonic acids reduced in vitro the total radical-trapping antioxidant (TRAP) in homogenates of rat brain, indicating a reduction of brain antioxidant potential by these metabolites. Our results in this study are also in agreement with the data reported by Mc Guire et al. (2009), showing a marked reduction of urinary AOX in patients with PA. Interestingly, we found that patients under therapy also presented deficiency of their urinary AOX. It is presumed that these alterations can occur because of the treatment with restricted diets (such as in phenylketonuric patients) which are poor in micronutrients necessary for the antioxidant status or, alternatively, by an unusual increase in metabolic by-products which will directly or indirectly deplete the cell's antioxidant capacity (Moyano et al. 1997; Wajner et al. 2004; Sitta et al. 2011; Ribas et al. 2011).

In this study we verified a significant reduction of the urinary biomarkers of oxidative damage in treated MMA and PA patients. However, we cannot conclude with certainty that this effect was only due to L-carnitine supplementation, since these patients were also treated with protein-restricted diets plus synthetic amino acid formulas. However, numerous in vitro and in vivo studies have reported antioxidant and antiperoxidative effects for L-carnitine, which is able to act as a metal chelator, scavenger of oxygen reactive species, as well as increase enzymatic and non-enzymatic antioxidants levels (Vanella et al. 2000; Reznick et al. 1992; Derin et al. 2004; Rani and Panneerselvam 2002; Solarska et al. 2010; Gülçin 2006; Sitta et al. 2009). Furthermore, it should be emphasized that because the toxic effects of the accumulating metabolites in MMA and PA patients, the beneficial effects of L-carnitine supplementation, such as correction of secondary carnitine deficiency, removal of short-chain acyl-CoA derivatives, and restoration of intramitochondrial

acyl-CoA/CoA ratios, may improve the metabolic status of these patients (Ribas et al. 2010a; Walter 2003), contributing to lower levels of oxidative damage observed in MMA and PA patients during treatment.

In conclusion, data of this study suggest that L-carnitine supplementation could be involved in the reduction of protein- and lipid- oxidative damages in PA and MMA, as detected by the improvement of di-tyrosine and isoprostanes levels, respectively, in the treated patients. Considering that urine can easily be collected from these patients, being used for diagnosis and follow-up of organic acidurias, it is postulated that it could be used to monitor the treatment efficacy in PA and MMA patients, by measuring the markers of oxidative damage.

Acknowledgments This study was supported in part by grants from FAPERGS, PROPESQ/UFRGS, CAPES, CNPq, and FIPE/HCPA-Brazil.

References

- Brusque AM, Borba Rosa R, Schuck PF, Dalcin KB, Ribeiro CA, Silva CG, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Briones P, Wajner M (2002) Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* 40:593–601
- Chalmers RA, Stacey TE, Tracey BM, de Sousa C, Roe CR, Millington DS, Hoppe CL (1984) L-Carnitine insufficiency in disorders of organic acid metabolism: response to L-carnitine by patients with methylmalonic aciduria and 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *J Inher Metab Dis Suppl* 2: 109–110
- De Sousa C, English NR, Stacey TE, Chalmers RA (1990) Measurement of L-carnitine and acylcarnitines in body fluids and tissues in children and in adults. *Clin Chim Acta* 187:317–328
- Deodato F, Boenzi S, Santorelli FM, Dionisi-Vici C (2006) Methylmalonic and propionic aciduria. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142C:104–112
- Derin N, Izgut-Uysal VN, Agac A, Aliciguzel Y, Demir N (2004) L-Carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *J Physiol Pharmacol* 55:595–606
- Di Donato S, Rimoldi M, Garavaglia B, Uziel G (1984) Propionyl-carnitine excretion in propionic and methylmalonic acidurias: a cause of carnitine deficiency. *Clin Chim Acta* 139:13–21
- Dutra JC, Dutra-Filho CS, Cardozo SE, Wannmacher CM, Sarkis JJ, Wajner M (1993) Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. *J Inher Metab Dis* 16:147–153
- Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS (2001) Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 2165–2194
- Figuera MR, Queiroz CM, Stracke MP, Brauer MC, González-Rodríguez LL, Frussa-Filho R, Wajner M, de Mello CF (1999) Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. *Neuroreport* 10:2039–2043
- Fontella FU, Pulrolnik V, Gassen E, Wannmacher CM, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS (2000) Propionic and

- L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport* 11:541–544
- Furian AF, Figuera MR, Oliveira MS, Ferreira AP, Fiorenza NG, de Carvalho Myskiw J, Petry JC, Coelho RC, Mello CF, Royes LF (2007) Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. *Neurochem Int* 50:164–171
- Gülçin I (2006) Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci* 78:803–811
- Kirschbaum B (2002) Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicators. *Clin Nephrol* 58:344–349
- Malfatti CR, Royes LF, Francescato L, Sanabria ER, Rubin MA, Cavalheiro EA, Mello CF (2003) Intrastriatal methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na⁺, K⁺-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. *Epilepsia* 44:761–767
- Mc Guire PJ, Parikh A, Diaz GA (2009) Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab* 98:173–180
- McLaughlin BA, Nelson D, Silver IA, Erecinska M, Chesselet MF (1998) Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 86:279–290
- Moyano D, Vilaseca MA, Pineda M, Campistol J, Vernet A, Póo P, Artuch R, Sierra C (1997) Tocopherol in inborn errors of intermediary metabolism. *Clin Chim Acta* 263:147–155
- Nourooz-Zadeh J (2008) Key issues in F2-isoprostane analysis. *Biochem Soc Trans* 36:1060–1065
- Pérez B, Angaroni C, Sánchez-Alcudia R, Merinero B, Pérez-Cerdá C, Specola N, Rodríguez-Pombo P, Wajner M, de Kremer RD, Cornejo V, Desviat LR, Ugarte M (2010) The molecular landscape of propionic acidemia and methylmalonic aciduria in Latin America. *J Inherit Metab Dis* 33:S307–S314
- Pettenuzzo LF, Schuck PF, Fontella F, Wannmacher CM, Wyse AT, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wajner M (2002) Ascorbic acid prevents cognitive deficits caused by chronic administration of propionic acid to rats in the water maze. *Pharmacol Biochem Behav* 73:623–629
- Pettenuzzo LF, Schuck PF, Wyse AT, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wajner M (2003) Ascorbic acid prevents water maze behavioral deficits caused by early postnatal methylmalonic acid administration in the rat. *Brain Res* 976:234–242
- Rani PJ, Panneerselvam C (2002) Effect of L-carnitine on brain lipid peroxidation and antioxidant enzymes in old rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57:B134–B137
- Reznick AZ, Kagan VE, Ramsey R, Tsuchiya M, Khwaja S, Serbinova EA, Packer L (1992) Antiradical effects in L-propionyl carnitine protection of the heart against ischemia-reperfusion injury: the possible role of iron chelation. *Arch Biochem Biophys* 296:394–401
- Ribas GS, Manfredini V, de Mari JF, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, Sitta A, Deon M, Wajner M, Vargas CR (2010a) Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int J Dev Neurosci* 28:127–132
- Ribas GS, Manfredini V, de Marco MG, Vieira RB, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, Wajner M, Vargas CR (2010b) Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. *Mutat Res* 702:123–128
- Ribas GS, Sitta A, Wajner M, Vargas CR (2011) Oxidative stress in phenylketonuria: what is the Evidence? *Cell Mol Neurobiol* 31:653–662
- Richard E, Alvarez-Barrientos A, Pérez B, Desviat LR, Ugarte M (2007) Methylmalonic acidemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway. *J Pathol* 213:453–461
- Rigo FK, Pasquetti L, Malfatti CR, Figuera MR, Coelho RC, Petri CZ, Mello CF (2006) Propionic acid induces convulsions and protein carbonylation in rats. *Neurosci Lett* 408:151–154
- Schuck PF, Rosa RB, Pettenuzzo LF, Sitta A, Wannmacher CM, Wyse AT, Wajner M (2004) Inhibition of mitochondrial creatine kinase activity from rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* 45:661–667
- Schwab MA, Sauer SW, Okun JG, Nijtmans LG, Rodenburg RJ, van den Heuvel LP, Dröse S, Brandt U, Hoffmann GF, Ter Laak H, Kölker S, Smeitink JA (2006) Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *Biochem J* 398:107–112
- Sitta A, Barschak AG, Deon M, de Mari JF, Barden AT, Vanzin CS, Biancini GB, Schwartz IV, Wajner M, Vargas CR (2009) L-Carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol* 29:211–218
- Sitta A, Vanzin CS, Biancini GB, Manfredini V, de Oliveira AB, Wayhs CA, Ribas GO, Giugliani L, Schwartz IV, Bohrer D, Garcia SC, Wajner M, Vargas CR (2011) Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol* 31:429–436
- Solarska K, Lewińska A, Karowicz-Bilińska A, Bartosz G (2010) The antioxidant properties of carnitine in vitro. *Cell Mol Biol Lett* 15:90–97
- Sweetman L (1991) Organic Acid Analysis. In: Hommes FA (ed) Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual. Wiley-Liss, New York, pp 143–176
- Touati G, Valayannopoulos V, Mention K, de Lonlay P, Jouvet P, Depondt E, Assoun M, Souberbielle JC, Rabier D, Ogier de Baulny H, Saudubray JM (2006) Methylmalonic and propionic acidurias: management without or with a few supplements of specific amino acid mixture. *J Inherit Metab Dis* 29:288–298
- Vanella A, Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Di Giacomo C, Sorrenti V, Barcellona ML (2000) L-Propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. *Cell Biol Toxicol* 16:99–104
- Vivian L, Pessutto FD, de Almeida LM, Loureiro S de O, Pelaez Pde L, Funchal C, Wajner M, Pessoa-Pureur R (2002) Effect of propionic and methylmalonic acids on the high molecular weight neurofilament subunit (NF-H) in rat cerebral cortex. *Neurochem Res* 27:1691–7
- Wajner M, Coelho JC (1997) Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production. *J Inherit Metab Dis* 20:761–768
- Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS (2004) The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 27:427–448
- Walter JH (2003) L-Carnitine in inborn errors of metabolism: what is the evidence? *J Inherit Metab Dis* 26:181–188
- Yannicelli S (2006) Nutrition therapy of organic acidemias with amino acid-based formulas: emphasis on methylmalonic and propionic acidemia. *J Inherit Metab Dis* 29:281–287

3. CAPÍTULO 3: PREVENTION BY L-CARNITINE OF DNA DAMAGE INDUCED BY PROPIONIC AND L-METHYLMALONIC ACIDS IN HUMAN PERIPHERAL LEUKOCYTES *IN VITRO*

Artigo publicado no periódico Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 702 (2010) 123-128.



Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes *in vitro*

Graziela S. Ribas^{a,b,*}, Vanusa Manfredini^c, Maria Gilda de Marco^c, Rosana B. Vieira^c, Carlos Y. Wayhs^{a,b}, Camila S. Vanzin^{b,d}, Giovana B. Biancini^{b,d}, Moacir Wajner^{b,d}, Carmen R. Vargas^{a,b,d,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil

^b Serviço de Genética Médica, HCPA, Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil

^c Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Ramiro Barcelos 2700, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2010

Received in revised form 8 July 2010

Accepted 19 July 2010

Available online 24 July 2010

Keywords:

Propionic acid

Methylmalonic acid

DNA damage

L-Carnitine

ABSTRACT

Propionic acidemia (PAemia) and methylmalonic acidemia (MMAemia) are inborn errors of propionate metabolism characterized by the accumulation of, respectively, propionic and L-methylmalonic acids (and their metabolites) in the blood and tissues of affected patients. The conditions lead to severe metabolic complications in the neonatal period and to long-term neurological manifestations. Treatment for these disorders consists of a protein-restricted diet, supplemented with synthetic formulas of amino acids, but excluding isoleucine, threonine, valine and methionine; and L-carnitine, to promote detoxication. *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that lipid and protein oxidative damage may be involved in the pathophysiology of these diseases, but DNA damage has not been fully investigated. In this work, we evaluated *in vitro* the effects of PA and MMA, in the presence or absence of L-carnitine, on DNA damage in peripheral leukocytes, as determined by the alkaline comet assay, using silver staining and visual scoring. PA and MMA induced a DNA damage index (DI) significantly higher than that of the control group. L-Carnitine significantly reduced PA- and MMA-induced DNA damage, in a concentration-dependent manner. Our findings indicate that PA and MMA induce DNA damage and L-carnitine is able to prevent this damage.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The organic acids propionic acid (PA) and L-methylmalonic acid (MMA) are found at high levels in the blood and urine of patients with propionic acidemia (PAemia) and methylmalonic acidemia (MMAemia), respectively. These inherited disorders are caused by the reduced activity of the enzymes propionyl-CoA carboxylase and L-methylmalonyl-CoA mutase, respectively, which catalyze steps in the conversion of propionyl-CoA to succinyl-CoA, a key process in the metabolism of the amino acids isoleucine, threonine, valine, and methionine; odd-chain fatty acids; the bases thymine and uracil; and cholesterol [1–3].

Individuals affected by these disorders are at constant risk for metabolic decompensation with metabolic acidosis, ketonemia, hyperammonemia, hyperglycinemia, hypoglycemia, and metabolic

stroke [4]. During the crises of metabolic decompensation, the levels of MMA and PA can be as high as 2.5–5 mM in the blood and cerebrospinal fluid, and even higher in the neuronal cells [5]. Neurological symptoms, such as encephalopathy, lethargy, convulsions and mental retardation, are common in these disorders, but the mechanisms underlying the brain damage pathophysiology are not yet fully established. Nevertheless, there is compelling evidence that mitochondrial dysfunction, excitotoxicity, and oxidative stress contribute to the neuropathology of these organic acidurias [6–13].

Treatment of PAemia and MMAemia consists of a low-protein high-energy diet and synthetic amino acid-based formulas. L-Carnitine forms conjugates with propionyl and methylmalonyl acids, increasing their excretion in the form of carnitine esters (propionylcarnitine and methylmalonylcarnitine) and leading to secondary carnitine deficiency [3,14]. Therefore, L-carnitine supplementation (approximately 100 mg/kg per day) is essential, to replenish depleted tissue stores of this compound. Oxidative stress may play an important role in the pathophysiology of some inborn errors of metabolism, since accumulation of toxic metabolites may lead to excessive production of free radicals [15–17], which can react with lipids, proteins, DNA, and RNA. The hydroxyl radical, the most harmful reactive oxygen species, can induce a

* Corresponding authors at: Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90.035-903, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 21018011; fax: +55 51 21018010.

E-mail addresses: grazischmitt@terra.com.br (G.S. Ribas), cvargas@hcpa.ufrgs.br (C.R. Vargas).

variety of lesions in DNA, including single-strand breaks (SSBs), double-strand breaks (DSBs), alkali-labile sites, oxidized purine and pyrimidine bases, and DNA–protein cross-links [15,18–20].

PA and MMA stimulate lipid peroxidation and protein oxidation, as well as reduce antioxidant defenses in rat brain [9,21,22]. We have demonstrated that, at diagnosis, patients with PAemia and MMAemia present higher levels of protein and lipid oxidation compared to healthy subjects, and treatment with L-carnitine may reduce lipid peroxidation in patients with these disorders [23]. L-Carnitine was also associated with the reduction of lipid peroxidation in patients with phenylketonuria, an inborn error of phenylalanine metabolism [16]. Several studies have reported antioxidant and antiperoxidative properties for this compound, which can act as a metal chelator and a scavenger of reactive oxygen species, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide radical, and hydroxyl radical [24–27]. In the present study, using the comet assay, we have tested the effects of PA and MMA on DNA damage *in vitro* and we have tested whether L-carnitine can mitigate such damage.

2. Materials and methods

2.1. *In vitro* induction of DNA damage by PA and MMA

This study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Venous blood specimens from healthy volunteers were collected in heparinized vials under sterile conditions. Leukocytes isolated from whole blood were incubated with PA (2, 3, or 5 mM) or MMA (0.5, 2, or 5 mM) at 37 °C for 6 h.

2.2. Effect of L-carnitine on DNA damage *in vitro*

Leukocytes from healthy volunteers were co-incubated with L-carnitine (30, 60, 90, 120, or 150 μ M) and PA (5 mM) or MMA (5 mM) at 37 °C for 6 h. The final concentrations of L-carnitine in the assays were based on previous findings for patients with PAemia and MMAemia, showing that plasma levels of this compound can vary from 30 μ mol/L at diagnosis to almost 100 μ mol/L under supplementation [23].

2.3. Single cell gel electrophoresis (comet assay)

The alkaline comet assay followed the method described by Singh et al. [28] and was performed in accordance with general guidelines for the assay [29,30]. Isolated human leukocytes were suspended in agarose and spread onto a glass microscope slide pre-coated with agarose. Agarose was allowed to set at 4 °C for 5 min. Slides were incubated in ice-cold lysis solution to remove cell proteins, leaving DNA as “nucleoids”. After the lysis procedure, the slides were placed on a horizontal electrophoresis unit and covered with fresh buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) at 4 °C for 20 min, to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was performed for 20 min (25 V; 300 mA; 0.9 V/cm). Slides were then neutralized, washed in double-distilled water, and stained according to a silver-staining protocol [31]. After drying overnight at room temperature, the gels were analyzed using an optical microscope. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration) according to tail intensity. Therefore, the damage index (DI) for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analyzed under blind conditions by at least two different individuals.

2.4. Statistical analysis

Data were analyzed using the nonparametric Kruskal–Wallis test followed by the Mann–Whitney *U*-test. A *p* value lower than 0.05 was considered significant. The values were presented as medians (min; max). All analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, v. 15.0, on a PC-compatible computer.

3. Results

Figs. 1 and 2 show the effects of PA and MMA, respectively, on DNA damage in white blood cells *in vitro*. All concentrations of PA and MMA tested resulted in a DNA damage index (DI) significantly higher than that of the control ($p < 0.01$). No significant difference was found in DNA damage between 2 and 5 mM MMA, or among the tested concentrations of PA. The DI values and the number of

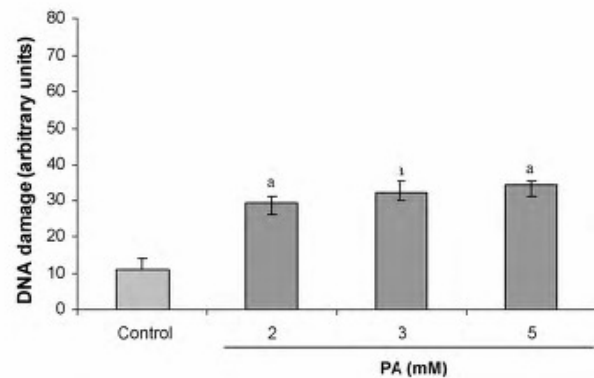


Fig. 1. *In vitro* effect of propionic acid (2, 3 and 5 mM) on DNA damage (comet assay) in leukocytes from whole blood. Data represent median (min; max) of three independent experiments (individuals). a, $p < 0.01$ compared to the control group (Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney *U*-test).

cells found in each damage class for PA and MMA, obtained from three independent experiments, are presented in Tables 1 and 2, respectively.

Next, we evaluated the effect of L-carnitine on DNA damage induced by 5 mM PA (Fig. 3) or 5 mM MMA (Fig. 4) *in vitro*. L-Carnitine reduced the DI induced by PA or MMA, in a concentration-dependent manner, with a particularly large inhibitory effect on MMA. Tables 3 and 4 show DI values and the numbers of cells found in each damage class for PA and MMA, respectively, after the addition of L-carnitine.

4. Discussion

The disorders of propionate metabolism PAemia and MMAemia are genetic diseases characterized by accumulation of, predominantly, PA and MMA, respectively. Patients affected by these disorders present acute episodes of metabolic acidosis with neurological manifestations, including coma and convulsions, and long-term neurological symptoms. Treatment with L-carnitine increases excretion of propionylcarnitine and methylmalonylcarnitine, thereby promoting detoxication [1–3].

Oxidative stress is involved in a large number of human diseases, including neurodegenerative diseases and some inborn errors of metabolism [15,32,33]. Free radicals can attack cellular DNA, causing lesions ranging from base and sugar damage to DNA breaks and DNA–protein cross-links [34]. DNA lesions may hamper pro-

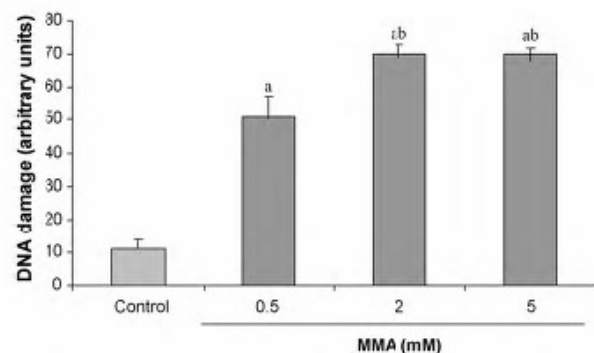


Fig. 2. *In vitro* effect of methylmalonic acid (0.5, 2 and 5 mM) on DNA damage (comet assay) in leukocytes from whole blood. Data represent median (min; max) of three independent experiments (individuals). a, $p < 0.01$ compared to the control group and b, $p < 0.01$ compared to the 0.5 mM MMA group (Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney *U*-test).

Table 1

DI values and number of cells found in each damage class induced by different concentrations of propionic acid (2–5 mM).

Groups	Experiments	DI	Damage class				
			0	1	2	3	4
Control	1	14	87	12	1	0	0
	2	11	89	11	0	0	0
	3	11	89	11	0	0	0
Σ			265	34	1	0	0
2 mM PA	1	26	74	26	0	0	0
	2	31	70	29	1	0	0
	3	29	72	27	1	0	0
Σ			216	82	2	0	0
3 mM PA	1	30	71	28	1	0	0
	2	35	67	31	2	0	0
	3	32	69	30	1	0	0
Σ			207	89	4	0	0
5 mM PA	1	31	70	29	1	0	0
	2	34	68	30	2	0	0
	3	35	67	31	2	0	0
Σ			205	90	5	0	0

DI: damage index.

Table 2

DI values and number of cells found in each damage class induced by different concentrations of methylmalonic acid (0.5–5 mM).

Groups	Experiments	DI	Damage class				
			0	1	2	3	4
Control	1	14	87	12	1	0	0
	2	11	89	11	0	0	0
	3	11	89	11	0	0	0
Σ			265	34	1	0	0
0.5 mM MMA	1	50	66	24	6	2	2
	2	57	64	24	6	3	3
	3	51	67	22	6	3	2
Σ			197	70	18	8	7
2 mM MMA	1	73	55	29	8	4	4
	2	69	58	27	7	4	4
	3	70	57	28	7	4	4
Σ			170	84	22	12	12
5 mM MMA	1	72	56	26	8	6	4
	2	68	56	31	5	5	3
	3	70	55	31	6	5	3
Σ			167	88	19	16	10

DI: damage index.

cesses such as transcription and replication, resulting in cell cycle arrest, cell death, or mutagenesis, and have been implicated in several inherited diseases, in carcinogenesis, in genetic disorders, and in aging [35].

Some *in vivo* and *in vitro* studies have demonstrated that PA and MMA stimulate lipid peroxidation and protein carbonylation in

rat brain [9,21,22] and inhibit respiratory chain complex activities and other enzymes of energy metabolism [4,7,11,13], suggesting that free radicals may contribute to the tissue damage observed in PAemia and MMAemia. Recently, we showed that oxidative damage to lipids and proteins is detectable in plasma from patients with PAemia and MMAemia, at diagnosis, and that L-carnitine supple-

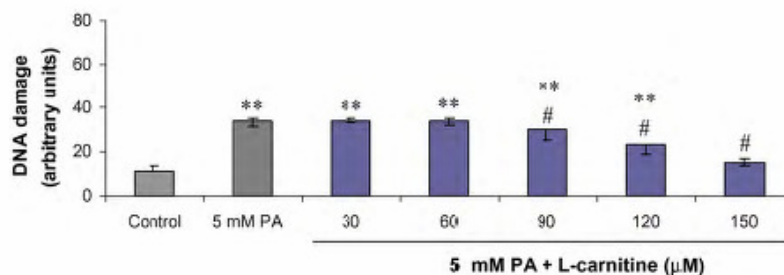


Fig. 3. *In vitro* effect of L-carnitine (30, 60, 90, 120 and 150 μM) on DNA damage (comet assay) induced by 5 mM PA in leukocytes from whole blood. Data represent median (min; max) of three independent experiments (individuals). ** $p < 0.01$ compared to the control group and # $p < 0.01$ compared to the 5 mM PA group (Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney *U*-test).

Table 3
Effect of different concentrations of L-carnitine (30–150 μ M) on DI values and number of cells found in each damage class induced by 5 mM PA.

Groups	Experiments	DI	Damage class				
			0	1	2	3	4
5 mM PA + 30 μ M L-Carnitine	1	33	68	31	1	0	0
	2	34	68	30	2	0	0
	3	35	66	33	1	0	0
Σ			202	94	4	0	0
5 mM PA + 60 μ M L-Carnitine	1	32	69	30	1	0	0
	2	34	67	32	1	0	0
	3	35	66	33	1	0	0
Σ			202	95	3	0	0
5 mM PA + 90 μ M L-Carnitine	1	30	70	30	0	0	0
	2	25	77	21	2	0	0
	3	30	70	30	0	0	0
Σ			217	81	2	0	0
5 mM PA + 120 μ M L-Carnitine	1	23	78	21	1	0	0
	2	23	77	23	0	0	0
	3	19	81	19	0	0	0
Σ			236	63	1	0	0
5 mM PA + 150 μ M L-Carnitine	1	15	85	15	0	0	0
	2	14	86	14	0	0	0
	3	17	84	15	1	0	0
Σ			255	44	1	0	0

DI: damage index.

Table 4
Effect of different concentrations of L-carnitine (30–150 μ M) on DI values and number of cells found in each damage class induced by 5 mM MMA.

Groups	Experiments	DI	Damage class				
			0	1	2	3	4
5 mM MMA + 30 μ M L-Carnitine	1	73	41	47	10	2	0
	2	70	42	48	8	2	0
	3	68	42	49	8	1	0
Σ			125	144	26	5	0
5 mM MMA + 60 μ M L-Carnitine	1	56	48	49	2	1	0
	2	54	48	50	2	0	0
	3	55	47	51	2	0	0
Σ			143	150	6	1	0
5 mM MMA + 90 μ M L-Carnitine	1	43	58	41	1	0	0
	2	39	61	39	0	0	0
	3	40	60	40	0	0	0
Σ			179	120	1	0	0
5 mM MMA + 120 μ M L-Carnitine	1	27	73	27	0	0	0
	2	29	71	29	0	0	0
	3	27	73	27	0	0	0
Σ			217	83	0	0	0
5 mM MMA + 150 μ M L-Carnitine	1	15	85	15	0	0	0
	2	12	88	12	0	0	0
	3	14	86	14	0	0	0
Σ			259	41	0	0	0

DI: damage index.

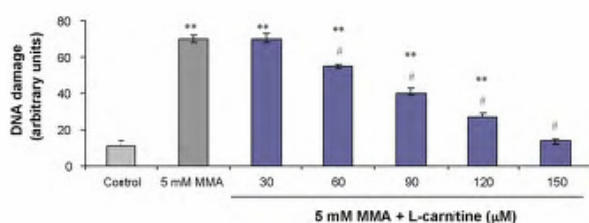


Fig. 4. *In vitro* effect of L-carnitine (30, 60, 90, 120 and 150 μ M) on DNA damage (comet assay) induced by 5 mM MMA in leukocytes from whole blood. Data represent median (min; max) of three independent experiments (individuals). ** $p < 0.01$ compared to the control group and # $p < 0.01$ compared to the 5 mM MMA group (Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney *U*-test).

mentation protects against attack by reactive species [23]. Despite evidence that PA and MMA can induce oxidative damage to lipids and proteins, the effects of these acids on DNA damage have not been investigated.

In this work, we report the effects of L-carnitine on DNA damage induced by PA or MMA in leukocytes *in vitro*, with the alkaline comet assay (DNA strand breakage) as endpoint. In the alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis), developed by Singh et al. [28], increased DNA migration is associated with sites of incomplete DNA excision repair [29,30]. This assay has the advantages of high sensitivity, low cost, and speed [31].

We verified significantly greater levels of DNA migration/DNA damage in leukocytes treated with PA or MMA, compared to the control group. DNA damage induced by MMA was higher than

that induced by PA. Comparing the distribution of damage classes induced by PA, one observes that the differences were primarily caused by an increased number of cells in damage classes 1 and 2, reflecting a homogeneous increase in the number of slightly damaged cells, rather than a few highly damaged cells. MMA, in contrast, led to a significant increase of cells in damage classes 3 and 4.

The comet assay is not able to discriminate the etiology of DNA damage, but DNA damage induced by PA or MMA may be due to production of free radicals; previous studies have shown that PA and MMA can increase ROS generation and oxidative damage to cells [11–13,36]. This hypothesis is reinforced by the work of McLaughlin et al. [37], demonstrating that exposure of striatal and cortical cultures from embryonic rat brain to MMA for 24 h provoked DNA laddering and dose-dependent cell death, which was attenuated by antioxidants. PA and MMA stimulate lipid peroxidation in rat brain and in the plasma of patients with PAemia and MMAemia [9,21,23]. In this context, products of lipid peroxidation, such as 4-hydroxynonenal, may modify DNA bases, leading to formation of bulky exocyclic adducts and resulting in mutagenesis [38].

L-Carnitine reduced DNA damage induced by PA or MMA. L-Carnitine plays important metabolic functions, including transport of long chain fatty acids into mitochondria, for β -oxidation, participation in trans-esterification and excretion of acyl-CoA esters and scavenging of oxygen reactive species, reducing lipid peroxidation and increasing enzymatic and non-enzymatic antioxidant levels [24,26,27,39,40]. In addition, some authors have shown that L-carnitine can reduce oxidative damage to DNA and accelerate the disappearance of single-strand breaks induced by oxygen radicals and alkylating agents [20,41,42]. This effect has been attributed to its ability to scavenge ROS, activate the repair enzyme poly(ADP-ribose)polymerase and other repair mechanisms, and enhance energy production by cells [20,41]. Alternatively, L-carnitine may reduce MMA- and PA-induced DNA damage by reduction of toxic intracellular levels of propionyl-CoA and methylmalonyl-CoA.

McLaughlin et al. [37] observed neuronal death and DNA laddering characteristic of apoptosis in primary neuronal striatal cultures exposed in vitro to MMA for 24 h. The authors attributed their findings to disturbance of mitochondrial homeostasis, involving reduced ATP synthesis and free radical production that cause neuronal damage and DNA laddering. To our knowledge, our report is the first to show that MMA and PA provoke marked DNA damage in leukocytes. Furthermore, we showed that L-carnitine can prevent DNA injury induced by these compounds, reinforcing the clinical significance of L-carnitine treatment in PAemia and MMAemia.

Conflicts of interest statement

The author declares that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

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

References

- [1] W.A. Fenton, R.A. Gravel, D.S. Rosenblatt, Disorders of propionate and methylmalonate metabolism, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 2165–2194.
- [2] F. Deodato, S. Boenzi, F.M. Santorelli, C. Dionisi-Vici, Methylmalonic and propionic aciduria, *Am J. Med. Genet. C: Semin. Med. Genet.* 142C (2006) 104–112.
- [3] L. Van Gosen, Organic acidemias: a methylmalonic and propionic focus, *J. Pediatr. Nurs.* 23 (2008) 225–233.
- [4] L.O. Saad, S.R. Miranda, E.N. Maciel, R.F. Castilho, Lactate dehydrogenase activity is inhibited by methylmalonate in vitro, *Neurochem. Res.* 31 (2006) 541–548.
- [5] G.F. Hoffmann, W. Meier-Augenstein, S. Stöckler, R. Surtees, D. Rating, W.L. Nyhan, Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid, *J. Inher. Metab. Dis.* 16 (1993) 648–669.
- [6] M. Wajner, J.C. Dutra, S.E. Cardoso, C.M. Wannmacher, E.R. Motta, Effect of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats, *J. Inher. Metab. Dis.* 15 (1992) 92–96.
- [7] J.C. Dutra, C.S. Dutra-Filho, S.E. Cardozo, C.M. Wannmacher, J.J. Sarkis, M. Wajner, Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats, *J. Inher. Metab. Dis.* 16 (1993) 147–153.
- [8] C.F. De Mello, J. Beghini, R.E. Jiménez-Bernal, M.A. Rubin, J. de Bastiani, E. da Costa Jr., M. Wajner, Intrastriatal methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms, *Brain Res.* 721 (1996) 120–125.
- [9] F.U. Fontella, V. Pulrolnik, E. Gassen, C.M. Wannmacher, A.B. Klein, M. Wajner, C.S. Dutra-Filho, Propionic and t-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats, *Neuroreport* 11 (2000) 541–544.
- [10] A.T. Wyse, E.L. Streck, S.V. Barros, A.M. Brusque, A.L. Zugno, M. Wajner, Methylmalonate administration decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats, *Neuroreport* 11 (2000) 2331–2334.
- [11] A.M. Brusque, R. Borba Rosa, P.F. Schuck, K.B. Dalcin, C.A. Ribeiro, C.G. Silva, C.M. Wannmacher, C.S. Dutra-Filho, A.T. Wyse, P. Briones, M. Wajner, Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid, *Neurochem. Int.* 40 (2002) 593–601.
- [12] J.G. Okun, F. Hörster, L.M. Farkas, P. Feyh, A. Hinz, S. Sauer, G.F. Hoffmann, K. Unsicker, E. Mayatepek, S. Kölker, Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 14674–14680.
- [13] M.A. Schwab, S.W. Sauer, J.G. Okun, L.G. Nijtmans, R.J. Rodenburg, L.P. van den Heuvel, S. Dröse, U. Brandt, G.F. Hoffmann, H. Ter Laak, S. Kölker, J.A. Smeitink, Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins, *Biochem. J.* 398 (2006) 107–112.
- [14] S. Yannicelli, Nutrition therapy of organic acidemias with amino acid-based formulas: emphasis on methylmalonic and propionic acidemia, *J. Inher. Metab. Dis.* 29 (2006) 281–287.
- [15] 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. Inher. Metab. Dis.* 27 (2004) 427–448.
- [16] 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, t-Carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients, *Cell Mol. Neurobiol.* 29 (2009) 211–218.
- [17] A.G. Barschak, A. Sitta, M. Deon, M.H. de Oliveira, A. Haeser, C.S. Dutra-Filho, M. Wajner, C.R. Vargas, Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease, *Metab. Brain Dis.* 21 (2006) 279–286.
- [18] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death, in: B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, 2001, pp. 246–350.
- [19] B. Halliwell, Role of free radicals in the neurodegenerative diseases, *Drugs Aging* 18 (2001) 685–716.
- [20] C.L. Garcia, S. Filippi, P. Moseoso, M. Calvani, R. Nicolai, L. Mosconi, F. Palitti, The protective effect of L-carnitine in peripheral blood human lymphocytes exposed to oxidative agents, *Mutagenesis* 21 (2006) 21–27.
- [21] M.R. Figuera, J.S. Bonini, T.G. de Oliveira, R. Frussa-Filho, J.B. Rocha, C.S. Dutra-Filho, M.A. Rubin, C.F. Mello, GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 (2003) 465–473.
- [22] F.K. Rigo, L. Pasquetti, C.R. Malfatti, M.R. Figuera, R.C. Coelho, C.Z. Petri, C.F. Mello, Propionic acid induces convulsions and protein carbonylation in rats, *Neurosci. Lett.* 408 (2006) 151–154.
- [23] G.S. Ribas, V. Manfredini, J.F. de Mari, C.Y. Wayhs, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, A. Sitta, M. Deon, M. Wajner, C.R. Vargas, Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation, *Int. J. Dev. Neurosci.* 28 (2010) 127–132.
- [24] A.Z. Reznick, V.E. Kagan, R. Ramsey, M. Tsuchiya, S. Khwaja, E.A. Serbinova, L. Packer, Antiradical effects in L-propionyl carnitine protection of the heart against ischemia-reperfusion injury: the possible role of iron chelation, *Arch. Biochem. Biophys.* 296 (1992) 394–401.
- [25] 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 α -lipoic acid, *Clin. Chim. Acta* 368 (2006) 84–92.
- [26] I. Gülçin, Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine, *Life Sci.* 78 (2006) 803–811.
- [27] N. Derin, V.N. Izgut-Uysal, A. Agac, Y. Aliciguzel, N. Demir, L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation, *J. Physiol. Pharmacol.* 55 (2004) 595–606.
- [28] N. Singh, M. McCoy, R. Tice, E. Schneider, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [29] R.R. Tice, D. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.

- [30] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, G. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay, *Mutagenesis* 18 (2003) 45–51.
- [31] W. Liao, M.A. McNutt, W.G. Zhu, The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells, *Methods* 48 (2009) 46–53.
- [32] B. Halliwell, Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97 (2006) 1634–1658.
- [33] L.R. Sirtori, C.S. Dutra-Filho, D. Fitarelli, A. Sitta, A. Haeser, A.G. Barschak, M. Wajner, D.M. Coelho, S. Llesuy, A. Belló-Klein, R. Giugliani, M. Deon, C.R. Vargas, Oxidative stress in patients with phenylketonuria, *Biochim. Biophys. Acta* 1740 (2005) 68–73.
- [34] M. D'Errico, E. Parlanti, E. Dogliotti, Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology, *Mutat. Res.* 659 (2008) 4–14.
- [35] F. Altieri, C. Grillo, M. Maceroni, S. Chichiarelli, DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (2008) 891–937.
- [36] H.P. Indo, M. Davidson, H.C. Yen, S. Suenaga, K. Tomita, T. Nishii, M. Higuchi, Y. Koga, T. Ozawa, H.J. Majima, Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage, *Mitochondrion* 7 (2007) 106–118.
- [37] B.A. McLaughlin, D. Nelson, I.A. Silver, M. Erecinska, M.F. Chesselet, Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures, *Neuroscience* 86 (1998) 279–290.
- [38] W.R. Markesbery, M.A. Lovell, DNA oxidation in Alzheimer's disease, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 2039–2045.
- [39] A. Augustyniak, E. Skrzydlewska, L-Carnitine in the lipid and protein protection against ethanol-induced oxidative stress, *Alcohol* 43 (2009) 217–223.
- [40] C. Hoppel, The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism, *Am. J. Kidney Dis.* 41 (2003) S4–12.
- [41] M.E. Boerrigter, C. Franceschi, E. Arrigoni-Martelli, J.Y. Wei, J. Vijg, The effect of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on the disappearance of DNA single-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes, *Carcinogenesis* 14 (1993) 2131–2136.
- [42] 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.* 16 (2000) 99–104.

3. CAPÍTULO 4: REDUCTION OF BUTYRYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN PLASMA FROM PATIENTS WITH DISORDERS OF PROPIONATE METABOLISM IS PREVENTED BY TREATMENT WITH L-CARNITINE AND PROTEIN RESTRICTION.

Artigo publicado no periódico Clinical Biochemistry 45 (2012) 77-81

Nos últimos anos, estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo pode estar relacionado às alterações na neurotransmissão colinérgica que ocorre em modelos animais de alguns erros inatos do metabolismo (Wyse *et al.*, 2004). A butirilcolinesterase (BuChE), ou pseudocolinesterase, tem sido considerada um marcador periférico do sistema colinérgico central, por atuar como um co-regulador dos níveis de acetilcolina e, ainda, por participar da regulação da proliferação e diferenciação neuronal durante o desenvolvimento do sistema nervoso central. Neste capítulo nós avaliamos a atividade da enzima butirilcolinesterase e os níveis de malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica, em amostras de plasma de pacientes portadores de desordens do metabolismo do propionato, antes e após o tratamento com L-carnitina (100mg/Kg/dia) e dieta hipoprotéica. Foi verificada uma redução significativa da atividade da BuChE, bem como um aumento nas concentrações de MDA no plasma dos pacientes não-tratados em relação ao grupo controle. Por outro lado, os pacientes em tratamento com L-carnitina e dieta hipoprotéica apresentaram uma dosagem de MDA e atividade da BuChE estatisticamente semelhante aos controles. Além disso, a atividade da BuChE apresentou uma correlação negativa significativa com as concentrações de MDA nos pacientes portadores dessas desordens. Em conclusão, estes resultados sugerem que uma formação aumentada de espécies reativas pode estar envolvida com a redução da atividade da BuChE nas desordens do metabolismo do propionato, possivelmente contribuindo para a fisiopatologia dessas doenças, e que o tratamento com L-carnitina e dieta hipoproteica é capaz de prevenir esta alteração.

Ribas GS, Scherer EB, Ferreira AG, Schmitz F, Wyse AT, Rodrigues D, Nascimento S, Garcia SC, Wajner M, Vargas CR. Reduction of butyrylcholinesterase activity in plasma from patients with disorders of propionate metabolism is prevented by treatment with L-carnitine and protein restriction. *Clin Biochem.* 45(1-2):77-81, 2012.

4. DISCUSSÃO GERAL

As acidemias propiônica e metilmalônica são doenças hereditárias, autossômicas recessivas, que comprometem o catabolismo dos aminoácidos valina, isoleucina, metionina e treonina, dos ácidos graxos de cadeia ímpar e do colesterol. Bioquimicamente, os pacientes afetados com PAemia e MMAemia apresentam elevadas concentrações séricas e urinárias dos ácidos propiônico e metilmalônico, respectivamente, bem como de outros metabólitos do PA (ácidos 3-OH-propiônico e metilcítrico, propionilglicina e propionilcarnitina), além de severa acidose metabólica, acidemia láctica, cetose/cetonúria e hiperamonemia, podendo levar ao óbito nos primeiros dias de vida. Sintomas neurológicos como hipotonia, letargia, encefalopatia, convulsões e graus variáveis de retardo mental e psicomotor também são observados nessas desordens, sugerindo que os mecanismos envolvidos no dano cerebral dessas doenças ainda precisam ser melhor investigados (de Mattos-Dutra *et al.*, 1998; Fenton *et al.*, 2001).

Nesse sentido, estudos *in vitro* e *in vivo* têm sugerido que excitotoxicidade secundária, inibição do metabolismo energético e produção de radicais livres causadas pelo excesso de propionato e metilmalonato podem estar relacionadas com o dano neurológico característico das acidemias propiônica e metilmalônica, respectivamente (de Mattos-Dutra *et al.*, 2000; Fontella *et al.*, 2000). Vasques e colaboradores (2006) mostraram que as alterações comportamentais induzidas pela administração de MMA em hipocampo de ratos podem ser prevenidas por creatina, sugerindo um possível comprometimento do metabolismo energético cerebral pelo MMA. Outros autores também demonstraram que o MMA inibe *in vitro* a atividade das enzimas succinato desidrogenase, β -hidroxibutirato desidrogenase e lactato desidrogenase, além de complexos da cadeia respiratória de elétrons e a Na^+, K^+ -ATPase (Brusque *et al.*, 2002; Dutra *et al.*, 1993; Saad *et al.*, 2006; Pettenuzzo *et al.*, 2006; Wyse *et al.*, 2000) em cérebro de ratos, levando

a uma diminuição na produção de CO₂ e ATP, além de maior consumo de oxigênio e produção de ácido láctico (Wajner *et al.*, 1992; Royes *et al.*, 2003; Toyoshima *et al.*, 1995).

O ácido propiônico, presente em altas concentrações nos tecidos e fluidos biológicos de pacientes com PAemia, também apresenta efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central. Esses efeitos são atribuídos em parte à hiperamonemia, provocada pela inibição da enzima N-acetilglutamato sintase (Coude *et al.*, 1979), comprometimento do metabolismo energético mitocondrial, através de seus efeitos inibitórios sobre o ciclo de Krebs (Evangeliou *et al.*, 1985; Schwab *et al.*, 2006; Brock e Buckel, 2004) e fosforilação oxidativa (Schwab *et al.*, 2006). Severa disfunção mitocondrial, com inibição dos complexos I-IV da cadeia respiratória, foi demonstrada em tecidos de biópsia muscular de pacientes com PAemia (Schwab *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, muitas patologias humanas, como neoplasias, diabetes, aterosclerose, doenças inflamatórias crônicas e cardiovasculares, têm sido associadas com os efeitos danosos provocados pelas espécies reativas (Salvador e Henriques, 2004; Valko *et al.*, 2007; Maiese *et al.*, 2007). O cérebro é um órgão especialmente sensível ao dano oxidativo, devido ao seu elevado consumo de oxigênio, níveis relativamente baixos de defesas antioxidantes, presença de grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas neuronais, entre outros fatores (Halliwell, 2006). Dessa forma, o estresse oxidativo também possui um papel relevante na fisiopatogenia de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica e epilepsia (Reznick e Packer, 1993; Ben-Menachem *et al.*, 2000; Halliwell, 2006).

Levando em consideração esses aspectos, pesquisas vêm sendo realizadas na área de erros inatos do metabolismo no intuito de investigar se o estresse oxidativo pode estar relacionado com as manifestações neurológicas características desses distúrbios, visando buscar novas estratégias terapêuticas que proporcionem maior expectativa e melhor qualidade de vida aos pacientes. Dessa forma, estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os metabólitos

acumulados em algumas aminoacidopatias e acidemias orgânicas podem promover um desequilíbrio redox nas células, aumentando a produção de espécies reativas e/ou alterando a qualidade ou quantidade dos antioxidantes teciduais (Wajner *et al.*, 2004).

Sgaravatti e colaboradores (2008, 2009) mostraram que as altas concentrações de tirosina estimulam, *in vitro*, a oxidação lipídica e reduzem as concentrações de antioxidantes não enzimáticos em córtex cerebral de ratos. Resultados semelhantes foram encontrados em cérebro de ratos para os metabólitos acumulados na Doença do Xarope do Bordo (DXB) (Fontella *et al.*, 2002; Bridi *et al.*, 2005). Ainda no que se refere às aminoacidopatias, Kienzle Hagen e colaboradores (2002) mostraram que a lipoperoxidação está aumentada e que o potencial antioxidante total (TRAP) está diminuído em cérebro de ratos hiperfenilalaninêmicos.

A ocorrência de estresse oxidativo em pacientes portadores de DXB e de fenilcetonúria está sendo cada vez mais confirmada. Pacientes com DXB apresentam, no plasma, elevadas concentrações de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicando um aumento da lipoperoxidação, bem como uma diminuição da reatividade antioxidante total (TAR), antes e durante o tratamento dietético. Além disso, pacientes com DXB em tratamento apresentam uma importante redução da atividade da enzima glutathione peroxidase (GSH-Px) em seus eritrócitos, bem como dos níveis plasmáticos de selênio, que é o cofator dessa enzima antioxidante (Barschak *et al.*, 2006, 2007, 2008). Pacientes com fenilcetonúria também apresentam, no plasma, aumento da lipoperoxidação, bem como diminuição da reatividade antioxidante total e da atividade da GSH-Px, antes e durante o tratamento. Além disso, pacientes com fenilcetonúria com boa aderência ao tratamento apresentam deficiência de carnitina no plasma que parece estar correlacionada com o aumento da lipoperoxidação e diminuição do TAR nesses pacientes. Ainda, foram demonstrados elevados índices de dano ao DNA de leucócitos periféricos em pacientes fenilcetonúricos, especialmente naqueles com elevados níveis de fenilalanina plasmática (Sirtori *et al.*, 2005; Sitta *et al.*, 2006, 2009a,b).

Os ácidos orgânicos, entre eles os ácidos propiônico e metilmalônico, também apresentam potencial de induzir dano oxidativo às células. Os ácidos 3-metilglutacônico, 3-metilglutárico e 3-hidróxi-isovalérico, acumulados na acidúria 3-metilglutacônica, bem como o ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico, acumulado na acidúria 3-hidróxi-3-metilglutárica, estimulam a oxidação lipídica e protéica em cérebro de ratos (Leipnitz *et al.*, 2008a,b). Os ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico, principais metabólitos da acidemia glutárica do tipo I, também promovem estresse oxidativo em cérebro de ratos. O ácido glutárico induz lipoperoxidação, reduz o potencial antioxidante total e a atividade da enzima glutationa peroxidase (de Oliveira Marques *et al.*, 2003), enquanto o ácido 3-OH-glutárico estimula a produção de NO[•], H₂O₂ e de malondialdeído, bem como diminui as concentrações de alguns antioxidantes, como a glutationa (Latini *et al.*, 2005; Latini *et al.*, 2002).

Estudos demonstraram que os ácidos propiônico e metilmalônico induzem lipoperoxidação e diminuem a capacidade antioxidante total em cérebro de ratos *in vitro* (Fontella *et al.*, 2000). Corroborando com esses dados, as administrações intracerebral e sistêmica de MMA aumentaram a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (Marisco *et al.*, 2003; Malfatti *et al.*, 2003; Fighera *et al.*, 2003; Pettenuzzo *et al.*, 2003), sugerindo que o MMA também induz lipoperoxidação *in vivo*. Outros autores também mostraram que a injeção de PA e MMA em estriado de ratos provoca convulsões e aumenta a formação de proteínas carboniladas nessa estrutura cerebral (Royes *et al.*, 2005; Rigo *et al.*, 2006). Ainda, Wyse e colaboradores (2000) demonstraram que a inibição da Na⁺,K⁺-ATPase pelo MMA em córtex cerebral de ratos é totalmente prevenida pela administração de glutationa. De fato, estudos têm revelado que as convulsões e os prejuízos de aprendizagem provocados pelo MMA podem ser atenuados por antioxidantes como o ácido ascórbico e o α -tocoferol (Fighera *et al.*, 1999; Pettenuzzo *et al.*, 2003), assim como os déficits cognitivos causados pela administração crônica de PA (Pettenuzzo *et al.*, 2002). Esses achados em animais reforçam que o estresse oxidativo contribui para o dano neurológico presente nas desordens do metabolismo do propionato. Entretanto, poucos estudos na literatura têm investigado a ocorrência desse processo patológico nos pacientes portadores

dessas desordens. Em 1997, Moyano e colaboradores mediram os níveis de α -tocoferol em eritrócitos de pacientes com erros inatos do metabolismo e observaram que esse importante antioxidante está diminuído na PAemia. Outro estudo demonstrou que fibroblastos de pacientes com MMAemia apresentam um aumento significativo no conteúdo de ERO e no nível de expressão da MnSOD (Richard *et al.*, 2007). Mais recentemente, Mc Guire e colaboradores (2009) verificaram que os níveis de isoprostanos e de di-tirosina, que são marcadores de oxidação lipídica e protéica, respectivamente, estão aumentados, enquanto que a capacidade antioxidante está diminuída, na urina de pacientes com PAemia.

Considerando então que existem poucas evidências na literatura demonstrando a ocorrência de estresse oxidativo em pacientes portadores de desordens do metabolismo do propionato, bem como a ausência de dados sobre o efeito da L-carnitina nesse processo, nós objetivamos, nos capítulos 1 e 2 deste trabalho, avaliar marcadores de dano oxidativo a proteínas (quantificação de proteínas carboniladas e de tióis totais no plasma e de di-tirosina na urina) e a lipídios (quantificação de malondialdeído no plasma e de isoprostanos na urina), bem como a capacidade antioxidante urinária, em amostras de pacientes com PAemia e MMAemia, obtidas no momento do diagnóstico dessas desordens e durante o tratamento com dieta hipoprotéica e L-carnitina (100mg/Kg/dia).

Nossos resultados mostraram que os níveis de malondialdeído, um produto final da peroxidação de ácidos graxos de membrana (Halliwell e Gutteridge, 2007), e de isoprostanos, um derivado formado a partir da peroxidação do ácido araquidônico, estão significativamente aumentados no plasma e urina, respectivamente, de pacientes com PAemia e MMAemia no momento do diagnóstico, provavelmente como consequência de uma produção aumentada de espécies reativas. Esse mesmo grupo de pacientes apresentou aumento nas concentrações de proteínas carboniladas e na oxidação de grupamentos tióis no plasma, bem como uma maior excreção urinária de di-tirosina, que é produzida pela oxidação de resíduos de tirosina adjacentes em proteínas. Esses achados estão de acordo com estudos prévios que mostraram que os ácidos propiônico e metilmalônico são capazes de estimular a peroxidação lipídica *in vivo* e *in vitro* em

tecidos animais (Fontella *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2005; Malfatti *et al.*, 2003; Royes *et al.*, 2006) e a carbonilação protéica em cérebro de ratos (Rigo *et al.*, 2006; Royes *et al.*, 2006; Furian *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2005). Além disso, nossos resultados reforçam os achados obtidos por Mc Guire *et al.* (2009), mostrando uma maior excreção de isoprostanos e di-tirosina por pacientes com PAemia e MMAemia em relação a indivíduos saudáveis.

É importante enfatizar que cerca de 60-70% dos grupamentos sulfidrilas são ligados a proteínas, ao passo que 30-40% desses grupos são ligados a moléculas menores, tais como a glutathione (Requejo *et al.*, 2010), indicando que a diminuição nos níveis desses grupos observada no plasma de pacientes com PAemia e MMAemia no diagnóstico representa, predominantemente, dano oxidativo protéico. A maioria dos grupamentos tióis de proteínas estão presentes nos resíduos de cisteína, e a oxidação desses grupos leva à formação de pontes dissulfeto, o que altera o estado redox da molécula, sua estrutura e funcionalidade. Assim, a oxidação protéica pode comprometer a atividade de enzimas, receptores e proteínas transportadoras (Levine *et al.*, 1990; Halliwell e Whiteman, 2004), tendo relevância fisiopatológica. Por outro lado, a oxidação lipídica promove alterações na permeabilidade, seletividade e fluidez das membranas celulares, interferindo na homeostase celular (Halliwell, 2006). Além disso, o malondialdeído é um composto altamente tóxico, que pode reagir com proteínas e bases do DNA, causando alterações nos resíduos de aminoácidos e provocando mutações (Halliwell e Gutteridge, 2007). Dessa forma, é provável que o dano oxidativo a proteínas e a lipídios seja um processo importante na fisiopatogenia da PAemia e MMAemia, contribuindo para o desenvolvimento das manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes.

Nossos resultados também mostraram que pacientes com distúrbios do metabolismo do propionato em tratamento com dieta hipoprotéica e L-carnitina apresentam níveis mais baixos de MDA e de isoprostanos em comparação com os pacientes do grupo diagnóstico. A dosagem de proteínas carboniladas e de di-tirosina também foi significativamente menor no plasma e urina, respectivamente, dos pacientes sob tratamento em relação aos pacientes do grupo diagnóstico, não

apresentando diferenças em relação ao grupo controle. Nenhuma diferença foi observada, entretanto, na dosagem plasmática de tióis totais entre os pacientes com PAemia e MMAemia tratados e não-tratados. Embora as dosagens de grupamentos tióis e de proteínas carboniladas reflitam o dano oxidativo sobre proteínas, os grupamentos carbonilas (aldeídos e cetonas) são produzidos principalmente pela oxidação das cadeias laterais protéicas, especialmente nos resíduos de prolina, arginina, lisina e treonina, enquanto que a diminuição de grupamentos tióis protéicos reflete a oxidação em resíduos de cisteína das proteínas. Dessa forma, uma vez que essas dosagens avaliam diferentes mecanismos de oxidação protéica, os resultados desse trabalho sugerem que o tratamento com L-carnitina é mais eficaz na prevenção da carbonilação protéica e da oxidação de resíduos de tirosina em proteínas, o que é evidenciado pela menor excreção urinária de di-tirosina pelos pacientes em tratamento.

Nós também observamos que pacientes com desordens do metabolismo do propionato apresentam uma menor capacidade antioxidante urinária em relação a indivíduos saudáveis, mesmo durante o tratamento com dieta hipoprotéica e L-carnitina. Estudos prévios mostraram que os ácidos propiônico e metilmalônico são capazes de reduzir o potencial antioxidante total (TRAP) em homogeneizados de cérebro de ratos (Fontella *et al.*, 2000), sugerindo que o acúmulo desses metabólitos possa provocar uma diminuição das defesas antioxidantes nos tecidos dos pacientes afetados. Nesse estudo, nós verificamos que o tratamento com L-carnitina não foi capaz de corrigir essa alteração, o que pode ter ocorrido devido à falta de micronutrientes essenciais para o sistema antioxidante, causada pelo uso de dietas altamente restritivas, o que tem sido observado em outros EIM (Barschak *et al.*, 2008; Sitta *et al.*, 2006).

Esses resultados indicam, portanto, que o tratamento preconizado para os pacientes com desordens do metabolismo do propionato reduz a peroxidação lipídica e o dano oxidativo protéico, que estão aumentados nos pacientes com PAemia e MMAemia no momento do diagnóstico. Além disso, nós também verificamos uma correlação negativa significativa entre os níveis de MDA e as concentrações plasmáticas de carnitina total e livre nos pacientes com PAemia e

MMAemia, o que sugere que a L-carnitina está diretamente envolvida na prevenção da peroxidação lipídica. Contribuindo com esses achados, foi observado que pacientes com maiores concentrações urinárias de isoprostanos e di-tirosina também apresentavam menor excreção urinária de carnitina total e livre, reforçando ainda mais o papel da L-carnitina na prevenção do dano oxidativo nessas desordens.

A L-carnitina é um composto de baixo peso molecular que desempenha um importante papel no transporte de ácidos graxos de cadeia longa para o interior da mitocôndria, para que possam ser utilizados como fonte energética através da β -oxidação. A L-carnitina normalmente está presente no plasma na forma de carnitina livre. Entretanto, nas doenças em que ocorre um acúmulo de ácidos orgânicos, a L-carnitina se conjuga com esses ácidos formando ésteres de carnitina (acilcarnitinas), como a propionilcarnitina, na PAemia, e metilmalonilcarnitina, na MMAemia, aumentando a excreção desses metabólitos e, conseqüentemente, reduzindo os seus efeitos tóxicos (Hoppel, 2003; Virmani e Binienda, 2004; Nyhan *et al.*, 2005). Dessa forma, é possível que a redução da oxidação protéica e lipídica nos pacientes com PAemia e MMAemia em tratamento esteja relacionada, ao menos em parte, com a redução das concentrações intracelulares tóxicas de MMA, PA e seus derivados, reduzindo os efeitos oxidantes dessas moléculas.

Por outro lado, numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado efeitos antioxidantes e antiperoxidativos da L-carnitina. A L-carnitina é capaz de sequestrar espécies reativas do oxigênio, como o ânion superóxido (Gülçin, 2006), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (Reznick *et al.*, 1992; Gülçin, 2006; Derin *et al.*, 2004), além de quelar íons Fe^{+2} (Reznick *et al.*, 1992; Muthuswamy *et al.*, 2006), que participam na formação do radical hidroxila. Além disso, alguns pesquisadores mostraram que a L-carnitina aumenta os níveis de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (Rani e Panneerselvam, 2002; Augustyniak e Skrzydlewska, 2009). Ainda, a L-carnitina facilita o transporte de ácidos graxos para o interior da mitocôndria, diminuindo a disponibilidade de lipídios para a peroxidação (Rajasekar *et al.*, 2005). Nesse sentido, estudos

prévios mostraram que a peroxidação lipídica que ocorre no plasma de pacientes com fenilcetonúria está inversamente relacionada com os níveis de L-carnitina (Sitta *et al.*, 2009a). Nesse trabalho, nós observamos uma menor peroxidação lipídica nos pacientes com desordens do metabolismo do propionato em tratamento, a qual parece estar relacionada à fração livre da L-carnitina. Assim, é provável que as propriedades antioxidantes e antiperoxidativas da L-carnitina também tenham contribuído para os menores níveis de dano oxidativo observados nos pacientes com PAemia e MMAemia sob tratamento.

Nossos achados, juntamente com outros obtidos de estudos em animais, sugerem um provável envolvimento de espécies reativas na fisiopatogenia das desordens do metabolismo do propionato. Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente instáveis que podem provocar diversos efeitos danosos sobre as células, oxidando lipídios, proteínas, DNA e RNA celulares (Halliwell e Gutteridge, 2007). Assim, uma vez que estudos demonstraram que os ácidos propiônico e metilmalônico são capazes de estimular a oxidação lipídica e protéica *in vitro* e *in vivo*, nós objetivamos, no capítulo 3 deste trabalho, investigar o efeito *in vitro* desses ácidos orgânicos sobre o DNA, através do ensaio cometa, sem e com a adição de L-carnitina.

O ensaio cometa é uma técnica rápida, simples, sensível e de baixo custo, para mensurar e analisar as lesões e detectar efeitos de reparo no DNA em células individuais expostas a agentes genotóxicos. Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos alcali-lábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão. O ensaio cometa apresenta algumas vantagens sobre as técnicas bioquímicas e citogenéticas, uma vez que pode ser utilizado para qualquer tipo de célula, sendo necessário apenas um pequeno número das mesmas e não requerer células em divisão (Singh, 1988; Tice e Strauss, 1995; Speit e Hartmann, 1995).

Durante as crises de descompensação metabólica, os pacientes com PAemia e MMAemia apresentam no sangue concentrações elevadas de ácido propiônico e metilmalônico, respectivamente, que podem variar de 2,5 a 5,0 mM (Hoffmann *et al.*, 1993). Os resultados do ensaio cometa mostraram que essas

concentrações de ácido propiônico (2,0; 3,0 e 5,0 mM) e de ácido metilmalônico (0,5; 2,0 e 5,0 mM) foram capazes de aumentar significativamente, *in vitro*, os índices de dano ao DNA em leucócitos periféricos humanos, em relação aos níveis dos controles. Essas diferenças foram provocadas principalmente por um aumento significativo de células com classes de dano 1 e 2. Entretanto, o ácido metilmalônico, além de ter gerado índices de dano ao DNA maiores que o ácido propiônico, também levou a um aumento significativo de células com classes de dano 3 e 4, o que sugere que a indução do dano ao DNA pelo MMA é mais proeminente que a provocada pelo PA.

Embora não seja possível, através do ensaio cometa, verificar qual o mecanismo envolvido na indução do dano ao DNA, é provável que o dano ao DNA induzido pelo PA e MMA tenha ocorrido através de uma ação oxidativa direta ou indireta dessas moléculas, tendo em vista os estudos que mostraram que o PA e o MMA podem produzir um desequilíbrio redox nas células, provavelmente devido a uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio via inibição da cadeia respiratória (Brusque *et al.*, 2002; Schwab *et al.*, 2006; Indo *et al.*, 2007). Essa hipótese é reforçada por um estudo que demonstrou que a exposição de neurônios de córtex e estriado de ratos ao ácido metilmalônico levou a um padrão de fragmentação do DNA característico de morte celular por apoptose, o qual foi prevenido com a adição de antioxidantes ao meio (McLaughlin *et al.*, 1998). Em um estudo publicado recentemente por Fernandes e colaboradores (2011), foi demonstrado que o ácido propiônico (0,2-10 mM) não foi capaz de induzir *in vitro* dano oxidativo a proteínas e a lipídios em sinaptossomas de cérebro de ratos, ao contrário do ácido metilmalônico, que demonstrou um importante efeito oxidativo. Esses achados corroboram com os nossos resultados, mostrando uma maior indução *in vitro* de dano ao DNA em leucócitos humanos pelo ácido metilmalônico em comparação com o ácido propiônico.

O dano oxidativo ao DNA, provocado pelo ataque de espécies reativas do oxigênio ou por produtos da peroxidação lipídica, pode gerar modificações químicas nas bases do DNA ou na estrutura da desoxirribose, podendo levar a quebras de cadeia ou ligações cruzadas entre o DNA e proteínas. Essas

alterações podem provocar um pareamento inadequado de bases e erros na transcrição do DNA, gerando mutações, perda de heterozigosidade, aberrações cromossômicas, citotoxicidade e crescimento neoplásico (Cooke *et al.*, 2006; Altieri *et al.*, 2008).

Ainda, mostramos nesse estudo que o tratamento *in vitro* com L-carnitina, nas doses de 90 a 150 μM , reduziu significativamente os índices de dano ao DNA provocados pelo PA e MMA, de maneira dose-dependente. Entretanto, para o ácido metilmalônico, o efeito da L-carnitina iniciou com a dose de 60 μM . A L-carnitina 30 μM , que é a concentração detectada no sangue dos pacientes com PAemia e MMAemia no momento do diagnóstico, não provocou alterações significativas nos índices de dano ao DNA provocados pelos ácidos metilmalônico e propiônico. Já as concentrações de L-carnitina detectadas no sangue dos pacientes em tratamento (90-150 μM), foram capazes de reduzir o dano ao DNA induzido por PA e MMA, o que corrobora para a hipótese de que o dano oxidativo a biomoléculas ocorre nas desordens do metabolismo do propionato e que o tratamento com L-carnitina pode contribuir para a prevenção desse dano. Ainda, a concentração de 150 μM de L-carnitina foi capaz de prevenir o dano ao DNA pelos ácidos propiônico e metilmalônico, mantendo os índices de dano ao DNA estatisticamente iguais aos do grupo controle. Nossos resultados estão de acordo com os de outros autores que mostraram que a L-carnitina reduz o dano oxidativo ao DNA (Boerrigter *et al.*, 1993; Vanella *et al.*, 2000; Thangasamy *et al.*, 2009). Os mecanismos provavelmente envolvidos nessa ação protetora incluem a capacidade da L-carnitina de sequestrar espécies reativas do oxigênio, melhorar a produção energética das células e estimular mecanismos de reparo do DNA, como a atividade da enzima poli (ADP-ribose) polimerase (Boerrigter *et al.*, 1993; Vanella *et al.*, 2000; Thangasamy *et al.*, 2009).

Os resultados deste estudo em conjunto com os de outros autores, sugerem que o estresse oxidativo possa contribuir para as manifestações clínicas presentes nas desordens do metabolismo do propionato. Cabe salientar que, embora os ácidos propiônico e metilmalônico sejam considerados os principais agentes neurotóxicos nessas desordens, é provável que o efeito sinérgico dos

diferentes ácidos orgânicos acumulados, tais como os subprodutos dos ácidos propiônico e metilmalônico, seja mais importante que o efeito isolado de cada um desses ácidos (Morath *et al.*, 2008).

Assim como o estresse oxidativo, as alterações colinérgicas também são eventos importantes associados à fisiopatologia de alguns distúrbios neurodegenerativos (Ballard *et al.*, 2005). Tendo em vista que alguns estudos têm demonstrado que a atividade de colinesterases está alterada em alguns EIM, provavelmente como consequência de uma produção aumentada de espécies reativas pelos metabólitos acumulados nessas doenças (Delwing *et al.*, 2005; Wyse *et al.*, 2004; Stefanello *et al.*, 2005), e que a butirilcolinesterase é considerada um marcador periférico do sistema colinérgico central (Fossi *et al.*, 1992), no capítulo 4 desse trabalho nós investigamos o efeito do tratamento com dieta hipoprotéica e L-carnitina sobre a atividade da enzima butirilcolinesterase no plasma de pacientes com PAemia e MMAemia, estabelecendo sua relação com o dano oxidativo a lipídios observado nesses pacientes.

Nossos resultados mostraram que a atividade da enzima butirilcolinesterase está reduzida no plasma de pacientes com desordens do metabolismo do propionato no momento do diagnóstico, enquanto os níveis de MDA nesse grupo estão significativamente aumentados em relação aos controles, conforme já observado no capítulo 1. Por outro lado, pacientes em tratamento apresentaram níveis de MDA significativamente menores que os pacientes não tratados e atividade enzimática estatisticamente igual aos controles. Cabe salientar que esse é o primeiro trabalho a avaliar a atividade da butirilcolinesterase nessas desordens.

Nossos achados sugerem que a inibição da enzima butirilcolinesterase nas desordens do metabolismo do propionato pode ser decorrente de uma produção aumentada de espécies reativas que ocorre nessas doenças, uma vez que a atividade dessa enzima apresentou uma correlação negativa com os níveis de MDA. Esses resultados corroboram com os dados obtidos por outros autores mostrando uma relação inversa entre a peroxidação lipídica e a atividade da butirilcolinesterase em outras patologias (Garcia *et al.*, 2008; Valentini *et al.*,

2010). Nesse contexto, Schallreuter e colaboradores (2006) mostraram que a butirilcolinesterase pode ser inativada pela oxidação mediada por H₂O₂ nos resíduos de metionina e triptofano presentes em seu sítio ativo, sendo mais vulnerável ao dano oxidativo que a acetilcolinesterase.

A L-carnitina combinada à dieta hipoprotéica foi capaz de prevenir a alteração da BuChE no plasma dos pacientes em tratamento. Esses resultados diferem daqueles reportados por Bajgar *et al.* (2007), mostrando que o pré-tratamento com carnitina aumentou a inibição da acetilcolinesterase no cérebro de ratos e não alterou a atividade da BuChE no plasma e no fígado desses animais, após a administração de galantamina, um inibidor de colinesterases. É importante salientar que a L-carnitina, por si só, não apresenta efeito inibitório sobre a atividade de colinesterases, mas é capaz de aumentar a penetração da galantamina no cérebro, acentuando a sua ação (Bajgar *et al.*, 2007). Com relação aos resultados do nosso trabalho, o efeito protetor do tratamento em prevenir a atividade alterada da BuChE pode ter ocorrido através das propriedades antioxidantes e antiperoxidativas da L-carnitina, evitando, dessa forma, a inibição da enzima por meio de espécies reativas (Vanella *et al.*, 2000; Gülçin *et al.*, 2006; Reznick *et al.*, 1992; Derin *et al.*, 2004). Outros autores também demonstraram que a administração de antioxidantes, tais como as vitaminas A e C, é capaz de corrigir a inibição da BuChE que ocorre, por exemplo, em modelos animais de hiperhomocisteinemia e hiperargininemia (Stefanello *et al.*, 2005; Wyse *et al.*, 2004).

Considerando, então, que nos últimos anos estudos têm sugerido que a butirilcolinesterase desempenha funções importantes no SNC, tais como no controle dos níveis de acetilcolina, manutenção da integridade estrutural e fisiológica do sistema colinérgico (Mesulam *et al.*, 2002), bem como na regulação da proliferação e diferenciação neuronal (Mack e Robitzki, 2000), é provável que a inibição dessa enzima possa ter relevância na fisiopatogenia das desordens do metabolismo do propionato, reforçando a importância do tratamento com L-carnitina e dieta hipoprotéica para a prevenção desse dano.

Assim, analisados em conjunto, os resultados desse trabalho fornecem evidências de que o dano oxidativo a biomoléculas (lipídios, proteínas e DNA) e a inibição da enzima butirilcolinesterase ocorre em pacientes portadores de desordens do metabolismo do propionato, provavelmente devido a uma produção aumentada de espécies reativas decorrente do acúmulo de metabólitos tóxicos que ocorre nessas doenças. Além disso, nossos resultados sugerem que o tratamento com L-carnitina pode atuar como um provável agente antioxidante, auxiliando na prevenção desses processos potencialmente patológicos.

5. CONCLUSÕES

Principais resultados encontrados:

- a) Os níveis de malondialdeído e de proteínas carboniladas estão significativamente aumentados no plasma de pacientes com PAemia e MMAemia no momento do diagnóstico, em relação a indivíduos saudáveis.

- b) A dosagem de grupamentos tióis totais está significativamente diminuída no plasma de pacientes com PAemia e MMAemia no diagnóstico, em relação a indivíduos saudáveis.

- c) Pacientes com PAemia e MMAemia em tratamento com L-carnitina, dieta hipoprotéica e fórmula sintética de aminoácidos apresentam concentrações significativamente mais baixas de malondialdeído e de proteínas carboniladas em relação aos indivíduos com PAemia e MMAemia não tratados.

- d) As concentrações plasmáticas de carnitina total e de carnitina livre nos pacientes com desordens do metabolismo do propionato apresentam uma correlação inversa com as concentrações plasmáticas de malondialdeído nos pacientes com PAemia e MMAemia.

- e) Pacientes com desordens do metabolismo do propionato apresentam, no momento do diagnóstico, concentrações urinárias significativamente aumentadas de isoprostanos e di-tirosina, marcadores de oxidação lipídica e protéica, respectivamente.

f) Pacientes em tratamento com L-carnitina e dieta hipoprotéica apresentam concentrações urinárias de isoprostanos e di-tirosina estatisticamente iguais aos do grupo controle.

g) Níveis maiores dos biomarcadores urinários de dano a lipídios e a proteínas foram observados nos pacientes com PAemia e MMAemia que apresentavam menores concentrações urinárias de carnitina total e livre.

h) A medida da capacidade antioxidante urinária está significativamente diminuída nos pacientes com desordens do metabolismo do propionato, antes e durante o tratamento.

i) Os ácidos propiônico (2,0; 3,0 e 5 mM) e metilmalônico (0,5; 2,0 e 5 mM) provocam, *in vitro*, danos ao DNA de leucócitos periféricos saudáveis humanos, os quais são atribuídos, principalmente, a um aumento significativo de células com classes de dano 1 e 2 para o PA, e células com classes de dano 1,2, 3 e 4 para o MMA.

j) O tratamento *in vitro* com L-carnitina (90-150 μ M) reduziu significativamente o dano ao DNA induzido por PA 5mM, de maneira dose-dependente.

k) O tratamento *in vitro* com L-carnitina (60-150 μ M) reduziu significativamente o dano ao DNA induzido por MMA 5 mM, de maneira dose-dependente, e preveniu a formação de células com classes de dano 3 e 4.

l) A concentração de 150 μ M de L-carnitina preveniu os efeitos do PA e MMA sobre o dano ao DNA.

m) A atividade da enzima butirilcolinesterase está significativamente diminuída no plasma dos pacientes com desordens do metabolismo do propionato não-tratados.

n) O tratamento com L-carnitina e dieta hipoprotéica é capaz de prevenir a redução da atividade da butirilcolinesterase nos pacientes com PAemia e MMAemia.

o) A atividade da butirilcolinesterase está negativamente correlacionada com os níveis plasmáticos de malondialdeído nos pacientes com desordens do metabolismo do propionato.

Conclusão final:

Os resultados desse trabalho permitem concluir que o dano oxidativo a proteínas e a lipídios, bem como a redução da atividade da enzima BuChE, ocorre em pacientes com desordens do metabolismo do propionato, o que pode, possivelmente, contribuir para o desenvolvimento das manifestações clínicas apresentadas por esses pacientes. Os ácidos propiônico e metilmalônico, que são os principais metabólitos acumulados na PAemia e MMAemia, respectivamente, induzem, *in vitro*, danos ao DNA de leucócitos, possivelmente através de mecanismos oxidativos, e, se esse processo for confirmado *in vivo* nos pacientes afetados, reforçará o seu envolvimento na fisiopatogenia das desordens do metabolismo do propionato. O tratamento com L-carnitina parece estar envolvido direta ou indiretamente na redução *in vivo* do dano oxidativo a proteínas e a lipídios e na correção da atividade da BuChE nos pacientes com PAemia e MMAemia, além de reduzir, *in vitro*, o dano ao DNA provocado pelo acúmulo de ácido propiônico e ácido metilmalônico. Em conjunto, esses resultados reforçam a importância do tratamento com L-carnitina na prevenção do dano oxidativo a biomoléculas (lipídios, proteínas e DNA), que pode estar envolvido nas complicações dessas doenças.

6. PERSPECTIVAS

Na continuidade deste trabalho pretendemos:

- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase em eritrócitos de pacientes com PAemia e MMAemia, antes e durante o tratamento com L-carnitina.
- Analisar o dano ao DNA em leucócitos de pacientes com desordens do metabolismo do propionato, antes e durante o tratamento com L-carnitina.
- Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo no plasma e urina de pacientes com PAemia e MMAemia em diferentes tempos de tratamento com L-carnitina.
- Correlacionar as concentrações dos principais metabólitos acumulados nessas doenças com diferentes parâmetros de estresse oxidativo.
- Avaliar marcadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 e NF- κ β no sangue de pacientes com acidemia propiônica e metilmalônica, antes e após o tratamento com L-carnitina, correlacionando com os marcadores de dano oxidativo.
- Avaliar biomarcadores da ação das ERN no sangue e urina de pacientes com PAemia e MMAemia, antes e durante o tratamento com L-carnitina.

REFERÊNCIAS

ABDUL, H.M.; BUTTERFIELD, D.A. Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v.42, p.371-384, 2007.

ALTIERI, F.; GRILLO, C.; MACERONI, M.; CHICHIARELLI, S. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.10, p.891-937, 2008.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.7915-7922, 1993.

AUGUSTYNIAK, A.; SKRZYDLEWSKA, E. L-Carnitine in the lipid and protein protection against ethanol-induced oxidative stress. **Alcohol**, v.43, p.217-223, 2009.

BALLARD, C.G.; GREIG, N.H.; GUILLOZET-BONGAARTS, A.L.; ENZ, A.; DARVESH, S. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. **Current Alzheimer Research**, v.2, p.307-318, 2005.

BAJGAR, J.; BARTOSOVA, L.; FUSEK, J.; SVOBODA, Z.; HERINK, J.; KVETINA, J.; PALICKA, V.; ZIVNY, P.; BLAHA, V. Changes of cholinesterase activities in the plasma and some tissues following administration of L-carnitine and galanthamine to rats. **Neuroscience Letters**, v.411, p.212-216, 2007.

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, p.279-286, 2006.

BARSCHAK, A.G.; SITTA, A.; DEON, M.; BARDEN, A.T.; SCHMITT, G.O.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma selenium concentration are reduced in maple syrup urine disease patients during treatment. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.25, p.335-338, 2007.

BARSCHAK, A.G.; SITTA, A.; DEON, M.; BARDEN, A.T.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. **Metabolic Brain Disease**, v.23, p.71-80, 2008.

BEN-MENACHEM, E.; KYLLERMAN, M.; MARKLUND, S. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. **Epilepsy Research**, v.40, p.33-39, 2000.

BIRD, S.; MILLER, N.J.; COLLINS, J.E.; RICE-EVANS, C.A. Plasma antioxidant capacity in two cases of tyrosinaemia type 1: one case treated with NTBC. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.18, p.123-126, 1995.

BOERRIGTER, M.E.; FRANCESCHI, C.; ARRIGONI-MARTELLI, E.; WEI, J.Y.; VIJG, J. The effect of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on the disappearance of DNA single-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes. **Carcinogenesis**, v.14, p.2131-2136, 1993.

BREMER, J. Carnitine metabolism and functions. **Physiological Reviews**, v.63, p.1420–1480, 1983.

BRIDI, R.; BRAUN, C.A.; ZORZI, G.K.; WANNMACHER, C.M.; WAJNER, M.; LISSI, E.G.; DUTRA-FILHO, C.S. alpha-keto acids accumulating in maple syrup

urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defences in cerebral cortex from young rats. **Metabolic Brain Disease**, v.20, p.155-67, 2005.

BROCK, M.; BUCKEL, W. On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. **European Journal of Biochemistry**, v.271, p.3227-3241, 2004.

BRODIE, A.E.; REED, D.J. Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.148, n.1, p.120-125, 1987.

BRUSQUE, A.M.; BORBA ROSA, R.; SCHUCK, P.F.; DALCIN, K.B.; RIBEIRO, C.A.; SILVA, C.G.; WANNMACHER, C.M.; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T.; BRIONES, P.; WAJNER, M. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. **Neurochemistry International**, v.40, p.593-601, 2002.

BURLINA, A.P.; MANARA, R.; CALDERONE, M.; CATUOGNO, S.; BURLINA, A.B. Diffusion-weighted imaging in the assessment of neurological damage in patients with methylmalonic aciduria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.26, p.417-422, 2003.

BURTON, B.K. Inborn errors of metabolism: the clinical diagnosis in early infancy. **Pediatrics**, v.79, p.359, 1987.

BURTON, B. Inborn errors of metabolism in infancy: a guide to diagnosis. **Pediatrics**, v.102, p.69-77, 1998.

CHALMERS, R.A.; LAWSON, A.M. **Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias**. 1st ed. London: Chapman and Hall, 1982.

CHANDLER, R.J.; ZERFAS, P.M.; SHANSKE, S.; SLOAN, J.; HOFFMANN, V.; DIMAURO, S.; VENDITTI, C.P. Mitochondrial dysfunction in mutant methylmalonic acidemia. **FASEB Journal**, v.23, p.1252-1261, 2009.

COKUGRAS, A.N.; TEZCAN, E.F. Amitriptyline: a potent inhibitor of butyrylcholinesterase from human serum. **General Pharmacology**, v.29, p.835-838, 1997.

COOKE, M.S.; OLINSKI, R.; EVANS, M.D. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? **Clinica Chimica Acta**, v.365, p.30-49, 2006.

COUDE, F.X.; SWEETMAN, L.; NYHAN, W.L. Inhibition by propionyl-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. A possible explanation for hyperammonemia in propionic and methylmalonic acidemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v.64, p.1544-1551, 1979.

COULOMBE, J.T.; SHIH, V.E.; LEVY, H.L. Massachusetts Metabolic Disorders Screening Program. II. Methylmalonic aciduria. **Pediatrics**, v.67, p.26-31, 1981.

DARVESH, S.; GRANTHAM, D.L.; HOPKINS, D.A. Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. **The Journal of Comparative Neurology**, v.393, p.374-390, 1998.

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews Neuroscience**, v.4, p.131-138, 2003.

DE ALMEIDA, L.M.; FUNCHAL, C.; PELAEZ PDE, L.; PESSUTTO, F.D.; LOUREIRO, S.O.; VIVIAN, L.; WAJNER, M.; PESSOA-PUREUR, R. Effect of propionic and methylmalonic acids on the in vitro phosphorylation of intermediate

filaments from cerebral cortex of rats during development. **Metabolic Brain Disease**, v.18, p.207-219, 2003.

DE BAULNY, H.O.; BENOIST, J.F.; RIGAL, O.; TOUATI, G.; RABIER, D.; SAUDUBRAY, J.M. Methylmalonic and propionic acidaemias: management and outcome. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.28, p.415-423, 2005.

DE KEYZER, Y.; VALAYANNOPOULOS, V.; BENOIST, J.F.; BATTEUX, F.; LACAÏLLE, F.; HUBERT, L.; CHRÉTIEN, D.; CHADEFEAUX-VEKEMANS, B.; NIAUDET, P.; TOUATI, G.; MUNNICH, A.; DE LONLAY, P. Multiple OXPHOS deficiency in the liver, kidney, heart, and skeletal muscle of patients with methylmalonic aciduria and propionic aciduria. **Pediatric Research**, v.66, p.91-95, 2009.

DE MATTOS-DUTRA, A.; SAMPAIO DE FREITAS, M.; WAJNER, M.; PESSOA-PUREUR, R. Propionic and methylmalonic acids inhibit the in vitro phosphorylation of a 85 kDa cytoskeletal protein from cerebral cortex of rats. **Neurochemistry International**, v.33, p.407-414, 1998.

DE MATTOS-DUTRA, A.; MEIRELLES, R.; BEVILAQUA DA ROCHA, B.; KOMMERS, T.; WOFCHUK, S.T.; WAJNER, M.; PESSOA-PUREUR, R. Methylmalonic and propionic acids increase the in vitro incorporation of ³²P into cytoskeletal proteins from cerebral cortex of young rats through NMDA glutamate receptors. **Brain Research**, v.856, p.111-118, 2000.

DE MELLO, C.F.; BEGNINI, J.; JIMÉNEZ-BERNAL, R.E.; RUBIN, M.A.; DE BASTIANI, J.; DA COSTA, E.JR.; WAJNER, M. Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. **Brain Research**, v.721, p.120-125, 1996.

DE OLIVEIRA MARQUES, F.; HAGEN, M.E.; PEDERZOLLI, C.D.; SGARAVATTI, A.M.; DURIGON, K.; TESTA, C.G.; WANNMACHER, C.M.; DE SOUZA WYSE, A.T.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. **Brain Research**, v.964, p.153-158, 2003.

DELWING, D.; CHIARANI, F.; WANNMACHER, C.M.; WAJNER, M.; WYSE, A.T. Effect of hyperprolinemia on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat. **Amino Acids**, v.28, p.305-308, 2005.

DELWING-DE LIMA, D.; WOLLINGER, L.F.; CASAGRANDE, A.C.; DELWING, F.; DA CRUZ, J.G.; WYSE, A.T.; DELWING-DAL MAGRO, D. Guanidino compounds inhibit acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities: effect neuroprotector of vitamins E plus C. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.28, p.465-473, 2010.

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, p.441-444, 2007.

DERIN, N.; IZGUT-UYSAL, V.N.; AGAC, A.; ALICIGUZEL, Y.; DEMIR, N. L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.55, p.595-606, 2004.

DESVIAT, L.R.; SANCHEZ-ALCUDIA, R.; PÉREZ, B.; PÉREZ-CERDÁ, C.; NAVARRETE, R.; VIJZELAAR, R.; UGARTE, M. High frequency of large genomic

deletions in the PCCA gene causing propionic acidemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.96, p.171-176, 2009.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p.47-95, 2002.

DUTRA, J.C.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.F.; DUTRA-FILHO, C.S.; WANNMACHER, C.M. Effects of methylmalonate and propionate on uptake of glucose and ketone bodies in vitro by brain of developing rats. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v.45, p.56-64, 1991.

DUTRA, J.C.; DUTRA-FILHO, C.S.; CARDOZO, S.E.; WANNMACHER, C.M.; SARKIS, J.J.; WAJNER, M. Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.16, p.147-153, 1993.

EVANGELIOU, A.; STUMF, D.A.; PARKS, J.K. Citrate syntase inhibition by acyl CoA esters. **Annals of Neurology**, v.18, p.383-384, 1985.

EVERITT, B.J.; ROBBINS, T.W. Central cholinergic systems and cognition. **Annual Review of Psychology**, v.48, p. 649–684, 1997.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v.18, p.872-879, 2002.

FENTON, W.A.; GRAVEL, R.A.; ROSENBLATT, D.S. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (Eds.): **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8th ed.; New York: McGraw-Hill, 2001.

FERNANDES, C.G.; BORGES, C.G.; SEMINOTTI, B.; AMARAL, A.U.; KNEBEL, L.A.; EICHLER, P.; DE OLIVEIRA, A.B.; LEIPNITZ, G.; WAJNER, M. Experimental evidence that methylmalonic acid provokes oxidative damage and compromises antioxidant defenses in nerve terminal and striatum of young rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 31, p. 775-85, 2011.

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FIGHERA, M.R.; QUEIROZ, C.M.; STRACKE, M.P.; BRAUER, M.C.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, L.L.; FRUSSA-FILHO, R.; WAJNER, M.; DE MELLO, C.F. Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. **Neuroreport**, v.10, p.2039-2043, 1999.

FIGHERA, M.R.; BONINI, J.S.; DE OLIVEIRA, T.G.; FRUSSA-FILHO, R.; ROCHA, J.B.; DUTRA-FILHO, C.S.; RUBIN, M.A.; MELLO, C.F. GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.35, p.465-73, 2003.

FILIPOWICZ, H.R.; ERNST, S.L.; ASHURST, C.L.; PASQUALI, M.; LONGO, N. Metabolic changes associated with hyperammonemia in patients with propionic acidemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.88, p.123-30, 2006.

FONTELLA, F.U.; PULROLNIK, V.; GASSEN, E.; WANNMACHER, C.M.; 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, p.541-544, 2000.

FONTELLA, F.U.; GASSEN, E.; PULROLNIK, V.; WANNMACHER, C.M.; KLEIN, A.B.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in

rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. **Metabolic Brain Disease**, v.17, p.47-54, 2002.

FORMAN, H.J. Use and abuse of exogenous H₂O₂ in studies of signal transduction. **Free Radical Biology & Medicine**, v.42, p.926-932, 2007.

FOSSI, M.C.; LEONZIO, C.; MASSI, A.; LARI, L.; CASINI, S. Serum esterase inhibition in birds: a nondestructive biomarker to assess organophosphorus and carbamate contamination. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.23, p.99-104, 1992.

FURIAN, A.F.; FIGHERA, M.R.; OLIVEIRA, M.S.; FERREIRA, A.P.; FIORENZA, N.G.; DE CARVALHO MYSKIW, J.; PETRY, J.C.; COELHO, R.C.; MELLO, C.F.; ROYES, L.F. Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. **Neurochemistry International**, v.50, p.164-171, 2007.

GARCIA, S.C.; WYSE, A.T.; VALENTINI, J.; ROEHRS, M.; MORO, A.M.; PANIZ, C.; SCHMITT, G.; GROTTA, D.; POMBLUM, V.J. Butyrylcholinesterase activity is reduced in haemodialysis patients: is there association with hyperhomocysteinemia and/or oxidative stress? **Clinical Biochemistry**, v.41, p.474-479, 2008.

GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitor therapy stabilizes symptoms of Alzheimer disease. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v.14, Suppl 1:S3-10, 2000.

GIMENEZ-SANCHEZ, G.; CHILDS, B.; VALLE, D. The effect of mendelian disease on human health. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (Eds.): **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

GIULIVI, C.; PODEROSO, J.J.; BOVERIS, A. Production of nitric oxide by mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p. 11038-11043, 1998.

GÓMEZ-AMORES, L.; MATE, A.; MIGUEL-CARRASCO, J.L.; JIMÉNEZ, L.; JOS, A.; CAMEÁN, A.M.; REVILLA, E.; SANTA-MARÍA, C.; VÁZQUEZ, C.M. L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, v.18, p.533-540, 2007.

GÓMEZ-RAMOS, P.; MORÁN, M.A. Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase in senile plaques in the brains of aged and Alzheimer disease patients. **Molecular and Chemical Neuropathology**, v.30, p.161-173, 1997.

GREGERSEN, N. The specific inhibition of the pyruvate dehydrogenase complex from pig kidney by propionyl-CoA and isovaleryl-Co-A. **Biochemical medicine**, v.26, p.20-27, 1981.

GU, M.; GASH, M.T.; MANN, V.M.; JAVOY-AGID, F.; COOPER, J.M.; SCHAPIRA, A.H. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. **Annals of Neurology**, v.39, p.385-389, 1996.

GÜLÇİN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life Sciences**, v.78, p.803-811, 2006.

HALLIWELL, B.; 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, p.231-55, 2004.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v.97, p.1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (Eds): **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 1999a.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Antioxidant defences. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (Eds): **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 1999b.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press, 2007.

HARTING, I.; SEITZ, A.; GEB, S.; ZWICKLER, T.; PORTO, L.; LINDNER, M.; KÖLKER, S.; HÖRSTER, F. Looking beyond the basal ganglia: the spectrum of MRI changes in methylmalonic acidaemia. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.31, p. 368-78, 2008.

HOFFMANN, G.F.; MEIER-AUGENSTEIN, W.; STÖCKLER, S.; SURTEES, R.; RATING, D.; NYHAN, W.L. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.16, p. 648-669, 1993.

HOFFMANN, G.F. Selective screening for inborn errors of metabolism--past, present and future. **European journal of pediatrics**, v.153, p.2-8, 1994.

HOPPEL, C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. **American journal of kidney diseases**, v.41, p.S4-12, 2003.

INDO, H.P.; DAVIDSON, M.; YEN, H.C.; SUENAGA, S.; TOMITA, K.; NISHII, T.; HIGUCHI, M.; KOGA, Y.; OZAWA, T.; MAJIMA, H.J. Evidence of ROS generation

by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. **Mitochondrion**, v.7, p.106-118, 2007.

KIENZLE HAGEN, M.E.; PEDERZOLLI, C.D.; SGARAVATTI, A.M.; BRIDI, R.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.; WYSE, A.T.; DUTRA-FILHO, C.S. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1586, p.344-352, 2002.

KLAUNIG, J.E.; WANG, Z.; PU, X.; ZHOU, S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, p. 86-89, 2011.

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, p.57-67, 2005.

LAW, N.M.; BHARUCHA, A.E.; UNDALE, A.S.; ZINSMEISTER, A.R. Cholinergic stimulation enhances colonic motor activity, transit, and sensation in humans. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, p. G1228-37, 2001.

LEHNERT, W.; SPERL, W.; SUORMALA, T.; BAUMGARTNER, E.R. Propionic acidemia: clinical, biochemical and therapeutic aspects. Experience in 30 patients. **European Journal of Pediatrics**, v.153, p.68-80, 1994.

LEIPNITZ, G.; SEMINOTTI, B.; HAUBRICH, J.; DALCIN, M.B.; DALCIN, K.B.; SOLANO, A.; DE BORTOLI, G.; ROSA, R.B.; AMARAL, A.U.; DUTRA-FILHO, C.S.; LATINI, A.; WAJNER, M. Evidence that 3-hydroxy-3-methylglutaric acid promotes lipid and protein oxidative damage and reduces the nonenzymatic antioxidant defenses in rat cerebral cortex. **Journal of Neuroscience Research**, v.86, p.683-693, 2008a.

LEIPNITZ, G.; SEMINOTTI, B.; AMARAL, A.U.; DE BORTOLI, G.; SOLANO, A.; SCHUCK, P.F.; WYSE, A.T.; WANNMACHER, C.M.; LATINI, A.; WAJNER, M. Induction of oxidative stress by the metabolites accumulating in 3-methylglutaconic aciduria in cerebral cortex of young rats. **Life Sciences**, v.82, p.652-662, 2008b.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v.186, p.464-478, 1990.

LIU, D.; WEN, J.; LIU, J.; LI, L. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. **FASEB Journal**, v.13, p. 2318-2328, 1999.

LOVELL, M.A.; XIE, C.; MARKESBERY, W.R. Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. **Brain Research**, v.855, p.116-123, 2000.

MACK, A.; ROBITZKI, A. The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study. **Progress in Neurobiology**, v.60, p.607-628, 2000.

MAIESE, K.; MORHAN, S.D.; CHONG, Z.Z. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Current Neurovascular Research**, v.4, p.63-71, 2007.

MALFATTI, C.R.; ROYES, L.F.; FRANCESCATO, L.; SANABRIA, E.R.; RUBIN, M.A.; CAVALHEIRO, E.A.; MELLO, C.F. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na⁺,K⁺-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. **Epilepsia**, v.44, p.761-767, 2003.

MANOLI, I.; VENDITTI, C.P. Methylmalonic Acidemia. In: PAGON, R.A.; BIRD, T.D.; DOLAN, C.R.; STEPHENS, K. (Eds): **GeneReviews**. Seattle: University of Washington, 2010.

MARISCO PDA, C.; RIBEIRO, M.C.; BONINI, J.S.; LIMA, T.T.; MANN, K.C.; BRENNER, G.M.; DUTRA-FILHO, C.S.; MELLO, C.F. Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. **Experimental Neurology**, v.182, p.455-460, 2003.

MASSOULIÉ, J.; SUSSMAN, J.; BON, S.; SILMAN, I. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Progress in Brain Research**, v.98, p.139-146, 1993.

MASSOULIÉ, J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. **Neurosignals**, v.11, p.130-143, 2002.

MATÉS, J.M.; PEREZ-GÓMES, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v.32, p.5595-5603, 1999.

MATTÉ, C.; STEFANELLO, F.M.; MACKEDANZ, V.; PEDERZOLLI, C.D.; LAMERS, M.L.; DUTRA-FILHO, C.S.; DOS SANTOS, M.F.; WYSE, A.T. Homocysteine induces oxidative stress, inflammatory infiltration, fibrosis and reduces glycogen/glycoprotein content in liver of rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.27, p.337-344, 2009.

MC GUIRE, P.J.; PARIKH, A.; DIAZ, G.A. Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.98, p.173-180, 2009.

MCLAUGHLIN, B.A.; NELSON, D.; SILVER, I.A.; ERECINSKA, M.; CHESSELET, M.F. Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. **Neuroscience**, v.86, p.279-290, 1998.

MELO, D.R.; KOWALTOWSKI, A.J.; WAJNER, M.; CASTILHO, R.F. Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, p. 39-46, 2011.

MENDEL, B.; RUDNEY, H. Studies on cholinesterase: 1. Cholinesterase and pseudo-cholinesterase. **The Biochemical Journal**, v.37, p.59-63, 1943.

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E.G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v.110, p.627-639, 2002.

MEHTA, S.L.; LI, P.A. Neuroprotective role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cerebral stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v.29, p. 1069-78, 2009.

MORATH, M.A.; OKUN, J.G.; MÜLLER, I.B.; SAUER, S.W.; HÖRSTER, F.; HOFFMANN, G.F.; KÖLKER, S. Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria--a pathophysiological approach. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.31, p.35-43, 2008.

MOYANO, D.; VILASECA, M.A.; PINEDA, M.; CAMPISTOL, J.; VERNET, A.; PÓO, P.; ARTUCH, R.; SIERRA, C. Tocopherol in inborn errors of intermediary metabolism. **Clinica Chimica Acta**, v.263, p.147-55, 1997.

MUELER, R.R.; YOUNG, I.D. Biochemical genetics. In: **Emery's Elements of Medical Genetics**, 9th ed. New York: Churchill, Livingstone, 1995.

MURPHY, G.E.; LOWEKAMP, B.C.; ZERFAS, P.M.; CHANDLER, R.J.; NARASIMHA, R.; VENDITTI, C.P.; SUBRAMANIAM, S. Ion-abrasion scanning electron microscopy reveals distorted liver mitochondrial morphology in murine methylmalonic acidemia. **Journal of Structural Biology**, v.171, p.125-132, 2010.

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, p.84-92, 2006.

NAKAO, S.; MORIYA, Y.; FURUYAMA, S.; NIEDERMAN, R.; SUGIYA, H. Propionic acid stimulates superoxide generation in human neutrophils. **Cell Biology International**, v.22, p.331-337, 1998.

NHAM, S.U.; WILKEMEYER, M.F.; LEDLEY, F.D. Structure of the human methylmalonyl-CoA mutase (MUT) locus. **Genomics**, v.8, p.710-716, 1990.

NOUROOZ-ZADEH, J.; LIU, E.H.; YHLEN, B.; ANGGÅRD, E.E.; HALLIWELL, B. F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. **Jouranl of Neurochemistry**, v.72, p.734-740, 1999.

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

OBERHOLZER, V.G.; LEVIN, B.; BURGESS, E.A.; YOUNG, W.F. Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. **Archives of Disease in Childhood**, v.42, p.492-504, 1967.

OGIER, H.; CHARPENTIER, C.; SAUDUBRAY, J.M. Organic acidemias. In: FERNANDES, J.; SAUDUBRAY, J.M.; TADA, K. (Eds.): **Inborn Metabolic Diseases – Diagnosis and Treatment**. 1st ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 1990.

OGIER DE BAULNY, H.; SAUDUBRAY, J.M. Branched-chain organic acidurias. **Seminars in Neonatology**, v.7, p.65-74, 2002.

OKUN, J.G.; HÖRSTER, F.; FARKAS, L.M.; FEYH, P.; HINZ, A.; SAUER, S.; HOFFMANN, G.F.; UNSICKER, K.; MAYATEPEK, E.; KÖLKER, S. Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.14674-14680, 2002.

OMU, A.E.; AL-AZEMI, M.K.; OMU, F.E.; FATINIKUN, T.; ABRAHAM, S.; GEORGE, S.; MAHNAZHATH, N. Butyrylcholinesterase activity in women with diabetes mellitus in pregnancy: correlation with antioxidant activity. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.30, p.122-126, 2010.

PERRY, G.; TADDEO, M.A.; PETERSEN, R.B.; CASTELLANI, R.J.; HARRIS, P.L.; SIEDLAK, S.L.; CASH, A.D.; LIU, Q.; NUNOMURA, A.; ATWOOD, C.S.; SMITH, M.A. Adventiously-bound redox active iron and copper are at the center of oxidative damage in Alzheimer disease. **Biometals**, v.16, p.77-81, 2003.

PETTENUZZO, L.F.; SCHUCK, P.F.; FONTELLA, F.; WANNMACHER, C.M.; WYSE, A.T.; DUTRA-FILHO, C.S.; NETTO, C.A.; WAJNER, M. Ascorbic acid prevents cognitive deficits caused by chronic administration of propionic acid to rats in the water maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.73, p.623-629, 2002.

PETTENUZZO, L.F.; SCHUCK, P.F.; WYSE, A.T.; WANNMACHER, C.M.; DUTRA-FILHO, C.S.; NETTO, C.A.; WAJNER, M. Ascorbic acid prevents water

maze behavioral deficits caused by early postnatal methylmalonic acid administration in the rat. **Brain Research**, v.976, p.234-242, 2003.

PETTENUZZO, L.F.; FERREIRA, G. DA C.; SCHMIDT, A.L.; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T.; WAJNER, M. Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complex activities in rat tissues. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.24, p.45-52, 2006.

PINAR-SUEIRO, S.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, R.; LAGE-MEDINA, S.; ALDAMIZ-ECHEVARRIA, L.; VECINO, E. Optic neuropathy in methylmalonic acidemia: the role of neuroprotection. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 2010 in press.

PRYOR, W.A.; JIN, X.; SQUADRITO, G.L. One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.91, p.11173-11177, 1994.

PRZEDBORSKI, S.; DONALDSON, D.; JAKOWEC, M.; KISH, S.J.; GUTTMAN, M.; ROSOKLIJA, G.; HAYS, A.P. Brain superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in amyotrophic lateral sclerosis. **Annals of Neurology**, v.39, p.158-165, 1996.

RAJASEKAR, P.; KAVIARASAN, S.; ANURADHA, C.V. L-carnitine administration prevents oxidative stress in high fructose-fed insulin resistant rats. **Diab Croat.**, v.34, p.21–28, 2005.

RANI, P.J.; PANNEERSELVAM, C. Effect of L-carnitine on brain lipid peroxidation and antioxidant enzymes in old rats. **The journals of gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v.57, p.B134-137, 2002.

REQUEJO, R.; CHOUCANI, E.T.; HURD, T.R.; MENGER, K.E.; HAMPTON, M.B.; MURPHY, M.P. Measuring mitochondrial protein thiol redox state. **Methods in Enzymology**, v.474, p.123-47, 2010.

REZNICK, A.Z.; KAGAN, V.E.; RAMSEY, R.; TSUCHIYA, M.; KHWAJA, S.; SERBINOVA, E.A.; PACKER, L. Antiradical effects in L-propionyl carnitine protection of the heart against ischemia-reperfusion injury: the possible role of iron chelation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.296, p.394-401, 1992.

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: Pilo, G.; Albano, E.; Dianzani, M.U. (Eds.): **Free Radicals: from Basic Science to Medicine**. 1st ed. Switzerland: Birkhäuser-Verlag Basic, 1993.

RIBEIRO, M.C.; DE AVILA, D.S.; SCHNEIDER, C.Y.; HERMES, F.S.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; RUBIN, M.A.; LEHMANN, M.; KRIEGLSTEIN, J.; MELLO, C.F. Alpha-Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. **Epilepsy Research**, v.66, p.185-194, 2005.

RIBEIRO, L.R.; FIGHERA, M.R.; OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; RAMBO, L.M.; FERREIRA, A.P.; SARAIVA, A.L.; SOUZA, M.A.; LIMA, F.D.; MAGNI, D.V.; DEZENGRINI, R.; FLORES, E.F.; BUTTERFIELD, D.A.; FERREIRA, J.; DOS SANTOS, A.R.; MELLO, C.F.; ROYES, L.F. Methylmalonate-induced seizures are attenuated in inducible nitric oxide synthase knockout mice. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.27, p.157-163, 2009.

RICHARD, E.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; PÉREZ, B.; DESVIAT, L.R.; UGARTE, M. Methylmalonic acidaemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway. **The Journal of Pathology**, v.213, p.453-461, 2007.

RIGO, F.K.; PASQUETTI, L.; Malfatti, C.R.; FIGHERA, M.R.; COELHO, R.C.; PETRI, C.Z.; MELLO C.F. Propionic acid induces convulsions and protein carbonylation in rats. **Neuroscience Letters**, v.408, p.151-154, 2006.

ROYES, L.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; DA SILVA, L.G.; Malfatti, C.R.; SCHNEIDER, P.H.; BRAGA, A.L.; Wajner, M.; MELLO, C.F. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience**, v.118, p.1079-1090, 2003.

ROYES, L.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; FIORENZA, N.G.; DE CARVALHO MYSKIW, J.; FRUSSA-FILHO, R.; MELLO, C.F. Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience Letters**, v.376, p.116-120, 2005.

ROYES, L.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; MYSKIW, J. DE C.; FIORENZA, N.G.; PETRY, J.C.; COELHO, R.C.; MELLO, C.F. Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.83, p.136-144, 2006.

SAAD, L.O.; MIRANDOLA, S.R.; MACIEL, E.N.; CASTILHO, R.F. Lactate dehydrogenase activity is inhibited by methylmalonate in vitro. **Neurochemical Research**, v.31, p.541-548, 2006.

SALVADOR, H.; HENRIQUES, J.A.P. **Radicais Livres e a Resposta Celular ao Estresse Oxidativo**. 1ª ed. Canoas: Editora da Ulbra, 2004.

SASS, J.O.; HOFMANN, M.; SKLADAL, D.; MAYATEPEK, E.; SCHWAHN, B.; SPERL, W. Propionic acidemia revisited: a workshop report. **Clinical Pediatrics**, v.43, p.837-843, 2004.

SAUDUBRAY, J.M.; CHARPENTIER, C. Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (Eds.): **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

SAUDUBRAY, J.M.; SEDEL, F.; WALTER, J.H. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.29, p.261-74, 2006.

SCHALLREUTER, K.U.; GIBBONS, N.C.; ZOTHNER, C.; ELWARY, S.M.; ROKOS, H.; WOOD, J.M. Butyrylcholinesterase is present in the human epidermis and is regulated by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.349, p.931-938, 2006.

SCHUCK, P.F.; ROSA, R.B.; PETTENUZZO, L.F.; SITTA, A.; WANNMACHER, C.M.; WYSE, A.T.; WAJNER, M. Inhibition of mitochondrial creatine kinase activity from rat cerebral cortex by methylmalonic acid. **Neurochemistry International**, v.45, p.661-7, 2004.

SCHWAB, M.A.; SAUER, S.W.; OKUN, J.G.; NIJTMANS, L.G.; RODENBURG, R.J.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; DRÖSE, S.; BRANDT, U.; HOFFMANN, G.F.; TER LAAK, H.; KÖLKER, S.; SMEITINK, J.A. Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. **The Biochemical Journal**, v.398, p.107-12, 2006.

SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

SGARAVATTI, A.M.; VARGAS, B.A.; ZANDONÁ, B.R.; DECKMANN, K.B.; ROCKENBACH, F.J.; MORAES, T.B.; MONSERRAT, J.M.; SGARBI, M.B.; PEDERZOLLI, C.D.; WYSE, A.T.; WANNMACHER, C.M.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. Tyrosine promotes oxidative stress in cerebral cortex of young rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.26, p.551-559, 2008.

SGARAVATTI, A.M.; MAGNUSSON, A.S.; DE OLIVEIRA, A.S.; ROSA, A.P.; MESCKA, C.P.; ZANIN, F.R.; PEDERZOLLI, C.D.; WYSE, A.T.; WANNMACHER, C.M.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. Tyrosine administration decreases glutathione and stimulates lipid and protein oxidation in rat cerebral cortex. **Metabolic Brain Disease**, v.24, p.415-425, 2009.

SINGH, N.; MCCOY, M.; TICE, R.; SCHNEIDER, E. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

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, p.68-73, 2005.

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, p.287-296, 2006.

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, p.211-218, 2009a.

SITTA, A.; MANFREDINI, V.; BIASI, L.; TREMÉA, R.; SCHWARTZ, I.V.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. **Mutation Research**, v.679, p.6-13, 2009b.

SOLANO, A.F.; LEIPNITZ, G.; DE BORTOLI, G.M.; SEMINOTTI, B.; AMARAL, A.U.; FERNANDES, C.G.; LATINI, A.S.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M. Induction of oxidative stress by the metabolites accumulating in isovaleric acidemia in brain cortex of young rats. **Free Radical Research**, v.42, p.707-715, 2008.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). **Mutagenesis**, v.10, p.555–559, 1995.

STEDMAN, E.; STEDMAN, E.; EASSON, L.H. Choline-esterase. An enzyme present in the blood-serum of the horse. **The Biochemical Journal**, v.26, p.2056-2066, 1932.

STEFANELLO, F.M.; FRANZON, R.; TAGLIARI, B.; WANNMACHER, C.; WAJNER, M.; WYSE, A.T. Reduction of butyrylcholinesterase activity in rat serum subjected to hyperhomocysteinemia. **Metab Brain Disease**, v.20, p.97-103, 2005.

TASTEKIN, N.; AYDOGDU, N.; DOKMECI, D.; USTA, U.; BIRTANE, M.; ERBAS, H.; TURE, M. Protective effects of L-carnitine and alpha-lipoic acid in rats with adjuvant arthritis. **Pharmacological Research**, v.56, p.303-310, 2007.

THANGASAMY, T.; JEYAKUMAR, P.; SITTADJODY, S.; JOYEE, A.G.; CHINNAKANNU, P. L-carnitine mediates protection against DNA damage in lymphocytes of aged rats. **Biogerontology**, v.10, p.163-172, 2009.

THOMAS, E. A study of the response to protein-modified diets for propionic acidemia in twelve patients. **Brain & Development**, v.16, p.58-63, 1994.

THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, v.16, p.716-718, 2000.

TICE, R.R.; STRAUSS, G.H. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. **Stem Cells**, v.13, p. 207-214, 1995.

TOYOSHIMA, S.; WATANABE, F.; SAIDO, H.; MIYATAKE, K.; NAKANO, Y. Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. **The Journal of Nutrition**, v.125, p.2846-2850, 1995.

TREACY, E.; ARBOUR, L.; CHESSEX, P.; GRAHAM, G.; KASPRZAK, L.; CASEY, K.; BELL, L.; MAMER, O.; SCRIVER, C.R. Glutathione deficiency as a complication of methylmalonic acidemia: response to high doses of ascorbate. **The Journal of Pediatrics**, v. 129, p. 445-8, 1996.

TRINH, B.C.; MELHEM, E.R.; BARKER, P.B. Multi-slice proton MR spectroscopy and diffusion-weighted imaging in methylmalonic acidemia: report of two cases and review of the literature. **American Journal of Neuroradiology**, v.22, p.831-833, 2001.

VALENTINI, J.; VICENTINI, J.; GROTTA, D.; TONELLO, R.; GARCIA, S.C.; BARBOSA, F.JR. Sub-chronic exposure to methylmercury at low levels decreases butyrylcholinesterase activity in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.106, p.95-99, 2010.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human

disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

VAN GOSEN, L. Organic acidemias: a methylmalonic and propionic focus. **Journal of pediatric nursing**, v.23, p.225-233, 2008.

VANELLA, A.; RUSSO, A.; ACQUAVIVA, R.; CAMPISI, A.; DI GIACOMO, C.; SORRENTI, V.; BARCELLONA, M.L. L -propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. **Cell Biology and Toxicology**, v.16, p. 99-104, 2000.

VASQUES, V.; BRINCO, F.; VIEGAS, C.M.; WAJNER, M. Creatine prevents behavioral alterations caused by methylmalonic acid administration into the hippocampus of rats in the open field task. **Journal of the Neurological Sciences**, v.244, p.23-29, 2006.

VIRMANI, A.; BINIENDA, Z. Role of carnitine esters in brain neuropathology. **Molecular Aspects of Medicine**, v.25, p.533-549, 2004.

WABER, L. Inborn errors of metabolism. **Pediatric Annals**, v.19, p.115-118, 1990.

WAJNER, M.; DUTRA, J.C.; CARDOSO, S.E.; WANNMACHER, C.M.; MOTTA, E.R. Effect of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.15, p.92-96, 1992.

WAJNER, M.; COELHO, J.C. Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.20, p.761-768, 1997.

WAJNER, M.; LATINI, A.; WYSE, A.T.; DUTRA-FILHO, C.S. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.27, p.427-448, 2004.

WAJNER, M.; COELHO, D. DE M.; INGRASSIA, R.; DE OLIVEIRA, A.B.; BUSANELLO, E.N.; RAYMOND, K.; FLORES PIRES, R.; DE SOUZA, C.F.; GIUGLIANI, R.; VARGAS, C.R. Selective screening for organic acidemias by urine organic acid GC-MS analysis in Brazil: fifteen-year experience. **Clinica Chimica Acta**, v. 400, p.77-81, 2009.

WALTER, J.H. L-carnitine in inborn errors of metabolism: what is the evidence? **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.26, p.181-188, 2003.

WORGAN, L.C.; NILES, K.; TIRONE, J.C.; HOFMANN, A.; VERNER, A.; SAMMAK, A.; KUCIC, T.; LEPAGE, P.; ROSENBLATT, D.S. Spectrum of mutations in mut methylmalonic acidemia and identification of a common Hispanic mutation and haplotype. **Human Mutation**, v.27, p.31-43, 2006.

WYSE, A.T.; BRUSQUE, A.M.; SILVA, C.G.; STRECK, E.L.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. **Neuroreport**, v.9, p.1719-1721, 1998.

WYSE, A.T.; STRECK, E.L.; BARROS, S.V.; BRUSQUE, A.M.; ZUGNO, A.I.; WAJNER, M. Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. **Neuroreport**, v.11, p.2331-2334, 2000.

WYSE, A.T.; STEFANELLO, F.M.; CHIARANI, F.; DELWING, D.; WANNMACHER, C.M.; WAJNER, M. Arginine administration decreases cerebral cortex acetylcholinesterase and serum butyrylcholinesterase probably by oxidative stress induction. **Neurochemical Research**, v.29, p.385-389, 2004.

ANEXO 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 08-449

Versão do Projeto: 10/10/2008

Versão do TCLE: 23/10/2008

Pesquisadores:

CARMEN REGLA VARGAS

GRAZIELA DE OLIVEIRA SCHMITT

CAMILA SIMIONI VANZIN

GIOVANA BRONDANI BIANCINI

ANGELA SITTA

DANIELLA DE MOURA COELHO

MOACIR WAJNER

Título: AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM L-CARNITINA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE DESORDENS DO METABOLISMO DO PROPIONATO

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 23 de outubro de 2008.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Vimos através deste convidar você a participar do projeto de pesquisa cujo objetivo é avaliar a ação de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitamina A, vitamina C, vitamina E) em doenças genéticas denominadas acidemias propiônica e metilmalônica. Caso deseje participar, amostras de sangue e urina coletadas para os testes de triagem, solicitados pelo seu médico, serão utilizadas após avaliação de seus dados clínico-laboratoriais e dos resultados dos exames. Os indivíduos que tiverem o diagnóstico confirmado para estas doenças genéticas, por estes resultados, serão incluídos no grupo caso (pacientes). Os indivíduos cujos resultados excluírem o diagnóstico destas doenças serão incluídos no grupo controle.

O desconforto causado será somente o de uma coleta de sangue, o que pode, ocasionalmente, levar ao aparecimento de um hematoma (mancha roxa na pele). Os dados advindos com a sua doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novos tratamentos para essas doenças, bem como para o melhor entendimento dessas patologias. O material coletado será única e exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa.

As informações individuais levantadas pela pesquisa são confidenciais. Os resultados obtidos serão agrupados e expressos através de resultados numéricos, sem qualquer referência a elementos que possam identificar as pessoas que participaram do estudo.

Todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio Projeto de Pesquisa, completamente gratuitas para o paciente.

Caso você queira se retirar em definitivo da pesquisa, terá total liberdade para fazê-lo, sem que isso prejudique a futuros atendimentos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O seu material (sangue e urina) coletado será destruído e os seus dados excluídos do nosso banco de dados.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo estão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa. Telefones de contato: 2101.8011 (Pesquisador Responsável Profa. Dra. Carmen Regla Vargas).

Rubrica e data:

G P P G - Recebido

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
23/10/2008
ml 08449

23 OUT. 2008
Por Fabi 08449

Pela presente, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.

Data: _____

Nome: _____

Assinatura (do paciente ou responsável legal): _____

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Carmen Regla Vargas (SGM/HCPA – fone: 21018011)

Assinatura do pesquisador: _____

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
23/10/2008
MK 08449

ANEXO 2 – Autorização da editora para publicação do artigo na tese

[anterior](#) | [próxima](#) | [Voltar para as mensagens](#)

[Marcar como não lida](#) |  [Imprimir](#)

Apagar Responder ▾ Encaminhar Spam Mover... ▾

RE: authorization

Segunda-feira, 19 de Dezembro de 2011 6:03

De: "Vladimír Štrbák" <vladimir.strbak@savba.sk> 

Para: "Graziela Ribas" <grazielaribas@yahoo.com.br>

To whom it may concern:
This is to confirm that paper

Graziela Schmitt Ribas; Giovana Biancini; Caroline Mescka; Carlos Wayhs; Angela Sitta; Moacir Wajner; Carmen Regla Vargas:
Oxidative stress parameters in urine from patients with disorders of propionate metabolism: a beneficial effect of L-carnitine supplementation

has been accepted for publication in Cellular and Molecular Neurobiology (manuscript 1031). It could be used as part of doctorate thesis of Dr. Graziela Ribas provided appropriate reference is given.

With regards

Vladimír Štrbák
Associate Editor
Cellular and Molecular Neurobiology

Institute of Experimental Endocrinology,
Slovak Academy of Sciences

Head
Department of Pathological Physiology
Medical Faculty
Slovak Medical University
Bratislava, Slovakia

ANEXO 3 - Autorização da editora para publicação do artigo na tese

[anterior](#) | [próxima](#) | [Voltar para as mensagens](#)

[Marcar como não lida](#) | [Imprimir](#)

Apagar Responder ▾ Encaminhar Spam Mover... ▾

Re: Enquiry: authorization

Sábado, 17 de Dezembro de 2011 12:01

De: "Wacek, Bart (ELS-CMA)" <B.Wacek@elsevier.com>

Para: "djosephy@uoguelph.ca" <djosephy@uoguelph.ca>, "grazielaribas@yahoo.com.br" <grazielaribas@yahoo.com.br>

That is correct. As an author you retain the rights to use it for a thesis or dissertation.

----- Original Message -----

From: David Josephy [mailto:djosephy@uoguelph.ca]

Sent: Friday, December 16, 2011 08:24 PM

To: Graziela Ribas <grazielaribas@yahoo.com.br>

Cc: Wacek, Bart (ELS-CMA)

Subject: Enquiry: authorization

Dear Ms Ribas,

From my point of view, that seems entirely appropriate.

I am copying this to the publisher's representative, at Elsevier, to confirm that it is OK.

Sincerely,

David Josephy
Editor

----- Original Message -----

> The following enquiry was sent via the Elsevier website:

>

> -- Sender --

• First Name: Graziela

• Last Name: Ribas

• Email: grazielaribas@yahoo.com.br

>

> -- Message --

• Dear Dr. P. D. Josephy,

>

• I'd like to ask you if my paper titled "Prevention by L-carnitine of
• DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human
• peripheral leukocytes in vitro." published in your journal (Ribas et
• al., 2010; 702(1):123-8) can be part of my doctorate thesis.

>

• Thank you for your attention,

>

• Graziela Ribas

>