

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

*Efeitos in vitro do ácido pipercolico sobre parâmetros de estresse oxidativo
e a possível prevenção pelo ácido lipoico em córtex cerebral de ratos*

GIOVANA RECHE DALAZEN

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2014.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

*Efeitos in vitro do ácido pipercolico sobre parâmetros de estresse oxidativo
e a possível prevenção pelo ácido lipoico em córtex cerebral de ratos*

GIOVANA RECHE DALAZEN

Orientador: Dr. Carlos Severo Dutra-Filho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre na Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais Marcos e Brenda,
os alicerces da minha vida e do meu caráter.

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve. E a vida é muito curta para ser insignificante."

Charles Chaplin

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por me abençoar em todos os momentos da minha vida, por iluminar sempre os meus caminhos, por ser meu refúgio e minha fonte de segurança.

Aos meus pais Marcos e Brenda, meu porto seguro. Obrigada pelo amor, pelo carinho, pela confiança depositada em mim e por acreditarem na minha capacidade de seguir adiante. Obrigada por estarem ao meu lado em mais uma conquista! Amo muito vocês!

Ao meu irmão, Marcos Vinícius, à minha cunhada Geiza e a todos os meus familiares pelo apoio, amizade, carinho e por estarem sempre de bem com a vida me fazendo rir nos momentos mais difíceis. Amo vocês!

Ao Jony, meu companheiro e amigo, obrigada por compreender as horas de estudos, trabalhos e a minha ausência em alguns momentos. Te amo!

Às minhas colegas de apê Carol e Isa, pelo companheirismo e pela amizade!

Às minhas amigas Jamila, Valeska, Franciane, Aline, Débora e Paula, minha família aqui em Porto Alegre, pela amizade, risadas, jantas, pelos conselhos. Obrigada por vocês fazerem parte da minha vida!

Ao Dutra, meu orientador querido, pela paciência, amizade, incentivo, por estar sempre disposto a esclarecer minhas dúvidas e por orientar tão bem este trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório 34 D Melaine, Juliana, Carlos, Raylane e Priscila, sem vocês esse trabalho não teria sido possível! Vocês fazem parte da minha vida e vou sentir muitas saudades!

Aos colegas pós-graduandos do laboratório Tarsila, Caroline e Andrea e aos alunos de iniciação científica Julia, Fernanda, Laila e Gabriel. Obrigada!

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Bioquímica, por fornecerem as condições para a realização deste trabalho, e aos professores e funcionários da instituição (secretaria, portaria e biotério) pela estrutura e suporte necessários.

Índice

Parte I

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
INTRODUÇÃO	12
1. Metabolismo da lisina.....	12
1.1. Via da sacaropina.....	13
1.2. Via do ácido pipercolico.....	14
2. Hiperpipercolatemias.....	15
2.1. Desordens da Biogênese dos Peroxissomas.....	15
2.2. Hiperlisinemia.....	16
2.3. Epilepsia piridoxina-dependente.....	17
3. Radicais Livres.....	18
4. Sistemas de Defesa Antioxidante.....	19
5. Estresse Oxidativo.....	21
5.1 Estresse Oxidativo e Ácido Pipercolico.....	22
6. Ácido Lipoico.....	23
OBJETIVOS	25
Objetivo Geral.....	25
Objetivos Específicos.....	25

Parte II

Artigo aceito – Pipercolic acid induces oxidative stress in vitro in cerebral cortex of young rats and the protective role of lipoic acid.....	27
---	----

Parte III

DISCUSSÃO	58
CONCLUSÃO.....	64
PERSPECTIVAS.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXO I – <i>Lista de figuras</i>	83
ANEXO II - <i>Parecer da Comissão de Ética na Utilização de Animais</i>	84
ANEXO III – <i>Considerações éticas e tratamento dos resíduos biológicos e químicos</i> . 85	

Parte I

RESUMO

Os níveis de ácido pipercolico (AP) estão elevados em desordens metabólicas severas do sistema nervoso central como na Síndrome de Zellweger, Doença de Refsum Infantil, Adrenoleucodistrofia neonatal e Hiperlisinemia. Os indivíduos afetados apresentam disfunção neurológica progressiva, hipotonia e retardo no crescimento. Os mecanismos de dano cerebral nestas desordens ainda permanecem pouco compreendidos. Uma vez que o catabolismo do AP pode produzir H_2O_2 através de oxidases, o estresse oxidativo pode ser um possível mecanismo envolvido na fisiopatologia dessas doenças. O ácido lipoico (AL) é considerado um eficiente antioxidante e tem sido sugerido em estudos para o tratamento e prevenção do estresse oxidativo em vários modelos experimentais de desordens do sistema neurológico. Considerando que, para o nosso conhecimento, nenhum estudo investigou o papel do AP sobre o estresse oxidativo, no presente trabalho foram investigados os efeitos *in vitro* do AP em alguns parâmetros de estresse oxidativo e avaliada a eficácia do AL contra possíveis efeitos pró-oxidantes do AP em córtex cerebral de ratos de 14 dias de vida. Os sobrenadantes de córtex cerebral foram incubados por 1 h a 37°C na presença de AP ou AL e os controles foram incubados somente com o meio que era constituído de tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 140 mM de KCl, pH 7,4. As concentrações finais de AP no meio foram de 0,1, 0,25, 0,5 e 1,0 mM. O AL foi incubado sozinho na concentração de 0,1 mM e na presença de AP (1 mM). Alíquotas foram utilizadas para as medidas imediatamente após a incubação. As atividades da catalase, glutathione peroxidase, glicose 6-fosfato desidrogenase e glutathione S-transferase juntamente com o conteúdo de glutathione reduzida (GSH) foram significativamente reduzidas, enquanto a atividade da superóxido dismutase e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foram significativamente aumentadas pelo AP. O AL foi capaz de prevenir esses efeitos melhorando a atividade das enzimas antioxidantes, aumentando o conteúdo de GSH e reduzindo os níveis de TBA-RS. Em contraste, as atividades da glutathione redutase e 6-fosfogluconato desidrogenase e o conteúdo de sulfidrilas não foram alterados. Tomados em conjunto, pode-se presumir que o AP *in vitro* induz estresse oxidativo e o AL é capaz de prevenir estes efeitos.

Palavras-chave: ácido pipercolico, estresse oxidativo, ácido lipoico, antioxidante.

ABSTRACT

Pipecolic acid (PA) levels are increased in severe metabolic disorders of the central nervous system such as Zellweger syndrome, infantile Refsum disease, neonatal adrenoleukodystrophy and hyperlysinemia. Affected individuals present progressive neurological dysfunction, hypotonia and growth retardation. The mechanisms of brain damage in these disorders remain poorly understood. Since PA catabolism produces H_2O_2 by oxidases, oxidative stress may be a possible mechanism involved in the pathophysiology of these diseases. Lipoic acid (LA) is considered an efficient antioxidant and has been suggested in studies for the treatment and prevention of oxidative stress in experimental models of many disorders of the neurologic system. Considering that, to our knowledge, no study has investigated the role of PA on oxidative stress, in the present work we investigated the *in vitro* effects of PA on some oxidative stress parameters and evaluated the LA efficacy against possible pro-oxidant effects of PA in cerebral cortex of 14 day-old rats. Cerebral cortex supernatants were incubated for 1 h at 37°C in the presence of PA or LA, and controls were incubated with medium only consisting of 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 and 140 mM KCl. The final concentrations of PA in the medium were 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 mM. The LA was incubated alone at a concentration of 0.1 mM and in the presence of PA (1mM). Aliquots were used for the measurements immediately after the incubation. The activities of catalase, glutathione peroxidase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, and glutathione S-transferase along with reduced glutathione (GSH) content were significantly decreased, while superoxide dismutase activity and thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) were significantly enhanced by PA. LA was able to prevent these effects by improving the activity of antioxidant enzymes, increasing GSH content and reducing TBA-RS. In contrast, glutathione reductase and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities and sulfhydryl content were not altered. Taken together, it may be presumed that PA *in vitro* elicits oxidative stress and LA is able to prevent these effects.

Keywords: pipecolic acid, oxidative stress, lipoic acid, antioxidant.

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$ Oxigênio singlet

AP Ácido pipecólico

AL Ácido lipoico

ATP Adenosina trifosfato

ADHL Ácido diidrolipoico

CAT Catalase

ER Espécies reativas

ERO Espécies reativas de oxigênio

GABA Ácido gama-aminobutírico

G6PD Glicose-6-fosfato desidrogenase

GR Glutaciona redutase

GSH Glutaciona reduzida

GSH-Px Glutaciona peroxidase

GSSG Glutaciona oxidada

GSTs Glutaciona S-transferases

H_2O_2 Peróxido de hidrogênio

$\text{HO}\cdot$ Hidroxila

$\text{HO}_2\cdot$ Hidroperoxila

HOCl Ácido hipocloroso

LOOH Peróxidos orgânicos

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

O_2 Oxigênio molecular

$\text{O}_2\cdot^-$ Radical ânion superóxido

O₃ Ozônio

SNC Sistema Nervoso Central

SOD Superóxido dismutase

TBA-RS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

INTRODUÇÃO

1. Metabolismo da Lisina

A lisina, um aminoácido essencial para os seres humanos, é obtida da dieta e utilizada pelo organismo para a síntese proteica ou degradada até acetil-CoA, entrando no Ciclo de Krebs e fornecendo ATP. A degradação da lisina até acetil-CoA pode ocorrer por duas vias distintas, a via da sacaropina e a via do ácido pipercolico (AP) (Figura 1).

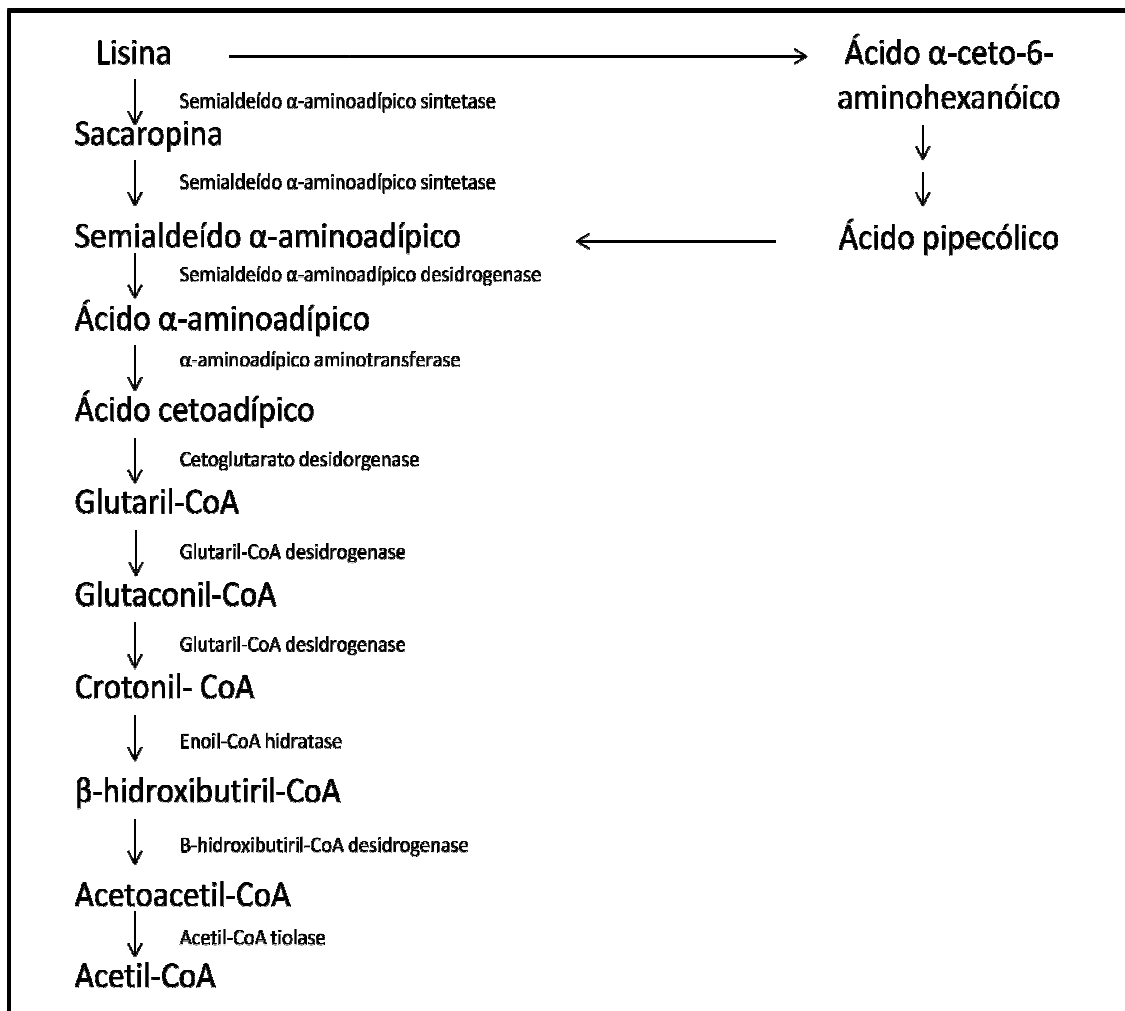


Figura 1. Metabolismo da Lisina.

1.1. Via da sacaropina

A principal via de degradação da lisina ocorre na mitocôndria através do complexo enzimático bifuncional α -aminoaldéido sintase do qual fazem parte as enzimas lisina cetogluturato redutase (E.C.1.5.1.8) e sacaropina desidrogenase (E.C.1.5.1.9). No primeiro passo, a transaminação do grupo amino para o α -cetogluturato realizada pela enzima lisina cetogluturato redutase leva ao intermediário sacaropina que, em seguida, é clivada à semialdeído α -aminoaldéido e ácido glutâmico pela enzima sacaropina desidrogenase (Figura 2). Após essa etapa, o aldeído é oxidado a ácido aminoaldéico. Passos posteriores nesta via de degradação envolvem a transaminação do grupamento amino para formação do ácido cetoaldéico e sucessivas descarboxilações para formar glutaril coenzima A (CoA) e depois crotonil CoA, que é oxidado a acetil-CoA. No Sistema Nervoso Central (SNC), entretanto, a atividade da enzima lisina cetogluturato redutase é muito baixa e, portanto, a via do AP é predominante (Wanders et al., 2001).

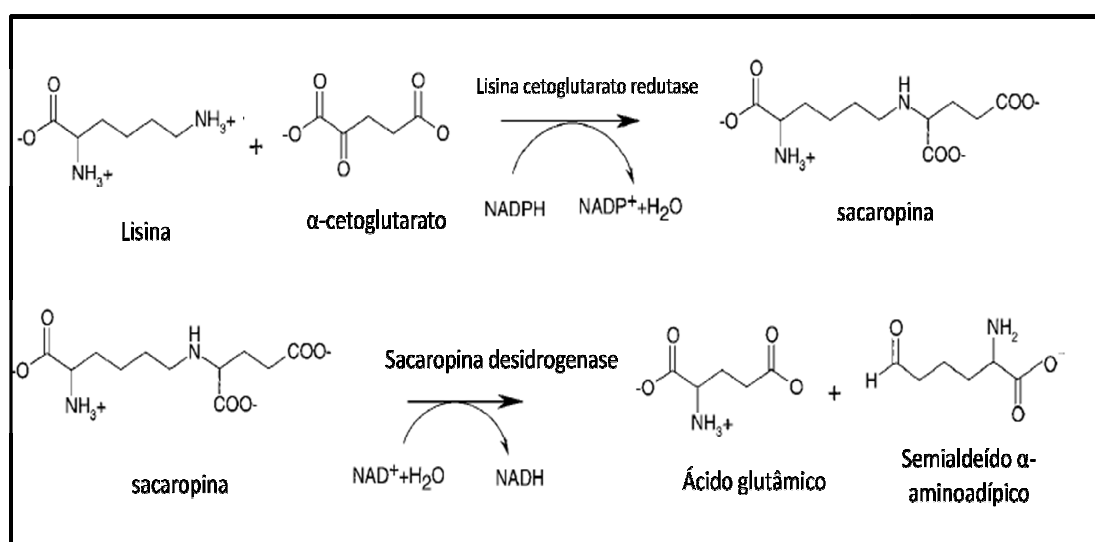


Figura 2. Via da sacaropina (Adaptado de Sacksteder et al., 2000).

1.2. Via do ácido piperólico

A lisina também pode ser degradada por uma rota alternativa nos peroxissomas. Essa via funciona quando há um excesso de L-lisina, além de ser a principal via de degradação da D-lisina. O passo inicial é a remoção do grupo amino da lisina por desaminação oxidativa. O cetoácido formado cicliza e é reduzido a AP que posteriormente é oxidado a semialdeído α -aminoadípico (Figura 3). Por reações posteriores, este aldeído é convertido a acetil-CoA que entra no Ciclo do Krebs (Cox, 2001).

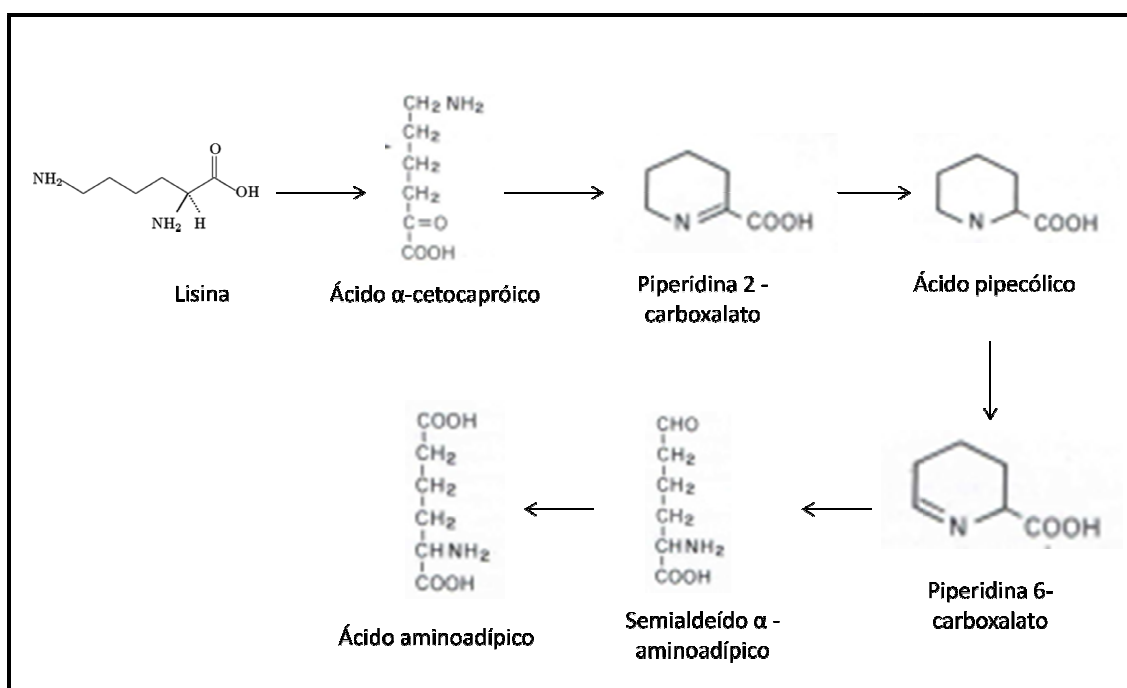


Figura 3. Via do ácido piperólico (Adaptado de Scriver e Cox 2001).

O AP é considerado o maior metabólito da lisina presente no cérebro de mamíferos e algumas ações no SNC têm sido atribuídas ao AP, pois este é considerado um modulador que facilita a transmissão GABAérgica, estimulando a liberação e inibindo a recaptação de GABA (Gutierrez et al., 1989; Inoue et al., 2011). Além disso, estudos demonstraram que o AP pode induzir a morte neuronal, pois o seu consumo

dentro da mitocôndria pode estimular a via apoptótica mitocondrial (Matsumoto et al., 2003).

2. Hiperpipecolatemias

2.1.Desordens da Biogênese dos Peroxissomas

As Desordens da Biogênese dos Peroxissomas são um grupo heterogêneo de doenças genéticas autossômicas recessivas causadas por uma deficiência na formação dos peroxissomas. Este defeito faz com que estas organelas não consigam realizar suas funções metabólicas como a β -oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa (com mais de 22 carbonos), α -oxidação do ácido fitânico e compostos similares, síntese de plasmalógenos e ácidos biliares (Lee and Raymond, 2013) e oxidação do AP (devido à deficiência na atividade da enzima peroxissomal AP oxidase) (Cox, 2001; Wanders et al., 2001). Estas desordens são caracterizadas por níveis elevados de ácidos graxos de cadeia longa (VLCFA) e AP no sangue, urina e fluido cérebro-espinhal, além de um prejuízo na síntese de ácidos biliares, colesterol e plasmalógenos (Mihalik et al., 1989; McGuinness et al., 2000; Wanders et al., 2013).

Três grupos fenotípicos amplos são descritos em um espectro de gravidade: Síndrome de Zellweger é a mais grave com prevalência mundial de 1: 50 000 a 1: 100 000 (Lee and Raymond, 2013), Adrenoleucodistrofia neonatal é intermediária e a Doença de Refsum Infantil é a menos grave (Braverman et al., 2013). Estes distúrbios são clinicamente caracterizados por comprometimento neurológico progressivo com retardo no crescimento, hipotonia grave, retardo mental e psicomotor, disfunção hepática, convulsões, anormalidades crânio-faciais, cistos renais, entre outros sintomas (Steinberg et al., 2006; Kumar et al., 2013). Relatos demonstraram que a concentração

plasmática de AP em crianças e adultos com a Síndrome de Zellweger varia de 7 a 245 μM (normal é aproximadamente 2,1 μM) (Dancis e Hutzler, 1986).

O diagnóstico para estas desordens baseia-se na medida dos níveis plasmáticos dos VLCFA. Estes resultados aumentados não implicam em uma anormalidade bioquímica específica ou mutação genética. Um valor anormal de VLCFA sugere que mais ensaios devam ser feitos, incluindo a repetição dos níveis de VLCFA e análise de outros marcadores, tais como ácido fitânico, ácido pristânico e plasmalógenos no plasma e AP e ácidos biliares em plasma ou urina (Lee and Raymond, 2013). Além disso, podem ser realizados testes em fibroblastos como os níveis de VLCFA, oxidação dos ácidos fitânico e pristânico, síntese de plasmalógenos e solubilidade da catalase (Steinberg et al., 2006).

O tratamento para estas desordens é essencialmente de suporte com administração oral de ácidos biliares e dieta pobre em ácido fitânico e pristânico, além da administração de anticonvulsivantes frente a uma convulsão e de vitamina K para melhorar possíveis transtornos hemorrágicos (Deon, 2009).

2.2.Hiperlisinemia

A Hiperlisinemia é um erro inato do metabolismo de caráter autossômico recessivo caracterizada por um aumento nas concentrações plasmáticas de lisina devido a uma mutação no gene da α -aminoadípico semialdeído sintase (Sacksteder et al., 2000; Houten et al., 2013) responsável pela degradação da lisina através das enzimas lisina cetoglutarato redutase e sacaropina desidrogenase (Seminotti et al., 2008). Com isso, o excesso de lisina entra na via do AP causando acidúria pipecólica (Dancis e Hutzler, 1986).

Os pacientes acometidos por esta doença apresentam retardo psicomotor, convulsões febris, epilepsia, atraso no desenvolvimento, espasticidade e ataxia (Tondo et al., 2013). Embora estudos tenham demonstrado que o AP está em concentrações elevadas nesta desordem (atingindo por volta de 32 μ M), a relação dele com a fisiopatologia dos pacientes acometidos pela doença ainda necessita ser elucidada (Dancis e Hutzler, 1986; Cox, 2001; Wanders et al., 2001).

A hiperlisinemia pode ser diagnosticada através da cromatografia de aminoácidos em papel ou em camada delgada (semi-quantitativo) (Ersser e Smith, 1976). Se o aminoácido estiver em concentração elevada, é aconselhável realizar sua medida quantitativa para verificar a concentração exata do aminoácido, o que pode ser feito através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Joseph e Marsden, 1986). O diagnóstico confirmatório da deficiência da enzima pode ser realizado em fibroblastos e em biópsia de tecido (Sacksteder et al., 2000). O tratamento consiste basicamente em uma dieta restrita em lisina, a fim de diminuir ou normalizar os níveis deste aminoácido (Cleveland et al., 2008).

2.3.Epilepsia piridoxina-dependente

É uma desordem hereditária autossômica recessiva caracterizada por uma deficiência na enzima α -aminoadípico semialdeído (α - AASA) desidrogenase (EC 1.2.1.31), ocasionado, assim, um acúmulo de α - AASA e de AP em fluidos corporais (Plecko et al., 2005; Bok et al., 2007). Os pacientes acometidos por esta desordem apresentam convulsões epiléticas, encefalopatia, irritabilidade, vômitos e inchaço abdominal (Baxter, 2003).

O diagnóstico clínico para esta doença pode ser confirmado a nível metabólico através da medida dos níveis elevados de α - AASA na urina e AP no plasma (Bok et al.,

2007) e o tratamento consiste basicamente na administração de piridoxina (Vitamina B6) e de anticonvulsivantes (Baxter, 2003).

3. Radicais Livres

O termo radical livre refere-se a qualquer espécie química capaz de ter existência independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada de valência (Southorn e Powis, 1988; Halliwell e Gutteridge, 2007). Isto gera uma situação energeticamente instável que confere alta reatividade a essas espécies. Quando um radical livre reage com um não-radical ocorre a formação de outro radical livre, desencadeando reações em cadeia de transferência de elétrons que podem ser divididas em reações de iniciação, propagação e de terminação (Boveris, 1998).

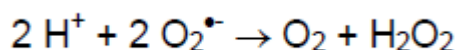
Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. No entanto, durante este processo, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, sendo convertido a intermediários reativos como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), hidroperoxila ($HO_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Cohen, 1989). Atualmente, utiliza-se o termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) que inclui não somente os radicais livres formados pela redução do O_2 como o $O_2^{\cdot-}$ e o OH^{\cdot} , mas também alguns não-radicais dele derivados, como o H_2O_2 , o ácido hipocloroso (HOCl), o oxigênio *singlet* (1O_2), e o ozônio (O_3) (Halliwell e Gutteridge, 2007). As espécies reativas (ER) ocorrem tanto em processos fisiológicos normais - participando da fagocitose e na síntese e regulação de proteínas - quanto patológicos do organismo, mas sistemas eficientes para sua detoxificação estão presentes naturalmente. Quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas de produção e remoção, ER são

formadas em excesso podendo oxidar biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA, resultando em consequências patológicas para o organismo (Bergendi et al., 1999; Halliwell e Whiteman, 2004).

4. Sistemas de Defesa Antioxidante

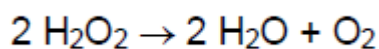
Em condições normais, os seres vivos dispõem de mecanismos eficientes para retardar, prevenir e/ou remover o acúmulo de ER a fim de proteger o organismo da injúria celular causada pelo dano oxidativo. Os sistemas de defesa preservam o equilíbrio entre a produção fisiológica e a remoção dessas espécies, sendo classificados em enzimáticos - removem catalicamente as ER - e não-enzimáticos que são oxidados pelas ER a fim de conservar as biomoléculas mais importantes (Halliwell e Gutteridge, 2007; Behl e Moosmann, 2002). A superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSH-Px) são importantes enzimas antioxidantes indispensáveis para o combate às ERO. Quanto às defesas não-enzimáticas fazem parte os antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e hidrofílicos (glutathione, ácido ascórbico, indóis e catecóis) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A SOD é uma metaloenzima que catalisa a reação de dismutação de dois radicais superóxido a H_2O_2 e O_2 .



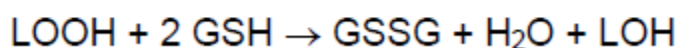
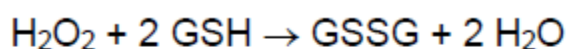
Embora o H_2O_2 seja menos reativo que o ânion superóxido, ele deve ser degradado posteriormente por outros sistemas, como a CAT e GSH-Px (Fridovich, 1975). Existem duas formas dessa metaloenzima em células eucarióticas, variando sua localização e o metal presente em sua estrutura. A CuZnSOD, contém cobre e zinco e ocorre principalmente no citosol, enquanto a MnSOD contém manganês e está localizada principalmente na matriz mitocondrial (Fridovich, 1995).

A CAT é uma hemoproteína que catalisa a dismutação do H₂O₂ à H₂O e O₂ (Ferreira e Matsubara, 1997).



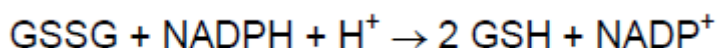
Em tecidos animais e vegetais está principalmente localizada em organelas subcelulares chamadas de peroxissomas, que contém várias enzimas produtoras de H₂O₂, e em menor quantidade no citosol e na fração mitocondrial da célula (Chance et al., 1979; Marks, Marks e Smith, 1996).

A GSH-Px, presente em animais, plantas e muitas bactérias, catalisa a decomposição do H₂O₂ e peróxidos orgânicos (LOOH) através do acoplamento de sua redução a H₂O com concomitante oxidação da glutathiona reduzida (GSH), que atua como doadora de elétrons, e é oxidada a glutathiona oxidada (GSSG) (Chance et al., 1979).



Há dois tipos de GSH-Px: uma requer seleniocisteína (Prohaska et al., 1977) como cofator (encontrada no citosol e na mitocôndria); e outra que é independente de selênio (localizada no citosol), responsável pela metabolização de hidroperóxidos orgânicos (Marks, Marks e Smith, 1996).

A glutathiona redutase (GR) catalisa a redução da GSSG, utilizando Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) como coenzima, assim dependendo da integridade da via das pentoses fosfatos (Chance et al., 1979; Marks, Marks e Smith, 1996).



A GSH (γ -glutamil-cisteinil-glicina) é o mais abundante tiol não-proteico presente no interior das células, e geralmente está presente em concentrações milimolares. A capacidade redutora da GSH é determinada pela presença do grupamento tiólico (-SH) da cisteína. Este tripeptídeo atua como transportador e reservatório de cisteína e está presente em importantes processos celulares incluindo a proliferação celular e a regulação da expressão de genes (Dickinson et al., 2002). No entanto, sua função mais conhecida é proteger a célula contra o estresse oxidativo eliminando espécies reativas ou como cofator de enzimas antioxidantes (Dickinson et al., 2003). Além disso, a GSH participa das reações de detoxificação de ERO e produtos de lipoperoxidação com um grupo de isoenzimas denominado GSTs (Glutathione S-transferases) protegendo a célula contra o estresse oxidativo através da metabolização de seus subprodutos (Fonseca et al., 2010; Huerta-Olvera et al., 2010).

Apesar de citar os demais antioxidantes não-enzimáticos, estes não serão detalhados, visto que não foram abordados neste estudo.

5. Estresse Oxidativo

Em condições normais, a produção de ERO e de nitrogênio é balanceada pelos sistemas de defesa antioxidantes garantindo, assim, a homeostase fisiológica do nosso organismo. No entanto, em determinadas situações patológicas, pode ocorrer um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e os sistemas de defesa antioxidantes (Halliwell, 2001; Behl e Moosmann, 2002), ou seja, tanto a diminuição das defesas antioxidantes quanto a produção aumentada de ER podem resultar em estresse oxidativo (Halliwell, 2001).

O aumento das ER está associado à inadequada oxidação de biomoléculas levando a um dano na célula com comprometimento da sua função. As consequências do

estresse oxidativo podem incluir: adaptação celular (geralmente por *up-regulation* das defesas antioxidantes a fim de restaurar o equilíbrio oxidante/antioxidante), injúria celular (dano em biomoléculas do organismo como DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) ou morte da célula por apoptose ou necrose (Behl e Moosmann, 2002; Halliwell e Whiteman, 2004).

O SNC é especialmente suscetível ao estresse oxidativo devido ao seu elevado consumo de oxigênio, concentrações elevadas de ferro, alto conteúdo de lipídios poliinsaturados e deficiência nos mecanismos de defesa antioxidantes que favorecem à lipoperoxidação de determinadas áreas do cérebro (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Estudos demonstraram que o estresse oxidativo parece estar envolvido na patogênese de várias desordens humanas, incluindo as doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (Behl e Moosmann, 2002). Além disso, estudos realizados em nosso grupo de pesquisa demonstraram que o estresse oxidativo parece estar aumentado em modelos experimentais de alguns erros inatos do metabolismo, como a fenilcetonúria (Kienzle-Hagen et al., 2002; Moraes et al., 2013), a tirosinemia (Sgaravatti et al., 2008; Sgaravatti et al., 2009) e a Doença de Canavan (Pederzoli et al., 2010).

5.1. Estresse Oxidativo e Ácido pipecólico

Estudos recentes demonstraram que o estresse oxidativo pode estar envolvido na fisiopatologia de diversas desordens do metabolismo as quais são caracterizadas pelo acúmulo de aminoácidos e ácidos orgânicos, os quais se supõem serem responsáveis pela produção excessiva de espécies reativas e pela diminuição das defesas antioxidantes (Wajner et al., 2004; Pederzoli et al. 2010; Moraes et al. 2013), dentre

elas, a tirosinemia (Sgaravatti et al., 2008; Sgaravatti et al., 2009) e a hiperfenilalaninemia (Moraes et al., 2010).

De acordo com Wanders et al., 2001, a via do AP produz H_2O_2 em reações catalisadas por oxidases. Entretanto, até o momento, o envolvimento causal do AP nestas desordens não está determinado e o estresse oxidativo pode ser um possível mecanismo envolvido na fisiopatologia das hiperpipecolatemias.

6. Ácido Lipoico

O ácido lipoico (AL) ou ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico, também conhecido como ácido tioico ou lipoamida é sintetizado naturalmente por tecidos animais e vegetais e é encontrado em diversos alimentos como a carne vermelha, batata, espinafre, brócolis e tomate (Lodge et al., 1997; Goraca et al., 2011). Na mitocôndria, o AL atua no Ciclo do Ácido Cítrico como um importante cofator biológico das enzimas piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase (Hagen et al., 1999; McLain et al., 2011), desempenhando um papel essencial no metabolismo e na bioenergética (Packer e Cadenas, 2011).

O AL pode ser rapidamente absorvido da dieta e transportado até o interior das células onde é reduzido a ácido diidrolipoico (ADHL). No citoplasma, esta redução é feita pela enzima glutathiona redutase e na mitocôndria pela enzima diidrolipoamida desidrogenase (Packer et al., 1997; Moini et al., 2002), podendo ser reoxidado pela lipoamida desidrogenase (Biewenga et al., 1997; Gorça et al., 2011). Segundo Packer e colaboradores (1995) de 21% a 45% do total de AL é reduzido a ADHL.

Além disso, por ser uma molécula pequena, hidro e lipossolúvel, o AL atravessa facilmente a barreira hematoencefálica (Samuel et al., 2005) e por isso é considerado um potente antioxidante capaz de quelar metais, eliminar espécies reativas, regenerar o

ciclo redox de outros antioxidantes como as vitaminas C e E, reparar o dano oxidativo celular, induzir a expressão de enzimas antioxidantes e interagir com outros antioxidantes, incluindo a GSH (Biewenga et al., 1997; Packer et al., 1997). Recentemente, estudos têm demonstrado que o AL apresenta propriedades anti-inflamatórias (Salinthonne et al., 2011), efeitos neuroprotetores e é capaz de proporcionar a regulação redox de proteínas e fatores de transcrição (Packer e Cadenas, 2011).

Devido à sua rápida absorção pelo organismo, o AL vem sendo utilizado no tratamento e prevenção do estresse oxidativo em modelos experimentais de uma série de desordens como Alzheimer e Parkinson (Packer et al., 1997), isquemia-reperfusão (Roy et al., 1997; Ghibu et al., 2009), diabetes (Ziegler et al., 1999; Minjhout et al., 2010), esclerose múltipla (Salinthonne et al., 2008) e até para o envelhecimento (Arivazhagan e Panneerselvam, 2000; Matsugo et al., 2011; Thakurtha et al., 2012). Além disso, estudos recentes realizados em nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento com AL pode prevenir o estresse oxidativo em modelos animais de hiperfenilalaninemia e outros erros inatos do metabolismo pelo aumento das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas e diminuição da produção de espécies reativas e do dano lipídico (Moraes et al., 2010; Pederzolli et al., 2010; Moraes et al., 2013).

Alguns trabalhos também demonstraram que a suplementação diária com AL promove uma melhora intelectual e neuropsicomotora em pacientes com doenças do metabolismo do piruvato (Blass, 1983; Matalon et al., 1984). Portanto, parece possível que o AL pode também melhorar o quadro clínico de outras desordens que afetam o SNC, porém, mais estudos são necessários para elucidar esta hipótese.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Verificar se o AP *in vitro*, em concentrações relacionadas às encontradas nas hiperlipoproteinemias, afeta parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos e se os possíveis efeitos observados podem ser prevenidos pelo AL.

Objetivos específicos:

- 1) Investigar o efeito do AP *in vitro* em homogeneizado de córtex cerebral de ratos sobre defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, além do dano oxidativo aos lipídios.
- 2) Avaliar a prevenção dos efeitos *in vitro* do AP pelo AL sobre os mesmos parâmetros em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Parte II

Artigo aceito

Metabolic Brain Disease

Data de aceite: 02 de dezembro de 2013

Metab Brain Dis
DOI 10.1007/s11011-013-9466-3

ORIGINAL PAPER

Pipecolic acid induces oxidative stress in vitro in cerebral cortex of young rats and the protective role of lipoic acid

Giovana Reche Dalazen • Melaine Terra • Carlos Eduardo Diaz Jacques •
Juliana G. Coelho • Raylane Freitas • Priscila Nicolao Mazzola •
Carlos Severo Dutra-Filho

Received: 1 October 2013 / Accepted: 2 December 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Pipecolic acid induces oxidative stress in vitro in cerebral cortex of young rats and the protective role of lipoic acid

Giovana Reche Dalazen², Melaine Terra², Carlos Eduardo Diaz Jacques¹, Juliana G. Coelho², Raylane Freitas¹, Priscila Nicolao Mazzola² e Carlos Severo Dutra-Filho^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica and ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brazil

Address Correspondence to:

Carlos Severo Dutra Filho

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo

90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone number: +55 51 33085575

Fax number: +55 51 33085535

E-mail: dutra@ufrgs.br

Abstract

Pipecolic acid (PA) levels are increased in severe metabolic disorders of the central nervous system such as Zellweger syndrome, infantile Refsum disease, neonatal adrenoleukodystrophy and hyperlysinemia. The affected individuals present progressive neurological dysfunction, hypotonia and growth retardation. The mechanisms of brain damage in these disorders remain poorly understood. Since PA catabolism can produce H₂O₂ by oxidases, oxidative stress may be a possible mechanism involved in the pathophysiology of these diseases. Lipoic acid (LA) is considered an efficient antioxidant and has been shown to prevent oxidative stress in experimental models of many disorders of the neurologic system. Considering that to our knowledge no study investigated the role of PA on oxidative stress, in the present work we investigated the *in vitro* effects of PA on some oxidative stress parameters and evaluated the LA efficacy against possible pro-oxidant effects of PA in cerebral cortex of 14 day-old rats. The activities of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), and glutathione S-transferase (GST) along with reduced glutathione (GSH) content were significantly decreased, while superoxide dismutase (SOD) activity and thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) were significantly enhanced by PA. LA was able to prevent these effects by improving the activity of antioxidant enzymes, increasing GSH content and reducing TBA-RS. In contrast, glutathione reductase and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities and sulfhydryl content were not affected. Taken together, it may be presumed that PA *in vitro* elicits oxidative stress and LA is able to prevent these effects.

Keywords: pipecolic acid, oxidative stress, lipoic acid, antioxidant, rat cerebral cortex.

Introduction

Pipecolic acid (PA) is the major metabolic intermediate of lysine in the mammalian brain. Lysine degradation may occur in mitochondria by a bifunctional enzyme complex α -aminoadipic semialdehyde synthase through its lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase activities. The transamination of amino group in α -ketoglutarate leads to the intermediate saccharopine which is converted to acetyl-CoA and enters the citric acid cycle. Lysine can also be degraded by an alternative pathway in the peroxisomes releasing PA which is subsequently oxidized to α -aminoadipic semialdehyde, joining the saccharopine pathway (Cox 2001; Wanders et al. 2001). Some actions in the central nervous system have been attributed to PA because it is considered a modulator that increases the release and decreases the uptake of γ -aminobutyric acid (GABA) by brain neurons (Gutierrez and Delgado-Coello 1989).

PA is present at high concentrations in several metabolic disorders such as Zellweger Syndrome, a genetic disorder characterized by peroxisome formation defect leading to deficiency of the activity of peroxisomal PA oxidase, enzyme responsible for PA oxidation. Increased levels of PA are also observed in hyperlysinemia, an autosomal recessive disease caused by a defect in the bifunctional protein α -aminoadipic semialdehyde synthase (Cox 2001; Wanders et al. 2001; Seminotti et al. 2008), and in neonatal adrenoleukodystrophy (Inoue et al. 2011). Moreover, increased PA levels were also reported in patients with pyridoxine-dependent seizures (Plecko et al. 2005), probably due to inhibition of α -aminoadipic acid transaminase involved in its catabolism (Baxter 2003). Patients mainly present progressive neurological symptoms with growth and mental retardation, (Broquist 1991; Cox 2001; Wanders et al. 2001; Seminotti et al. 2011), hepatic dysfunction and hypotonia (Ezgu et al. 2011).

PA catabolic pathway produces H_2O_2 by reactions catalysed by oxidases (Wanders et al. 2001). Reactive species participate in both pathological and physiological processes in the organism. In healthy aerobes, production of reactive species is approximately balanced with antioxidant defense systems. However, the excess of these compounds caused by their overproduction and/or by diminished antioxidant defenses may lead to cell injury and death, as a result of lipid, protein and DNA oxidative damage (Halliwell e Gutteridge 2007).

Lipoic acid (LA) is synthesized in animal and plant tissues participating in the Krebs cycle as a cofactor to pyruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase enzymes (Liu et al. 1995; Hagen et al. 1999). LA can be rapidly absorbed from the diet, transported to cells and reduced to dihydrolipoic acid (DHLA). Moreover, these compounds can easily cross blood-brain barrier (Samuel et al. 2005; Muthuswamy et al. 2006) and are considered potent antioxidants capable of chelating metals, eliminating reactive species, repairing cellular oxidative damage and regenerating other antioxidants by redox cycling (Biewenga et al. 1997; Packer et al. 1997). Current research has been revealed protective effects of these compounds in experimental models of diabetes (Ziegler et al. 1999), ischemia-reperfusion injury (Roy et al. 1997) and neurodegenerative diseases, such as Parkinson and Alzheimer (Packer et al. 1997). Recent studies conducted by our research group demonstrated that LA treatment can prevent oxidative stress in animal models of phenylketonuria and other inborn errors of metabolism by increasing enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses and decreasing reactive species production and lipid damage (Moraes et al. 2010; Pederzolli et al. 2010; Moraes et al., 2013; Mazzola et al. 2013).

So, the aim of this study was to evaluate whether PA *in vitro* affects oxidative stress parameters in cerebral cortex of young rats and investigate if the effects observed can be prevented by LA.

Material and Methods

Animals and Reagents

Fourteen-day-old Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, from both sexes were used. Rats were kept with dams until they were sacrificed. The dams had free access to water and a 20% (w/w) protein commercial chow (Nuvilab, Porto Alegre, RS, Brazil). They were kept in a room with 12:12 h light/dark cycle (lights on 07:00-19:00 h) and with air-conditioned controlled temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). The NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication # 80-23, revised 1996) was followed in all experiments. The research project was approved by the Ethical Committee for animal experimentation of the Federal University of Rio Grande do Sul. The chemicals reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Tissue preparation

Animals were killed by decapitation without anesthesia and the brain was immediately removed and kept on an ice-plate. The olfactory bulb, pons and medulla were discarded and the cerebral cortex was dissected, weighed and kept chilled until homogenization. Cerebral cortex was homogenized (1:10, w/v) in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at 800g for 10 min at 4°C

to separate nuclei and cell debris (Lissi et al. 1986). The supernatant (0.1-0.3 mg protein) was immediately used for in vitro experiments.

In vitro experiments

Cerebral cortex supernatants were incubated for 1 h at 37°C in the presence of PA or LA, and controls were incubated with medium only. The incubation medium consists of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. The final concentrations of PA in the medium ranged 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 mM. The LA was incubated alone at a concentration of 0.1 mM (Moraes et al. 2010) and in the presence of PA (1mM), totaling seven groups. Immediately after the incubation, aliquots were used for the measurements.

Superoxide dismutase (SOD) activity assay

To evaluate SOD activity, the method described by Marklund (1985) was used. This method is based on capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide radical. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm, using a SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). The medium contained 50 mM Tris-HCl 1mM EDTA pH 8.2 buffer, 30 µM catalase, sample and 24 mM pyrogallol. A calibration curve was performed with purified SOD as standard. A 50% inhibition of pyrogallol autoxidation is defined as one unit of SOD and the specific activity is represented as units per mg protein.

Catalase (CAT) activity assay

CAT activity was assayed by the method of Aebi (1984) using SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). This method is based on the disappearance of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H_2O_2 , 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, and sample. One CAT unit is defined as one μmol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is represented as CAT units/mg protein.

Glutathione peroxidase (GPx) activity assay

GPx activity was measured using tert-butyl-hydroperoxide as substrate according to the method described by Wendel (1981). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH) disappearance was monitored at 340 nm using SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). The medium contained 2 mM glutathione, 0.15 U/mL glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl-hydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GPx unit is defined as 1 μmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is represented as GPx units/mg protein.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) activity assay

This assay was performed to measure the activity of G6PD and 6PGD, two enzymes of the pentose phosphate pathway that produce NADPH. To obtain the total dehydrogenase activity, substrates for both dehydrogenase enzymes were added to a cuvette. The reaction mixture contained the following: 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10

mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺, 1 mM 6-phosphogluconate (6PGD substrate), 1 mM glucose-6-phosphate (G6PD substrate), and the sample. In another cuvette, the same reaction mixture without G6P was used to obtain the activity of 6PGD alone. The reactions were started through the addition of 1 mM NADP⁺ and monitored in a spectrophotometer at 340 nm using SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). One 6PGD unit is defined as one μmol NADPH produced per minute and specific activity is represented as 6PGD units/mg protein. Then, the G6PD activity was obtained by the subtraction of the total activity by the activity of 6PGD. One G6PD unit is defined as one μmol of NADPH produced per minute and specific activity is represented as G6PD units/mg protein (Leong and Clark 1984; Tian et al. 1994).

Glutathione reductase (GR) activity assay

The assay of GR was carried out as described by Calberg and Manervick (1985). The method is based on glutathione oxidized (GSSG) reduction using NADPH as coenzyme. The medium contained 200 mM sodium phosphate buffer containing 6.3 mM EDTA (pH 7.5), 10 mM GSSG and 0.4 mM NADPH. NADPH disappearance was monitored at 340 nm using SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). One GR unit is defined as 1 μmol of GSSG reduced per minute and the specific activity is represented as GR units/mg protein.

Glutathione S-transferase (GST) activity assay

The activity of GST was determined according to the method described by Habig (1974) based on the conjugation of 1-chloro-2,4-nitrobenzene (CDNB) to GSH. The

product formed is measured in a spectrophotometer at 340 nm using SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). The reaction medium contained 100 mM potassium phosphate buffer, 50 mM CDNB and 25 mM GSH. One unit of GST is defined as 1 μ mol of CDNB conjugated with GSH per minute and the specific activity is represented as GSH units/mg protein.

Reduced glutathione (GSH) content

This method is based on the reaction of GSH with the fluorophore o-phthalaldehyde (OPT) after deproteinizing the samples, and was measured according to Browne and Armstrong (1998). Initially, metaphosphoric acid was used to deproteinize the samples, which were then centrifuged at 6000g for 10 min. Briefly, 15 μ L of each supernatant were added to 85 μ L of sodium phosphate buffer pH 8.0 and 200 μ L OPT 1 mg/mL. The mixture was vortexed and allowed to stand in the dark for exactly 15 min. After that, the fluorescence was measured at $\lambda_{em} = 420$ nm and $\lambda_{ex} = 350$ nm. A calibration curve was also performed with a commercial GSH solution, and the results were expressed as μ mol GSH/mg protein.

Sulfhydryl content

This parameter was performed according to Aksenov and Markesbery (2001). The oxidation of free thiols in the sample leads to the formation of disulfide bonds. The 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) color reagent is not reduced by the thiols oxidized, generating a yellow derivative (TNB), read spectrophotometrically at 412 nm. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. The results were expressed as nmol TNB/mg protein.

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS were measured according to Esterbauer e Cheeseman (1990). Briefly, 300 μ L of 10% (w/v) trichloroacetic acid was added to 150 μ L of supernatant and centrifuged at 300 g for 10 min. Three hundred microliters of supernatant were transferred to another eppendorf and incubated with 300 μ L of 0.67% (w/v) thiobarbituric acid in 7.1% (w/v) sodium sulfate in boiling water for 25 min. The mixture was allowed to cool on water for 5 min. The resulting pink stained TBA-RS was determined in a spectrophotometer at 532 nm. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane that was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS was calculated as nmol TBA-RS/mg protein.

Protein determination

Protein concentration was determined in cerebral cortex supernatants using bovine serum albumin as a standard (Lowry et al. 1951).

Statistical analysis

The results obtained were represented as mean \pm S.D. and were performed by the one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test for multiple comparisons when the F value was significant. All the analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer. A value of $P < 0.05$ was considered to be significant.

Results

In this study, we investigated the *in vitro* effects of PA (0.1 mM to 1.0 mM) and the possible protective role of LA (0.1 mM) by analyzing various oxidative stress parameters in cerebral cortex of 14-day-old rats.

Fig. 1 shows that three important enzymes responsible for detoxification of superoxide anion radical and hydrogen peroxide were altered. PA, at all concentrations, significantly increased SOD activity (Fig 1a) and LA was also capable to increase this activity when compared to control group ($F_{(6,37)} = 29.356$, $p < 0.05$). Interestingly, SOD activity was decreased in PA 1.0 mM + LA 0.1 mM group when compared to PA 1.0 mM group. CAT (Fig 1b) and GPx (Fig 1c) activities were reduced by PA at concentrations of 0.25, 0.5 and 1.0 mM and these activities were restored to normal levels by LA ($F_{(6,35)} = 4.236$, $p < 0.05$ and $F_{(6,35)} = 3.881$, $p < 0.05$, respectively).

G6PD activity (Fig. 2a) was inhibited by PA at concentration of 1.0 mM and LA was able to avoid this alteration ($F_{(6,36)} = 2.384$, $p < 0.05$). There was no difference between groups regarding 6PGD activity (Fig. 2b) ($F_{(6,35)} = 0.329$, $p > 0.05$) and GR activity (Fig. 2c) ($F_{(6,56)} = 1.111$, $p > 0.05$).

Fig. 3 shows that GST activity (Fig 3a) was decreased by PA at concentrations of 0.25, 0.5 and 1.0 mM ($F_{(6,38)} = 4.193$, $p < 0.05$). PA, at all tested concentrations, significantly reduced GSH content (Fig 3b) when compared to control group ($F_{(6,33)} = 10.076$, $p < 0.05$). The effects of PA on GST activity and GSH content were avoided by LA. In addition, GSH content was increased in PA 1.0 mM + LA 0.1 mM group when compared to PA 1.0 mM group. There was no difference between groups considering sulfhydryl content (Fig 3c) ($F_{(6,42)} = 1.459$, $p > 0.05$).

Finally, lipid peroxidation was investigated by measuring TBA-RS levels (Fig. 4) in rat cerebral cortex. TBA-RS were increased by PA at concentrations of 0.5 and 1.0 mM and LA inhibited this increase when compared to control ($F_{(6,61)}=10.832$, $p<0.05$). TBA-RS levels were decreased in PA 1.0 mM + LA 0.1 mM group when compared to PA 1.0 mM group.

Discussion

Oxidative stress is described as an imbalance between reactive species generation and antioxidant defense systems that can potentially lead to biomolecular oxidative damage (Behl e Moosmann 2002; Halliwell and Gutteridge 2007). Moreover, the adverse consequences of oxidative stress have been implicated in a variety of nervous system diseases, including inherited disorders characterized by the tissue accumulation of one or more organic acids, which are presumed to be the responsible for inducing reactive species production and decreasing brain antioxidant defenses (Wajner et al. 2004; Pederzoli et al. 2010; Moraes et al. 2013). Antioxidants are defined as any substance that, at low concentrations, delays, prevents or removes oxidative damage to a target molecule (Halliwell and Gutteridge 2007). LA and its reduced form, DHLA, are potent antioxidants capable of scavenging many reactive species, preventing lipid peroxidation and inducing antioxidant enzyme expression (Packer et al. 1995; Biewenga et al. 1997; Bast and Haenen 2003). Furthermore, due to its ability to cross blood-brain barrier, supplementation with LA has been suggested for a number of conditions involving oxidative stress (Kleinkauf-Rocha et al. 2013), including some inborn errors of metabolism (Matalon et al. 1984; Packer et al. 1997; Pederzoli et al. 2010; Moraes et al. 2013; Mazzola et al. 2013).

Considering that to our knowledge no study has investigated the role of PA on oxidative stress, in the present work we investigate the *in vitro* effect of this imino acid on some oxidative stress parameters and evaluated the LA efficacy against possible pro-oxidant effects of PA.

First, we evaluated the activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx. SOD is the enzyme responsible to convert superoxide anion radical into hydrogen peroxide (H_2O_2) and molecular oxygen (O_2). CAT metabolizes H_2O_2 into H_2O and O_2 and GPx removes H_2O_2 and organic hydroperoxides by coupling its reduction to H_2O with oxidation of reduced glutathione (GSH) (Halliwell and Guttridge 2007). In the present study, SOD activity was significantly enhanced while CAT and GPx activities were inhibited by PA *in vitro*. Increase of SOD activity along with CAT and GPx inhibition may lead to an accumulation of H_2O_2 which, in turn, is capable of inactivate CAT and GPx by oxidation of hyper-reactive sulfhydryl groups, which are essential for catalyzes, resulting in a vicious cycle (Halliwell and Guttridge 2007). We also demonstrated that incubation with LA restores CAT and GPx activities to the levels found in control group. It has been shown that LA is an effective scavenger of reactive species such as hydrogen peroxide (Packer et al. 1995; Moraes et al. 2010) and this could help to return the activity of these enzymes to normal levels. Incubation with LA increased SOD activity and it should be mentioned that LA alone (LA group) was able to enhance SOD activity, as compared to control. This result is consistent with previous findings using LA as an antioxidant (Moraes et al. 2010; Moraes et al. 2013).

We also measured G6PD activity, an enzyme of pentose phosphate pathway, which plays an important role maintaining cellular redox homeostasis (Kletzien et al. 1994) and protecting cells from oxidative injury by producing NADPH (Luzatto et al. 2001; Carter et al. 2011). NADPH is an important compound used by GR to recycle

GSH from GSSG (Meister 1988). In this work, G6PD activity was inhibited by PA, an effect that could promote an impairment of NADPH production and cellular damage by altering redox state. We also demonstrated that LA incubation was able to return G6PD activity to normal levels. So, the preservation of G6PD activity by LA is an important factor to maintain enzymatic and non-enzymatic GSH antioxidant system working properly. On the other hand, 6PGD activity was not changed, and GR activity, which catalyzes the reduction of GSSG using NADPH as a coenzyme (Meister 1988, Zhang et al. 2012), was not altered, possibly because NADPH was added to the reaction medium during the measurement.

GSH, the major non-enzymatic antioxidant defense in the organism was evaluated. Its well-known functions are the protection of cells against oxidative damage by eliminating reactive species and acting as a cofactor of antioxidant enzymes. It also participates as a mediator of many physiologic reactions including cellular signaling and metabolism of xenobiotics (Dickinson and Forman 2002; Dickinson et al. 2003; Marí et al. 2009). GSH content was significantly reduced by incubation with PA. As seen above, the reduction of G6PD activity caused by PA could elicit a deficit in NADPH production which is used to produce GSH from GSSG. The reduction of GSH levels may compromise reactive species detoxification and may exacerbate the inhibition of GPx activity by PA, since this enzyme uses GSH as a cofactor (Hashida et al. 2002; Williams and Ford 2004). We also demonstrated that LA was able to return GSH content to the levels found in control group.

Another parameter analyzed was the activity of GST. The GSTs are a group of multifunctional phase II enzymes that catalyse the conjugation reaction of GSH with xenobiotics (Ketterer et al. 1983; Tew and Townsend 2012), producing less toxic compounds that are easy to remove (O'Brien and Tew 1996). It is important for cellular

detoxification in order to protect tissues from oxidative damage. In this work we demonstrated that GST activity was inhibited by PA and this inhibition may be due to a decrease in GSH levels by incubation with PA (shown above), since this enzyme uses GSH as a cofactor (Gérard-Monnier and Chaudiere 1996). We also demonstrated that LA was capable of returning GST activity back to normal levels. In contrast, sulfhydryl content was not altered by PA incubation.

Finally, the influence of PA in oxidative damage to lipids was evaluated. TBA-RS reflects the malondialdehyde content, the most abundant aldehyde resulting from lipid peroxidation process (Esterbauer and Cheeseman 1990). We showed that TBA-RS levels were significantly enhanced by PA in cerebral cortex supernatant, demonstrating that PA can stimulate lipoperoxidation. Our results suggest that incubation with PA points to a possible increase of H₂O₂. Recent studies have shown that H₂O₂ can interact with lipids (Manda et al. 2009) and is capable to induce lipid peroxidation in cultured human lymphocytes (Siddique et al. 2012). In addition, H₂O₂ can produce hydroxyl radical (Halliwell and Gutteridge 2007), which is extremely reactive and could attack lipids of cell membranes (Manda et al. 2009). The present results showed that incubation with LA was able to prevent lipid peroxidation. This result is probably related to the fact that both LA and DHLA directly scavenge free radicals that are responsible to trigger lipid peroxidation process and chelate metal ions that participate in reactive species reaction (Scott et al. 1994; Packer et al. 1995).

The results obtained in the present study showed that PA is able to alter both enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses, possibly compromising reactive species elimination, and is also able to induce lipid peroxidation, probably by increasing reactive species generation (Fig. 5). LA was able to prevent all these effects by improving the activity of antioxidant enzymes, increasing non-enzymatic antioxidant

defenses and reducing lipid oxidative damage. These findings indicate that LA is effective to prevent the oxidative stress elicited by PA, protecting the brain from oxidative harm. Considering the data reported in this work, an antioxidant therapy with LA may be useful to counteract oxidative stress elicited by PA and can represent a new therapeutic approach to the treatment of disorders involving PA accumulation.

Acknowledgments

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

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105:121-126

Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141-145

Bast A, Haenen GR (2003) Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. *Biofactors* 17: 207-13

Baxter P (2003) Pyridoxine-dependent seizures: a clinical and biochemical conundrum. *Biochim Biophys Acta* 1647:36-41

Behl C, Moosmann B (2002) Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med* 33:182-191

Biewenga GP, Haenen GR, Bast A (1997) The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol* 29:315-331

Broquist HP (1991) Lysine-pipecolic acid metabolic relationships in microbes and mammals. *Annu Rev Nutr* 11:435-448

Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Meth Enzymol* 108:347-352

Calberg I, Manervik B (1985) Glutathione Reductase. *Methods Enzymol* 113:484-49

Carter N, Pamba A, Duparc S et al (2011) Frequency of glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency in malaria patients from six African countries enrolled in two randomized anti-malarial clinical trials. *Malar J* 17:10:241

Cox RP (2001) Errors of Lysine metabolism. In: Scriver CR et al (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1965-1970

Dickinson DA, Moellering DR, Iles KE et al (2003) Cytoprotection against oxidative stress and the regulation of glutathione synthesis. *Biol Chem* 384:527–537

Dickinson DA, Forman HJ (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64:1019–1026

Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407-421

Ezgu F, Eminoglu T, Okur I et al (2011) An infantile case of Zellweger syndrome presented with Kabuki-like phenotype. *Genet Couns* 22:217-20

Gérard-Monnier D, Chaudiere J (1996) Metabolism and antioxidant function of glutathione. *Pathol Biol* 44:77-85

Gutierrez MC, Delgado-Coello BA (1989) Influence of pipercolic acid on the release and uptake of [3H] GABA from brain slices of mouse cerebral cortex. *Neurochem Res* 14:405-408

Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB (1974) Glutathione S-Transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-7139

Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J et al (1999) (R)- α -lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *Faseb J* 13:411–8

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn. Oxford University Press Inc., New York

Hashida K, Sakakura Y, Makino N (2002) Kinetic studies on the hydrogen peroxide elimination by cultured PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 1572:85-90

Inoue H, Sakata Y, Nishio H et al (2011) A simple and highly sensitive HPLC method with fluorescent detection for determination of pipercolic acid in mouse brain areas. *Biol Pharm Bull* 34:287-289

Ketterer B, Coles B, Meyer DJ (1983) The role of glutathione in detoxication. *Environ. Health Perspect* 49:59–69

Kleinkauf-Rocha J, Bobermin LD, Machado PM et al (2013) Lipoic acid increases glutamate uptake, glutamine synthetase activity and glutathione content in C6 astrocyte cellline. *Int J Dev Neurosci* 31:165-70

Kletzien RF, Harris PKW, Foellmi LA (1994) Glucose 6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients and oxidant stress. *Faseb J* 8:174-181

Leong SF, Clark JB (1984) Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem J* 218:131-138

Lissi E, Caceres T, Videla LA (1986) Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. *Free Radic Biol Med* 2:63-69

Liu S, Baker JC, Andrews PC, Roche TE (1995) Recombinant expression and evaluation of the lipoyl domains of the dihydrolipoyl acetyltransferase component of the human pyruvate dehydrogenase complex. *Arch Biochem Biophys* 316:926–940

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol. *J Biol Chem* 193:265-275

Luzzatto L, Mehta A, Vulliamy T (2001) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Scriver CR et al (eds) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol. 3. McGraw Hill, New York, pp 4517–4553

Manda G, Nechifor MT, Neagu TM (2009) Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. *Current Chemical Biology* 3:342-366

Marí M, Morales A, Colell A et al (2009) Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 11:2685-700

Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (ed) *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, pp 243-247

Matalon R, Stumpf DA, Michals K et al (1984) Lipoamide dehydrogenase deficiency with primary lactic acidosis: Favorable response to treatment with oral lipoic acid. *J Pediatr* 104:65-69

Mazzola PN, Karikas GA, Schulpis KH, Dutra-Filho CS (2013) Antioxidant treatment strategies for hyperphenylalaninemia. *Metab Brain Dis* 28:541-550

Meister A (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263:17205–17208

Moraes TB, Jacques CE, Rosa AP et al (2013) Role of catalase and superoxide dismutase activities on oxidative stress in the brain of a phenylketonuria animal model and the effect of lipoic acid. *Cell Mol Neurobiol* 33:253-60

Moraes TB, Zanin F, Rosa A et al (2010) Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *J Neurol Sci* 292:89-95

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

O'Brien ML, Tew KD (1996) Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Eur J Cancer* 32:967:78

Packer L, Tritschler HJ, Wessel K (1997) Neuroprotection by the metabolic antioxidant alphalipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22:359–78

Packer L, Witt EH, Tritschler HJ (1995) Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19: 227-50

Pederzolli CD, Rosa AP, de Oliveira AS et al (2010) Neuroprotective role of lipoic acid against acute toxicity of N-acetylaspartic acid. *Mol Cell Biochem* 344:231-9

Plecko B, Hikel C, Korenke GC et al (2005) Pipecolic acid as a diagnostic marker of pyridoxine-dependent epilepsy. *Neuropediatrics* 36:200-5

Roy S, Sen CK, Tritschler HJ, Packer L (1997) Modulation of cellular reducing equivalent homeostasis by alpha-lipoic acid. Mechanisms and implications for diabetes and ischemic injury. *Biochem Pharmacol* 53:393-9

Samuel S, Kathirvel R, Jayavelu T et al (2005) Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL-a-lipoic acid. *Toxicol Lett* 155:27-34

Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ et al (1994) Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants: A critical evaluation. *Free Rad Res* 20:119-33

Seminotti B, Fernandes CG, Leipnitz G et al (2011) Neurochemical evidence that lysine inhibits synaptic Na⁺,K⁺-ATPase activity and provokes oxidative damage in striatum of young rats in vivo. *Neurochem Res* 36:205-14

Seminotti B, Leipnitz G, Amaral AU et al (2008) Lysine induces lipid and protein damage and decreases reduced glutathione concentrations in brain of young rats. *Int J Dev Neurosci* 26:693-8

Siddique YH, Ara G, Afzal M (2012) Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. *Dose Response* 10:1-10

Tew KD, Townsend DM (2012) Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxid Redox Signal* 17:1728-37

Tian WN, Pignatari JN, Stanton RC (1994) Signal transduction proteins that associate with the platelet-derived growth factor (PDGF) receptor mediate the PDGF-induced release of glucose-6-phosphate dehydrogenase from permeabilized cells. *J Biol Chem* 269:14798–14805

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 Inher Metab Dis* 27:427-448

Wanders R et al (2001) Single peroxisomal enzyme deficiencies. In: Scriver CR et al (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of inherited Disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 3219-3256

Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-332

Williams AC, Ford WCL (2004) Functional Significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm. *Biol Reprod* 71:1309-1316

Zhang Z, Yang Z, Zhu B et al (2012) Increasing glucose 6-phosphate dehydrogenase activity restores redox balance in vascular endothelial cells exposed to high glucose. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0049128

Ziegler D, Reljanovic M, Mehnert H, Gries FA (1999) Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trials. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:421-30



Figure Captions

Fig. 1 *In vitro* effects of pipercolic acid (PA) and lipoic acid (LA) on superoxide dismutase (SOD) (a), catalase (CAT) (b) and glutathione peroxidase (GPx) (c) activities in cerebral cortex from 14-day-old rats. Results are mean \pm SD (n=6-7). *p<0.05 compared to control (Tukey test); # p<0.05 compared to PA 1.0 mM (Tukey test)

Fig. 2 *In vitro* effects of pipercolic acid (PA) and lipoic acid (LA) on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) (a), phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) (b) and glutathione reductase (GR) (c) activities in cerebral cortex from 14-day-old rats. Results are mean \pm SD (n=6-9). *p<0.05 compared to control (Tukey test)

Fig. 3 *In vitro* effects of pipercolic acid (PA) and lipoic acid (LA) on glutathione S-transferase (GST) activity (a), reduced glutathione (GSH) content (b) and sulfhydryl content (c) in cerebral cortex from 14-day-old rats. Results are mean \pm SD (n=5-7). *p<0.05 compared to control (Tukey test); # p<0.05 compared to PA 1.0 mM (Tukey test)

Fig. 4 *In vitro* effects of pipercolic acid (PA) and lipoic acid (LA) on production of thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) in cerebral cortex from 14-day-old rats. Results are mean \pm SD (n=7-11). *p<0,05 compared to control (Tukey test); # p<0.05 compared to PA 1.0 mM (Tukey test)

Fig. 5 *In vitro* effects of pipercolic acid on oxidative stress parameters (= increase; = decrease). SOD = superoxide dismutase; CAT = catalase; GPx = glutathione

peroxidase; GR = glutathione reductase; G6PD = glucose-6-phosphate dehydrogenase;
GST = glutathione S-transferase; GSH = reduced glutathione; TBA-RS = thiobarbituric
acid-reactive species

Figure 1

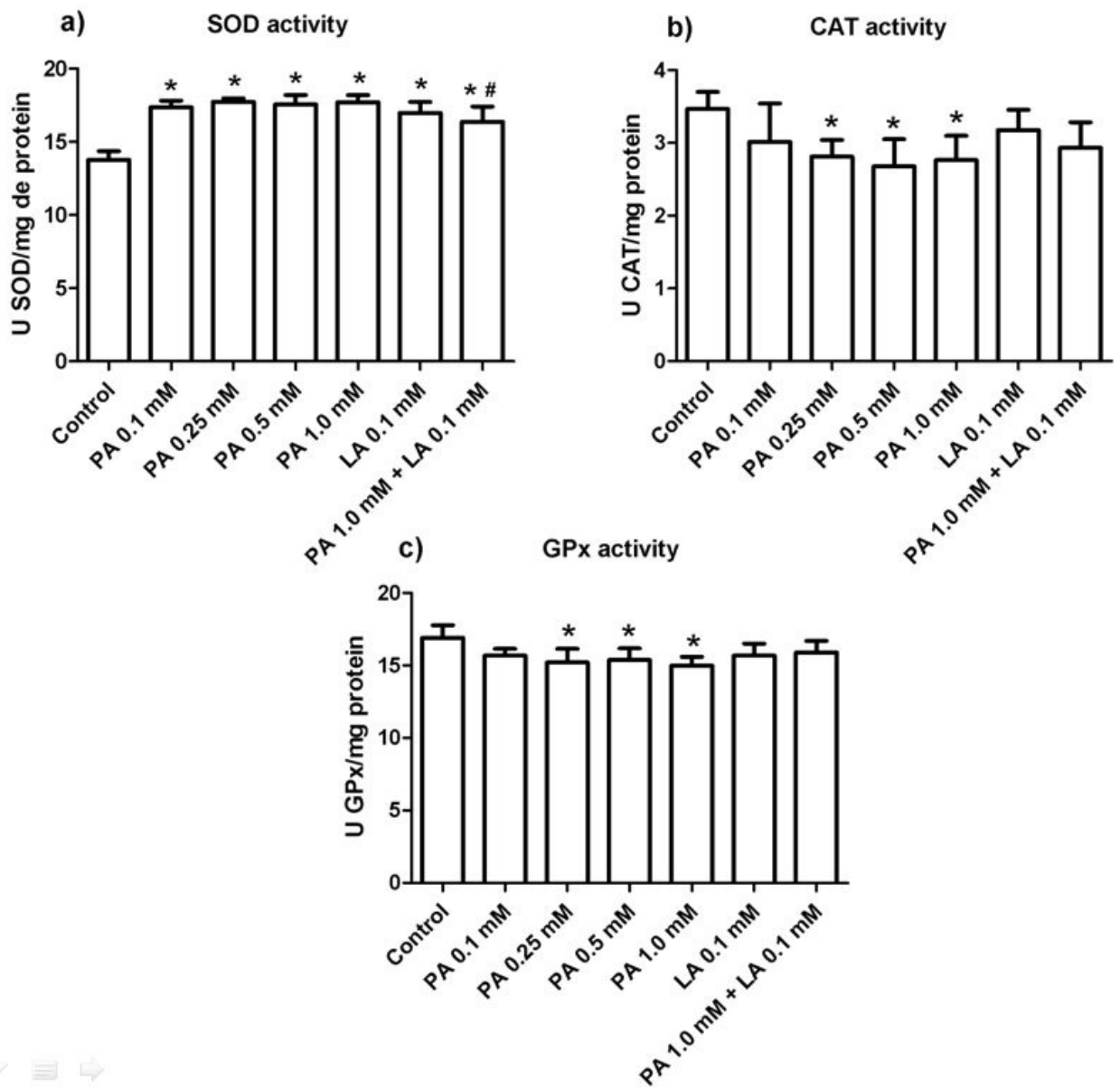


Figure 2

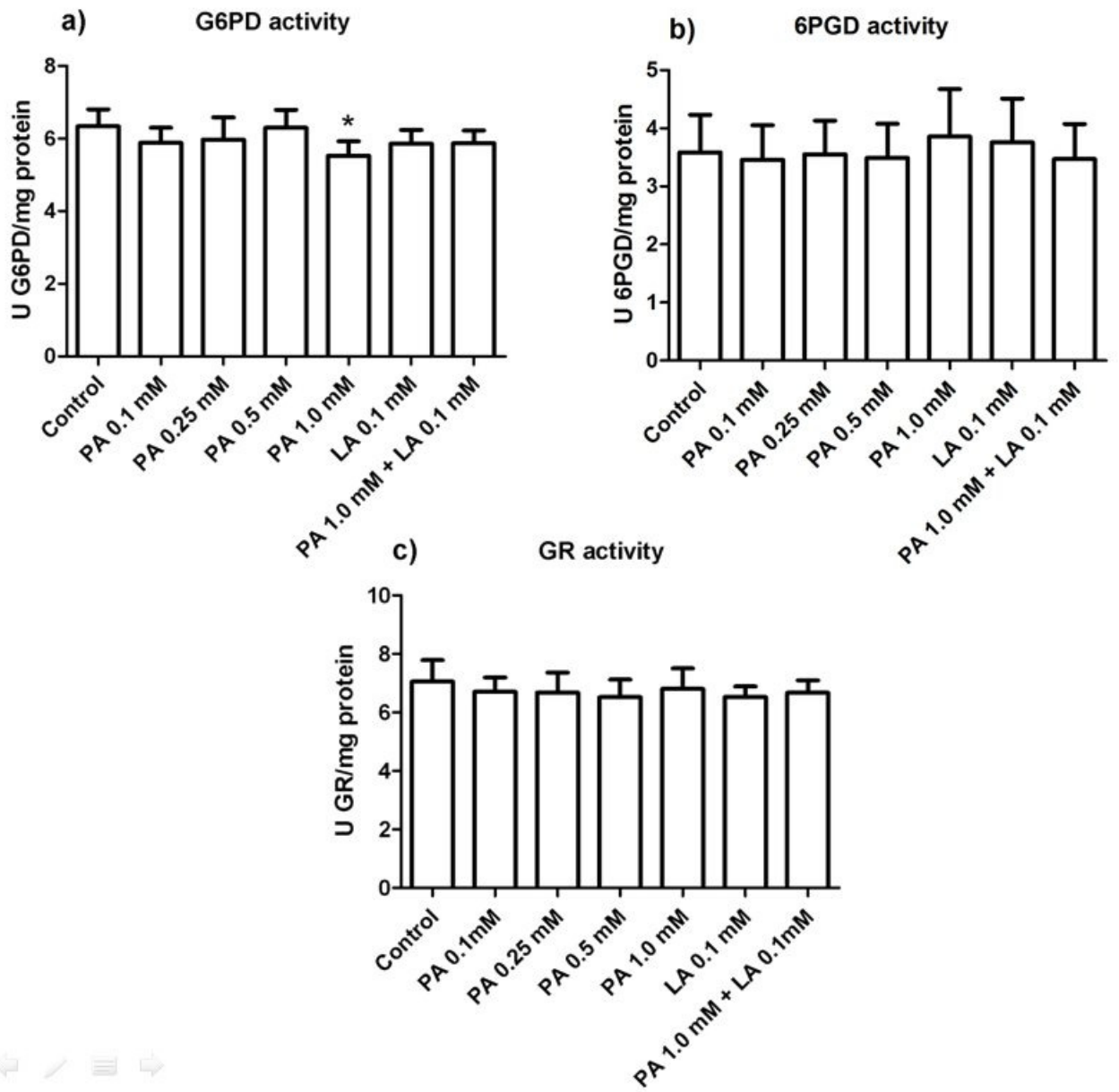


Figure 3

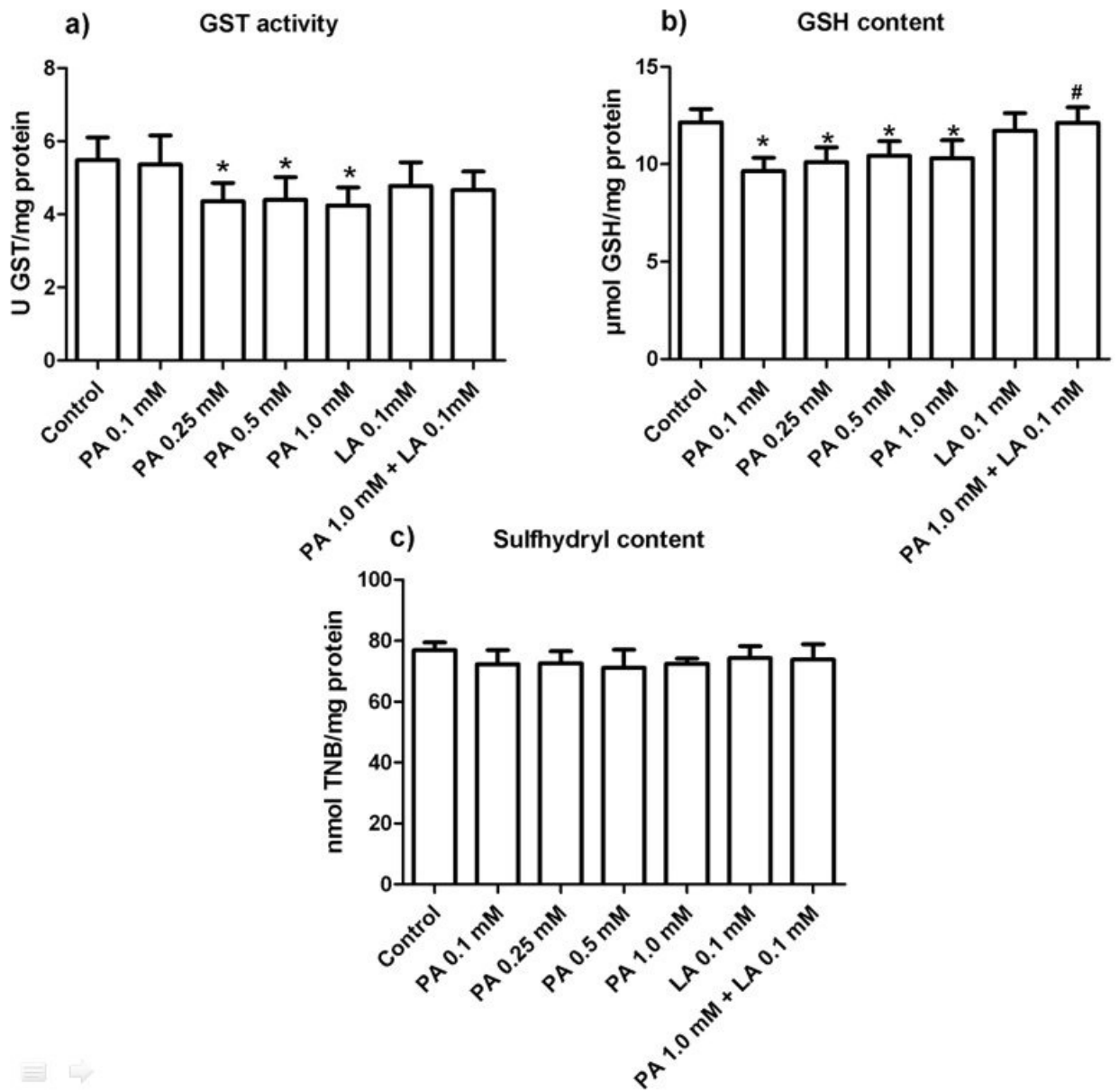


Figure 4

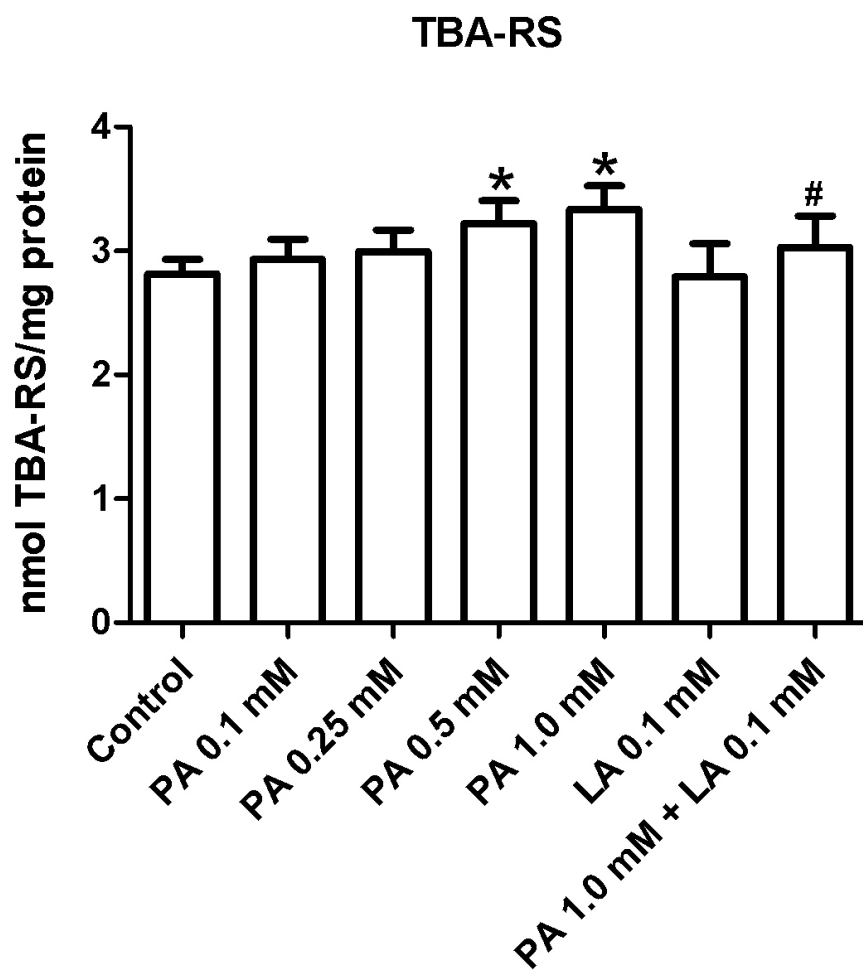
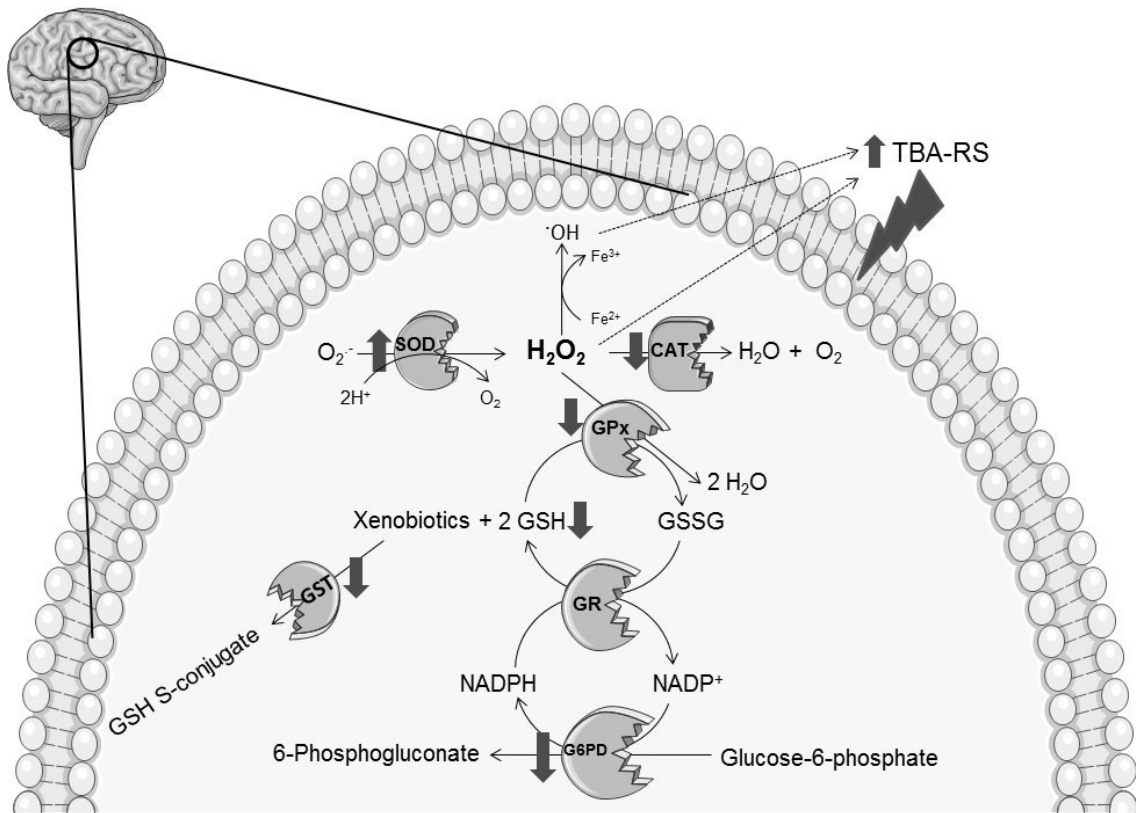


Figure 5



Parte III

DISCUSSÃO

Muitos trabalhos vêm descrevendo o envolvimento do estresse oxidativo em doenças metabólicas do sistema nervoso central (Colomé et al., 2000; Wajner et al., 2004), incluindo erros inatos do metabolismo como a fenilcetonúria (Moraes et al. 2010, Moraes et al., 2013 e Mazzola et al., 2011), a tirosinemia (Sgaravatti et al., 2008; Sgaravatti et al., 2009) e a Doença de Canavan (Pederzoli et al., 2010).

Em situações fisiológicas normais, o controle entre a produção e remoção das ER garante a homeostase do organismo, cujo principal mecanismo é a sinalização redox que leva a uma cascata de sinais a fim de induzir a expressão de enzimas antioxidantes e aumentar os níveis de glutathione intracelular (Dröge, 2002). Porém, situações de aumento na produção desses compostos tóxicos (ER) e/ou diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas acarretam em estresse oxidativo. O aumento das ER está associado à oxidação de biomoléculas, resultando em dano celular e comprometimento da sua função (Behl e Moosmann, 2002; Halliwell and Gutteridge, 2007).

O AP é considerado o maior metabólito da degradação da lisina em cérebro de mamíferos. Os níveis de AP estão aumentados em desordens metabólicas severas do sistema nervoso central como na Síndrome de Zellweger, Doença de Refsum Infantil, Adrenoleucodistrofia neonatal, Hiperlisinemia e na Epilepsia piridoxina-dependente. Os pacientes acometidos por estas doenças apresentam manifestações clínicas graves como disfunção neurológica progressiva, hipotonia, retardo no crescimento, convulsões, retardo mental, disfunção hepática, entre outros sintomas (Broquist, 1991; Cox, 2001; Inoue et al., 2011). Os mecanismos exatos subjacentes ao dano cerebral nessas desordens permanecem pouco compreendidos, entretanto, estudos demonstraram que a

via do AP pode produzir H_2O_2 em reações catalisadas por oxidases (Wanders et al., 2001) e assim, o estresse oxidativo poderia ser um possível mecanismo envolvido na fisiopatologia destas doenças.

De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), os antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações são capazes de competir com substratos oxidáveis inibindo sua oxidação. O AL e a sua forma reduzida, ADHL, são considerados antioxidantes ideais devido a sua capacidade de eliminar espécies reativas, prevenir a peroxidação lipídica e interagir com outros antioxidantes (Packer et al., 1995; Biewenga et al., 1997; Bast and Haenen, 2003). Devido à baixa concentração de AL no organismo, a suplementação com este antioxidante tem sido sugerida em um grande número de desordens envolvendo estresse oxidativo (Kleinkauf-Rocha et al., 2013), incluindo alguns erros inatos do metabolismo (Matalon et al., 1984; Packer et al., 1997; Pederzoli et al., 2010; Moraes et al., 2013; Mazzola et al., 2013).

Considerando que, para o nosso conhecimento, nenhum estudo até o momento investigou o papel do AP no estresse oxidativo, no presente trabalho, foram investigados os efeitos *in vitro* deste metabólito em alguns parâmetros de estresse oxidativo e avaliada a eficácia do AL contra os possíveis efeitos pró-oxidantes do AP.

Inicialmente, foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx. A enzima SOD é a enzima responsável por dismutar o ânion radical superóxido em H_2O_2 e O_2 (Halliwell and Gutteridge, 2007). No presente estudo, a atividade da SOD foi significativamente aumentada pelo AP *in vitro*. A CAT metaboliza o H_2O_2 em H_2O e O_2 e a GPx remove o H_2O_2 e os hidroperóxidos orgânicos utilizando GSH e selênio como cofatores (Halliwell and Gutteridge, 2007). Nossos resultados mostraram que as atividades da CAT e da GPx foram significativamente diminuídas pela incubação com AP. Desta forma, o aumento da SOD juntamente com a

redução das atividades da CAT e GPx poderiam levar a um acúmulo de H_2O_2 , o que por sua vez é capaz de inativar a CAT e GPx por oxidação de grupos sulfidrílicos essenciais para a catálise, resultando em um ciclo vicioso (Halliwell and Gutteridge, 2007). Também foi demonstrado neste trabalho que a incubação com AL retornou as atividades da CAT e GPx para níveis encontrados no grupo controle. Tem sido demonstrado que o AL é capaz de eliminar diretamente o peróxido de hidrogênio (Packer et al., 1995; Moraes et al., 2010) e além disso, tem a capacidade de aumentar o conteúdo de GSH (Packer et al., 1995; Packer et al., 1997), que é um cofator essencial da GPx, ajudando desta forma a retornar as atividades destas enzimas para os níveis normais. Além disso, a incubação com AL aumentou a atividade da SOD e cabe ressaltar, que o AL sozinho (grupo AL) foi capaz de aumentar a atividade da SOD quando comparado com o controle. Este resultado é consistente com achados prévios utilizando AL como antioxidante (Moraes et al., 2010; Moraes et al., 2013).

A atividade da G6PD, uma enzima da via das pentoses fosfato, desempenha um papel importante na manutenção da homeostase redox da célula (Kletzien et al., 1994) além de protegê-las contra a injúria oxidativa através da produção de NADPH como produto final (Luzatto et al., 2001; Carter et al., 2011), um importante complexo utilizado pela GR para reciclar a GSH a partir da GSSG (Meister, 1988; Zhang et al., 2012). Neste trabalho, a atividade da G6PD foi inibida pela incubação com AP. Este efeito poderia promover uma deficiência na produção de NADPH com consequente dano celular, já que o estado redox da célula estaria prejudicado. A incubação com AL foi capaz de retornar a atividade da G6PD para os níveis encontrados no grupo controle. Portanto, a preservação da atividade da G6PD pelo AL é um importante fator para manter as defesas enzimáticas e não enzimáticas funcionando normalmente. Este resultado corrobora com outros estudos utilizando AL como antioxidante (Moraes et al.,

2010). Por outro lado, a atividade da 6PGD não foi alterada. A atividade da enzima GR também não foi afetada, possivelmente porque o NADPH foi adicionado no meio de reação durante as medidas.

O conteúdo de GSH, a maior defesa antioxidante não enzimática do organismo foi avaliada. A GSH atua protegendo a célula contra o dano oxidativo, eliminando espécies reativas e atuando como cofator de enzimas antioxidantes. Também participa em muitos processos fisiológicos incluindo a sinalização celular e o metabolismo de xenobióticos (Dickinson and Forman, 2002; Dickinson et al., 2003; Marí et al., 2009). Nossos resultados mostraram que o conteúdo de GSH foi significativamente reduzido pela incubação com AP. Como visto acima, a redução da atividade enzimática da G6PD causada pelo AP poderia resultar em uma deficiência na produção de NADPH que é utilizado para produzir GSH a partir da GSSG. A redução nos níveis de GSH poderia comprometer a detoxificação de espécies reativas e poderia exacerbar a inibição da atividade da GPx, já que esta enzima utiliza GSH como cofator (Hashida et al., 2002; Williams and Ford, 2004). Também foi demonstrado que o AL foi capaz de retornar o conteúdo de GSH para níveis normais. Estudos tem demonstrado que o AL e sua forma reduzida, o ADHL, são capazes de aumentar os níveis de GSH (Busse et al., 1992, Wagner et al., 2012) devido a suas habilidades em regenerar o ciclo redox e manter as concentrações de antioxidantes endógenos, como a GSH (Goraca et al., 2011; Grasso et al., 2013).

Outro parâmetro analisado foi a atividade da enzima GST. As GSTs são um grupo multifuncional de enzimas de fase II que catalisam a reação de conjugação da GSH com xenobióticos (Ketterer et al., 1983; Tew and Townsend, 2012) produzindo compostos menos tóxicos e mais fáceis de serem removidos (O'Brien and Tew, 1996). Estas enzimas são importantes para a detoxificação celular de forma a proteger os

tecidos do dano oxidativo. Neste estudo foi demonstrado que a atividade da GST foi inibida pela incubação com AP e esta inibição poderia ser devido à diminuição dos níveis de GSH pela incubação com AP como visto acima, uma vez que a GST utiliza GSH como cofator (Gérard-Monnier and Chaudiere, 1996). Também demonstramos que o AL foi capaz de retornar a atividade da GST para níveis normais. Por outro lado, o conteúdo de sulfidrilas não foi alterado pela incubação com AP.

Finalmente, a influência do AP no dano oxidativo a lipídios foi avaliada. O conteúdo de TBA-RS é um conhecido marcador de lipoperoxidação, permitindo avaliar produtos deste processo, tais como o malondialdeído (Esterbauer and Cheeseman, 1990). Nossos resultados mostraram que os níveis de TBA-RS foram significativamente aumentados pelo AP em sobrenadante de córtex cerebral, demonstrando que o AP é capaz de promover a lipoperoxidação. Os resultados deste estudo sugerem que a incubação com AP leva a um possível aumento de H_2O_2 . Estudos recentes demonstraram que o H_2O_2 pode interagir com lipídios (Manda et al., 2009) e é capaz de induzir a peroxidação lipídica em culturas de linfócitos humanos (Siddique et al., 2012). Além disso, o H_2O_2 pode produzir radical hidroxila (Halliwell and Gutteridge, 2007), que é extremamente reativo e pode atacar os lipídios das membranas celulares (Manda et al., 2009). O presente estudo também mostrou que a incubação com AL foi capaz de prevenir a lipoperoxidação. Este resultado está, provavelmente, relacionado ao fato de ambos AL e ADHL eliminarem diretamente os radicais livres que são responsáveis por desencadear processos de peroxidação lipídica, além de serem capazes de quelar íons metálicos que participam em reações de espécies reativas (Scott et al., 1994; Packer et al., 1995).

Assim, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode-se dizer que a incubação com AP foi capaz de promover estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos

jovens, alterando ambas defesas enzimáticas e não enzimáticas, possivelmente comprometendo a eliminação das espécies reativas, além de induzir a peroxidação lipídica, possivelmente devido ao aumento na geração de espécies reativas (Figura 5, página 56). A incubação com AL demonstrou-se eficaz na melhoria da atividade das enzimas antioxidantes, no aumento das defesas antioxidantes não enzimáticas e na redução do dano lipídico. Estes resultados indicam que o AL poderia ser efetivo para evitar o estresse oxidativo promovido pelo AP, protegendo o cérebro contra o dano oxidativo. Assim, uma terapia antioxidante poderia representar uma nova estratégia terapêutica para o tratamento de desordens que envolvem o acúmulo de AP, porém mais estudos serão necessários para identificar os mecanismos pelos quais o AP induz estresse oxidativo e como o AL previne estes efeitos.

CONCLUSÃO

Conclusão Geral:

No presente trabalho verificou-se que o AP foi capaz de alterar parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos e o AL preveniu estes efeitos.

Conclusões Específicas:

1. Na incubação com AP *in vitro*, foi possível observar que houve alteração em algumas defesas antioxidantes enzimáticas (CAT, GPx, SOD, G6PD e GST), diminuição das defesas antioxidantes não enzimáticas (GSH) e aumento na peroxidação lipídica (TBA-RS). Entretanto, a incubação com AP não foi capaz de alterar as atividades enzimáticas da GR e da 6PGD, nem alterar o conteúdo de sulfidrilas.
2. O AL *in vitro* foi capaz de melhorar a atividade das enzimas antioxidantes (CAT, GPx, SOD, G6PD e GST), aumentar as defesas antioxidantes não enzimáticas (GSH) e diminuir o dano lipídico (TBA-RS).

PERSPECTIVAS

- a) Avaliar outros parâmetros de dano oxidativo proteico.
- b) Analisar possíveis danos ao DNA.
- c) Analisar a formação de espécies reativas como o peróxido de hidrogênio.
- d) Avaliar parâmetros de estresse oxidativo em modelo agudo e crônico de hiperpipecolatemia.
- e) Estudar o efeito do AL em ambos modelos em termos de estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105:121-126.

Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141-145.

Arivazhagan P, Panneerselvam C (2000) Effect of dl- α -lipoic acid on neural antioxidants in aged rats. *Pharmacol Res* 42, 219–222.

Bast A, Haenen GR (2003) Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. *Biofactors* 17: 207-13.

Baxter P (2003) Pyridoxine-dependent seizures: a clinical and biochemical conundrum. *Biochim Biophys Acta* 1647:36-41.

Behl C, Moosmann B (2002) Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med* 33:182-191.

Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences* 65: 1865-1874.

Biewenga GP, Haenen GR, Bast A (1997) The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol* 29:315–331.

Blass JP, Inborn errors of pyruvate metabolism. In: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein J.L., Brown M.S. (Ed.) The metabolic basis of inherited disease. New York: Mc Graw Hill, 1983, 193-203.

Bok LA, Struys E, Willemsen MA, Been JV, Jakobs C (2007) Pyridoxine-dependent seizures in Dutch patients: diagnosis by elevated urinary alpha-amino adipic semialdehyde levels. Arch Dis Child 92:687-9.

Boveris, A (1998) Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. Medicina (Buenos Aires) 58: 350-356.

Braverman NE, D'Agostino MD, Maclean GE (2013) Peroxisome biogenesis disorders: Biological, clinical and pathophysiological perspectives. Dev Disabil Res Rev 17:187-96.

Broquist HP (1991) Lysine-pipecolic acid metabolic relationships in microbes and mammals. Annu Rev Nutr 11:435-448.

Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. Meth Enzymol 108:347-352.

Busse E, Zimmer G, Schopohl B, Kornhuber B (1992) Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo. Arzneimittelforschung 42:829-883.

Calberg I, Manervik B (1985) Glutathione Reductase. *Methods Enzymol* 113:484-49.

Carter N, Pamba A, Duparc S, Waitumbi JN (2011) Frequency of glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency in malaria patients from six African countries enrolled in two randomized anti-malarial clinical trials. *Malar J* 17:10:241.

Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.

Cleveland BM, Kiess AS, Blemings KP (2008) Alpha-amino adipate delta-semialdehyde synthase mRNA knockdown reduces the lysine requirement of a mouse hepatic cell line. *J. Nutr* 138: 2143-7.

Cohen, MV (1989) Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? *Ann Intern Med* 111: 918-931.

Colomé C, Sierra C, Vilaseca MA (2000) Errores congénitos del metabolismo: causa de estrés oxidativo? *Med Clin* 115:111-117.

Cox RP (2001) Errors of Lysine metabolism. In: Scriver CR et al (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of inherited Disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1965-1970.

Dancis J, Hutzler J (1986) The significance of hyperpipecolatemia in Zellweger syndrome. *Am J Hum Genet* 38:707-11.

Deon M. Avaliação de estresse oxidativo em adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X e doenças do espectro Zellweger. Tese de doutorado. 2009.

Dickinson DA, Forman HJ (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64:1019–1026.

Dickinson DA, Moellering DR, Iles KE, Patel RP, Levonen AL, Wigley A, Darley-Usmar VM, Forman HJ (2003) Cytoprotection against oxidative stress and the regulation of glutathione synthesis. *Biol Chem* 384:527–537.

Dröge W (2002) Free radicals in physiology control of cell function. *Physiol. Rev* 82:47-95.

Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407-421.

Ersser RS, Smith I. Aminoacids and related compounds. In: Smith I and Seakins IWT. *Chromatografic and eletrophoretic Techniques*. 4th ed. London: William Heinemann Medical Books Ltd, 1976.

Ezgu F, Eminoglu T, Okur I, Gunduz M, Tumer L, Hasanoglu A, Dalgic B (2011) An infantile case of Zellweger syndrome presented with Kabuki-like phenotype. *Genet Couns* 22:217-20.

Ferreira AL & Matsubara LS (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Ver. Ass. Med. Brasil 43, 61-68.

Fonseca RR, Johnson WE, O'Brien SJ, Vasconcelos V, Antunes A (2010) Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases. BMC Evol Biol 10: 281.

Fridovich I (1975) Superoxide dismutases. Ann Rev Biochem 44: 147-157.

Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. Ann Rev Biochem 64: 97-112.

Gérard-Monnier D, Chaudiere J (1996) Metabolism and antioxidant function of glutathione. Pathol Biol 44:77-85.

Ghibu S, Lauzier B, Delemasure S, Amoureux S, Sicard P, Vergely C, Muresan A, Mogosan C, Rochette L (2009) Antioxidant properties of alpha-lipoic acid: effects on red blood membrane permeability and adaptation of isolated rat heart to reversible ischemia. Mol Cell Biochem. 320:141-8.

Gorąca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B (2011) Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential. Pharmacol Rep 63:849-858.

Grasso S, Bramanti V, Tomassoni D, Bronzi D, Malfa G, Traini E, Napoli M, Renis M, Amenta F, Avola R (2013) Effect of lipoic acid and α -glyceryl-phosphoryl-

choline on astroglial cell proliferation and differentiation in primary culture. *J Neurosci Res* doi: 10.1002/jnr.23289.

Gutierrez MC, Delgado-Coello BA (1989) Influence of pipercolic acid on the release and uptake of [3H] GABA from brain slices of mouse cerebral cortex. *Neurochem Res* 14:405-408.

Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB (1974) Glutathione S-Transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-7139.

Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J, Liu J, Wehr CM, Vinarsky V, Bartholomew JC, Ames AB (1999) (R)- α -lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *Faseb J* 13:411–8.

Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. *Drugs Aging* 18: 685-716.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn. Oxford University Press Inc., New York.

Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damages in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol* 142, 231-255.

Hashida K, Sakakura Y, Makino N (2002) Kinetic studies on the hydrogen peroxide elimination by cultured PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 1572:85-90.

Houten SM, Te Brinke H, Denis S, Ruiten JP, Knecht AC, de Klerk JB, Augoustides-Savvopoulou P, Häberle J, Baumgartner MR, Coşkun T, Zschocke J, Sass JO, Poll-The BT, Wanders RJ, Duran M (2013) Genetic basis of hyperlysinemia. *Orphanet J Rare Dis* 8:57.

Huerta-Olvera SG, Macías-Barragán J, Ramos-Márquez ME, Armendáriz-Borunda J, Díaz-Barriga F, Siller-López F (2010) Alpha-lipoic acid regulates heme oxygenase gene expression and nuclear Nrf2 activation as a mechanism of protection against arsenic exposure in HepG2 cells. *Envir Toxicol Pharmacol* 29:144-149.

Inoue H, Sakata Y, Nishio H, Tokumo K, Kojima E, Date Y, Tamura Y, Tsuruta Y (2011) A simple and highly sensitive HPLC method with fluorescent detection for determination of pipecolic acid in mouse brain areas. *Biol Pharm Bull* 34:287-289.

Joseph MH, Marsden CA. Aminoacids and small peptides. In: Lim CK editor. *HPLC of small molecules*. 1st ed. Oxford, pp. 13-28, 1986.

Ketterer B, Coles B, Meyer DJ (1983) The role of glutathione in detoxication. *Environ. Health Perspect* 49:59-69.

Kienzle-Hagen ME, Pederzolli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wannmacher CM, Wyse AT, Dutra-Filho CS (2002) Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1586:344-352.

Kleinkauf-Rocha J, Bobermin LD, Machado PM, Gonçalves CA, Gottfried C, Quincozes-Santos A (2013) Lipoic acid increases glutamate uptake, glutamine synthetase activity and glutathione content in C6 astrocyte cellline. *Int J Dev Neurosci* 31:165-70.

Kletzien RF, Harris PKW, Foellmi LA (1994) Glucose 6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients and oxidant stress. *Faseb J* 8:174-181.

Kumar S, Suthar R, Sharda S, Panigrahi I, Marwaha RK (2013) Zellweger syndrome: prenatal and postnatal growth failure with epiphyseal stippling. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13:1-4.

Lee PR, Raymond GV (2013) Child neurology: Zellweger syndrome. *Neurology* 80:207-10.

Leong SF, Clark JB (1984) Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem J* 218:131-138.

Lissi E, Caceres T, Videla LA (1986) Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. *Free Radic Biol Med* 2:63-69.

Liu S, Baker JC, Andrews PC, Roche TE (1995) Recombinant expression and evaluation of the lipoyl domains of the dihydrolipoyl acetyltransferase component of the human pyruvate dehydrogenase complex. *Arch Biochem Biophys* 316:926–940.

Lodge L, Handelman GJ, Konishi T, Matsugo S (1997) Natural sources of lipoic acid: Determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection. *J Appl Nutr* 49:3–11.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol. *J Biol Chem* 193:265-275.

Luzzatto L, Mehta A, Vulliamy T (2001) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Scriver CR et al (eds) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol. 3. McGraw Hill, New York, pp 4517–4553.

Manda G, Nechifor MT, Neagu TM (2009) Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. *Current Chemical Biology* 3:342-366.

Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC (2009) Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 11:2685-700.

Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (ed) *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, pp 243-247.

Marks DB, Marks AD, Smith CM (1996) *Basic medical biochemistry*. Williams & Wilkins, Baltimore, 336.

Matalon R, Stumpf DA, Michals K, Hart RD, Parks JK, Goodman SI (1984) Lipoamide dehydrogenase deficiency with primary lactic acidosis: Favorable response to treatment with oral lipoic acid. *J Pediatr* 104:65-69.

Matsumoto S, Yamamoto S, Sai K, Maruo K, Adachi M, Saitoh M, Nishizaki T (2003) Pipecolic acid induces apoptosis in neuronal cells. *Brain Res*. 980: 179-184.

Matsugo S, Bito T, Konishi T (2011) Photochemical stability of lipoic acid and its impact on skin ageing. *Free Radic Res*. 45:918-24.

Mazzola PN, Karikas GA, Schulpis KH, Dutra-Filho CS (2013) Antioxidant treatment strategies for hyperphenylalaninemia. *Metab Brain Dis* 28:541-550.

Mazzola PN, Terra M, Rosa AP, Mescka CP, Moraes TB, Piccoli B, Jacques CE, Dalazen G, Cortes MX, Coelho J, Dutra-Filho CS (2011) Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. *Metab Brain Dis.* 26:291-7.

McGuinness MC, Wei H, Smith KD (2000) Therapeutic developments in peroxisome biogenesis disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 9:1985-92.

McLain AL, Szweda PA, Szweda LI (2011) α -Ketoglutarate dehydrogenase: a mitochondrial redox sensor. *Free Radic Res.* 45: 29-36.

Meister A (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263:17205–17208.

Mihalik SJ, Moser HW, Watkins PA, Danks DM, Poulos A, Rhead WJ (1989) Peroxisomal L-pipecolic acid oxidation is deficient in liver from Zellweger syndrome patients. *Pediatr Res.* 25:548-52.

Mijnhout GS, Alkhalaf A, Kleefstra N, Bilo HJ (2010) Alpha lipoic acid: a new treatment for neuropathic pain in patients with diabetes? *Neth J Med* 68:158-62.

Moini H, Tirosh O, Park YC, Cho KJ & Packer L (2002) R- α -lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys* 397:384–391.

Moraes TB, Jacques CE, Rosa AP, Dalazen GR, Terra M, Coelho JG, Dutra-Filho CS (2013) Role of catalase and superoxide dismutase activities on oxidative stress in the brain of a phenylketonuria animal model and the effect of lipoic acid. *Cell Mol Neurobiol* 33:253-60.

Moraes TB, Zanin F, Rosa A, de Oliveira A, Coelho J, Petrillo F, Wajner M, Dutra-Filho CS (2010) Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *J Neurol Sci* 292:89-95.

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

O'Brien ML, Tew KD (1996) Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Eur J Cancer* 32:967:78.

Packer L, Cadenas E (2011) Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J Clin Biochem Nutr* 48:26-32.

Packer L, Tritschler HJ, Wessel K (1997) Neuroprotection by the metabolic antioxidant alphalipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22:359-78.

Packer L, Witt EH, Tritschler HJ (1995) Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19:227-50.

Pederzolli CD, Rosa AP, de Oliveira AS, Coelho JG, Becker Dda L, Dalazen GR, Moraes TB, Dutra-Filho CS (2010) Neuroprotective role of lipoic acid against acute toxicity of N-acetylaspartic acid. *Mol Cell Biochem* 344:231-9.

Plecko B, Hikel C, Korenke GC, Schmitt B, Baumgartner M, Baumeister F, Jakobs C, Struys E, Erwa W, Stöckler-Ipsiroglu S (2005) Pípecolic acid as a diagnostic marker of pyridoxine-dependent epilepsy. *Neuropediatrics* 36:200-5.

Prohaska J, Oh SH, Hoekstra WG, Ganther HE (1977) Glutathione peroxidase: inhibition by cyanide and release of selenium. *Biochem Biophys Res Commun* 74:64-71.

Roy S, Sen CK, Tritschler HJ, Packer L (1997) Modulation of cellular reducing equivalent homeostasis by alpha-lipoic acid. Mechanisms and implications for diabetes and ischemic injury. *Biochem Pharmacol* 53:393-9.

Sacksteder KA, Biery BJ, Morrell JC, Goodman BK, , Geisbrecht BV, Cox RP, Gould SJ, Geraghty MT (2000) Identification of the alpha-aminoadipic semialdehyde synthase gene, which is defective in familial hyperlysinemia. *Am J Hum Genet* 66:1736-43.

Salinthon S, Schillace RV, Tsang C, Regan JW, Bourdette DN, Carr DW (2011) Lipoic acid stimulates cAMP production via G protein- coupled receptor-dependent and -independent mechanisms. *J Nutr Biochem*. 22:681-90.

Salinthon S, Yadv V, Bourdette DN, Carr DW (2008) Lipoic acid: a novel therapeutic approach for multiple sclerosis and other chronic inflammatory diseases of the CNS. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8:132-42.

Samuel S, Kathirvel R, Jayavelu T, Chinnakkannu P (2005) Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL-a-lipoic acid. *Toxicol Lett* 155:27-34.

Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, Cross CE, Tritschler H, Halliwell B (1994) Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants: A critical evaluation. *Free Rad Res* 20:119-33.

Seminotti B, Fernandes CG, Leipnitz G, Amaral AU, Zanatta A, Wajner M (2011) Neurochemical evidence that lysine inhibits synaptic Na⁺,K⁺-ATPase activity and provokes oxidative damage in striatum of young rats in vivo. *Neurochem Res* 36:205-14.

Seminotti B, Leipnitz G, Amaral AU, Fernandes CG, da Silva Lde B, Tonin AM, Vargas CR, Wajner M (2008) Lysine induces lipid and protein damage and decreases reduced glutathione concentrations in brain of young rats. *Int J Dev Neurosci* 26:693-8.

Sgaravatti A, Magnusson A, Oliveira A, Rosa, A, Mescka CP, Zanin FR, Pederzolli CD, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS (2009) Tyrosine administration decreases glutathione and stimulates lipid and protein oxidation in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis* 24:415–425.

Sgaravatti A, Vargas B, Zandoná B, Deckmann K, , Rockenbach FJ, Moraes TB, Monserrat JM, Sgarbi MB, Pederzoli CD, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS (2008) Tyrosine promotes oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Int J Devl Neuroscience* 26:551-559.

Siddique YH, Ara G, Afzal M (2012) Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. *Dose Response* 10:1-10.

Southorn PA, Powis G (1988) Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin Proc.*, 63:381-389.

Steinberg SJ, Dodt G, Raymond GV, Braverman NE, Moser AB, Moser HW (2006) Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim Biophys Acta* 1763:1733-48.

Tew KD, Townsend DM (2012) Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxid Redox Signal* 17:1728-37.

Thakurta IG, Chattopadhyay M, Ghosh A, Chakrabarti S (2012) Dietary supplementation with N-acetyl cysteine, α -tocopherol and α -lipoic acid reduces the extent of oxidative stress and proinflammatory state in aged rat brain. *Biogerontology* 13:479-88.

Tian WN, Pignatari JN, Stanton RC (1994) Signal transduction proteins that associate with the platelet-derived growth factor (PDGF) receptor mediate the PDGF-induced

release of glucose-6-phosphate dehydrogenase from permeabilized cells. *J Biol Chem* 269:14798–14805.

Tondo M, Calpena E, Arriola G, Sanz P, Martorell L, Ormazabal A, Castejon E, Palacin M, Ugarte M, Espinos C, Perez B, Perez-Dueñas B, Pérez-Cerda C, Artuch R (2013) Clinical, biochemical, molecular and therapeutic aspects of 2 new cases of 2-aminoacidic semialdehyde synthase deficiency. *Mol Genet Metab* 110:231-6.

Wagner AE, Ernst IM, Birringer M, Sancak O, Barella L, Rimbach G (2012) A combination of lipoic acid plus coenzyme Q10 induces PGC1 α , a master switch of energy metabolism, improves stress response, and increases cellular glutathione levels in cultured C2C12 skeletal. *Oxid Med Cell Longev* doi: 10.1155/2012/835970.

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 Inher Metab Dis* 27:427-448.

Wanders RJ (2013) Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. doi: 10.1016/j.biochi.2013.08.022.

Wanders R et al (2001) Single peroxisomal enzyme deficiencies. In: Scriver CR et al (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of inherited Disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 3219-3256.

Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-332.

Williams AC, Ford WCL (2004) Functional Significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm. *Biol Reprod* 71:1309-1316.


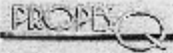
Zhang Z, Yang Z, Zhu B, Hu J, Liew CW, Zhang Y, Leopold JA, Handy DE, Loscalzo J, Stanton RC (2012) Increasing glucose 6-phosphate dehydrogenase activity restores redox balance in vascular endothelial cells exposed to high glucose. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0049128.

Ziegler D, Reljanovic M, Mehnert H, Gries FA (1999) Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trials. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:421-30.

ANEXO I – Lista de figuras

Figura 1. Metabolismo da lisina.....	12
Figura 2. Via da sacaropina.....	13
Figura 3. Via do ácido pipecólico.....	14

ANEXO II – Parecer da Comissão de Ética na Utilização de Animais

	U F R G S UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 23499

Título: Efeitos in vitro do ácido pipecólico sobre parâmetros de estresse oxidativo e a possível prevenção pelo ácido lipico em cérebro de ratos

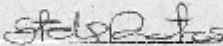
Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CARLOS SEVERO DU FRA FILHO - coordenador desde 01/08/2012
Giovana Reche Dalazon - Aluno de Mestrado desde 01/08/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 07/08/2012 - Sala de Reuniões do 2º andar da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 231 ratos Wistar, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 15 de Agosto de 2012



p/ FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética

1

ANEXO III – Considerações Éticas e tratamento dos resíduos biológicos e químicos

Os resíduos biológicos (luvas, ponteiros, papel higiênico com sangue dos animais) gerados pelos experimentos foram descartados em sacos de lixo branco e posteriormente depositados em recipientes próprios localizados no Departamento de Bioquímica. Esses resíduos eram periodicamente recolhidos por uma empresa especializada, que realiza a autoclavagem antes de serem depositados em aterro sanitário de acordo com as normas vigentes de biossegurança. As agulhas e lâminas de bisturi foram descartadas em caixas amarelas (Descarpack[®]) e as carcaças dos animais foram colocadas em sacos brancos, mantidas em freezer até o recolhimento e, posteriormente, autoclavadas pela empresa especializada, escolhida mediante licitação pela UFRGS para este fim durante o período dos experimentos.

Os resíduos químicos foram separados no laboratório em cinco grupos, de acordo com a seguinte classificação: resíduos orgânicos halogenados, orgânicos não-halogenados, solventes aquosos, solventes orgânicos passíveis de purificação e resíduos sólidos. As embalagens contendo estes resíduos eram periodicamente coletadas e enviadas para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos do Instituto de Química da UFRGS.