

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

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO IN VIVO DO ÁCIDO FITÂNICO SOBRE
PARÂMETROS DE HOMEOSTASE REDOX EM CEREBELO DE RATOS JOVENS

CLARISSA GÜNTHER BORGES
ORIENTADOR: PROF. DR. MOACIR WAJNER

Porto Alegre, 2015

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

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO IN VIVO DO ÁCIDO FITÂNICO SOBRE
PARÂMETROS DE HOMEOSTASE REDOX E IMUNOHISTOQUÍMICA EM
CEREBELO DE RATOS JOVENS**

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

CLARISSA GÜNTHER BORGES
ORIENTADOR: PROF. DR. MOACIR WAJNER

Porto Alegre, 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Borges, Clarissa Gunther
EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO IN VIVO DO ÁCIDO
FITÂNICO SOBRE PARÂMETROS DE HOMEOSTASE REDOX EM
CEREBELO DE RATOS JOVENS / Clarissa Gunther Borges. -
- 2015.
86 f.

Orientador: Moacir Wajner.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Ácido fitânico. 2. Doenças peroxissomais. 3.
Homeostase redox. 4. Astroglíose. 5. Cerebelo. I.
Wajner, Moacir, orient. II. Título.

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

AGRADECIMENTOS

*A Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
pelo ensino gratuito e de qualidade.*

*Ao grupo de Erros Inatos do Metabolismo,
pelos conhecimentos compartilhados e pelo bom convívio.*

*Ao Moacir,
por sempre acreditar em mim e incentivar a pesquisa,
pela sabedoria e pelo carinho.*

*A Carol Fernandes e a Ângela,
por sempre estarem dispostas a ajudar,
por transmitirem conhecimentos e por serem grandes amigas.*

*A Carol Canani,
Por ter me ajudado bastante na realização desse trabalho
e me proporcionado transmitir meus conhecimentos a ela,
e pela amizade.*

*Aos colegas de Laboratório,
por sempre estarem presentes, dispostos a ajudar,
pelas conversas e pelas amizades.*

*A minha família,
Pelo apoio, carinho e compreensão.*

*A minha mãe
Por todo apoio e por sempre acreditar em mim.*

*As minhas irmãs,
Pela amizade e momentos de alegria.*

*Ao Thiago,
Pela presença, apoio e amor.*

Sumário

PARTE I.....	8
RESUMO	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Erros Inatos do Metabolismo.....	14
1.2. Peroxissomos e doenças peroxissomais.....	15
1.3. Ácido fitânico e doenças peroxissomais.....	15
1.3.1. Ácido fitânico.....	15
1.3.2. Doença de Refsum	17
1.3.3. Síndrome de Zellweger	19
1.3.4. Defeito da proteína D-bifuncional	20
1.3.5. Deficiência da α -metil-acil CoA racemase	20
1.3.6. Adrenoleucodistrofia neonatal.....	20
1.3.7. Diagnóstico das doenças com acúmulo do ácido fitânico.....	21
1.3.8. Fisiopatologia das doenças com acúmulo do ácido fitânico	21
1.3.9. Tratamento.....	23
1.4. Radicais Livres.....	23
1.4.1. Definição.....	23
1.4.2. Mecanismos celulares fisiológicos e patológicos induzidos por radicais livres	24
1.5. Defesas antioxidantes.....	25
1.5.1. Defesas antioxidantes não enzimáticas	25
1.5.2. Defesas antioxidantes enzimáticas	26
1.6. Estresse Oxidativo	26
1.7. Susceptibilidade Cerebral ao Dano Oxidativo	27
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos específicos	28
PARTE II.....	30
PARTE III.....	73

III.1. DISCUSSÃO.....	74
III.1.2. Resumo dos resultados.....	79
III.2. CONCLUSÕES.....	80
III.3. PERSPECTIVAS.....	80
III.4. REFERÊNCIAS	81

PARTE I
Introdução e Objetivos

RESUMO

O ácido fitânico (Fit) é um ácido graxo saturado de cadeia ramificada que se acumula em diversas doenças peroxissomais, como na síndrome de Zellweger (SZ) e particularmente na doença de Refsum (DR). Essas doenças podem ocorrer devido a defeitos na biogênese do peroxissomo ou em alguma proteína peroxisomal envolvida na β ou α -oxidação de ácidos graxos. Os pacientes afetados geralmente apresentam disfunções neurológicas, incluindo anormalidades cerebelares. Considerando que a patogênese das alterações cerebelares nas doenças peroxissomais onde o Fit se acumula ainda é pouco conhecida, o presente trabalho se propôs a investigar os efeitos *ex vivo* de injeção intracerebelar aguda do ácido Fit sobre a homeostase redox e imunohistoquímica em cerebelo de ratos jovens. Os parâmetros de estresse oxidativo determinados foram o dano oxidativo lipídico através dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), o dano oxidativo proteico através do conteúdo de sulfidrilas e da formação de carbonilas, as defesas antioxidantes através dos níveis de glutathiona total (tGS) e glutathiona reduzida (GSH) e da atividade das enzimas antioxidantes glutathiona-peroxidase (GPx), glutathiona-redutase (GR), glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT), bem como a produção de espécies reativas através da formação de nitratos e nitritos (produtos do óxido nítrico, NO[•]) e da oxidação de 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA). Além disso, foram feitas análises imunohistoquímicas para avaliar alterações morfológicas, bem como avaliar marcadores de estresse oxidativo no cerebelo dos animais. Nossos resultados demonstraram que o Fit aumentou significativamente a formação de TBA-RS em cerebelo, indicando dano oxidativo lipídico. Além disso, verificamos que os níveis de GSH diminuíram e a produção de óxido nítrico aumentou, demonstrando que esse ácido graxo diminui as defesas antioxidantes e aumenta os níveis de espécies reativas de nitrogênio. Verificamos ainda que a administração prévia de L-NAME preveniu o aumento de TBA-RS e de óxido nítrico, bem como a diminuição de GSH causados pelo Fit em cerebelo. As análises imunohistoquímicas indicaram que o Fit causa astrogliose e dano oxidativo por espécies reativas de nitrogênio, além de

demonstrarem que o L-NAME diminui a astrogliose e o dano oxidativo causados pelo Fit. Em resumo, concluímos que o Fit induz dano oxidativo, diminuição das defesas antioxidantes e astrogliose, provavelmente através do aumento das espécies reativas de nitrogênio. Assim, presumimos que as alterações no estado redox celular podem representar um mecanismo patológico que contribui, pelo menos em parte, para a patofisiologia da DR e de outras desordens em que esse ácido graxo se acumula.

ABSTRACT

The phytanic acid (Phyt) is a branched chain saturated fatty acid that accumulates in various peroxisomal diseases such as Zellweger syndrome (ZS) and particularly in Refsum disease (RD). These diseases may occur due to defects in peroxisome biogenesis or some peroxisomal protein involved in β or α -oxidation of fatty acids. Affected patients usually present neurological disorders, including cerebellar abnormalities. Whereas the pathogenesis of cerebellar changes in peroxisomal diseases where Phyt accumulates is still unknown, the present study aimed to investigate the *ex vivo* effects of an acute intracerebellar injection of Phyt on redox homeostasis and immunohistochemistry in cerebellum of young rats. The oxidative stress parameters determined were the lipid oxidative damage through the levels of thiobarbituric acid (TBA-RS), the protein oxidative damage through the sulfhydryl content and carbonyl formation, antioxidant defenses through the levels of total (tGS) and reduced glutathione (GSH) and activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and the production of reactive species by forming nitrates and nitrites (nitric oxide product, NO) and the oxidation of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). In addition, immunohistochemical analyzes were performed to assess morphological changes and to assess oxidative stress markers in the animals cerebellum. Our results showed that Phyt significantly increased TBA-RS formation in the cerebellum, indicating lipid oxidative damage. In addition, we found that GSH levels decreased and nitric oxide production increased, demonstrating that this fatty acid decreases the antioxidant defenses and increases the levels of reactive nitrogen species. We also found that the prior administration of L-NAME prevented the increase of TBARS and nitric oxide, as well as the decrease of GSH caused by Phyt in cerebellum. Immunohistochemical analyzes indicated that Phyt caused astrogliosis and oxidative damage by reactive nitrogen species, and showed that L-NAME decreased astrogliosis and oxidative damage caused by Phyt. In summary, we conclude that the Phyt induces oxidative

damage, decreased antioxidant defenses and astrogliosis, probably by increasing reactive nitrogen species. Thus, we assume that changes in the cellular redox state can represent a pathological mechanism that contributes at least in part to the pathophysiology of RD and other disorders where this fatty acid accumulates.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACSVL1	Ácido graxo de cadeia muito longa-CoA ligase 1
AMACR	α -metil-acil CoA racemase
CAT	Catalase
Cu-Zn-SOD	Superóxido dismutase contendo Cu e Zn
DBP	Desordem de biogênese peroxissomal
DR	Doença de Refsum
DCFH	2',7'-Diclorofluorosceína diacetato
EIM	Erros inatos do metabolismo
ER	Espécies reativas
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
Fit	Ácido fitânico
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GR	Glutaciona redutase
GFAP	Proteína fibrilar glial ácida
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
L-NAME	L-NG-nitro-arginina metil éster
MK-801	Receptor antagonista não competitivo do NMDA
Mn-SOD	Superóxido dismutase contendo Mn
Prist	Ácido pristânico
SNC	Sistema nervoso central
SZ	Síndrome de Zellweger
SOD	Superóxido dismutase
TBA-RS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
tGS	Glutaciona total

1. INTRODUÇÃO

1.1. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) correspondem a uma classe de distúrbios hereditários que são transmitidos principalmente de forma autossômica recessiva. Foram primeiramente descritos pelo médico britânico Archibald Garrod em 1908. Essas doenças, se consideradas individualmente, são raras, entretanto em seu conjunto atingem 1:1000 nascimentos e são, na maioria das vezes, expressas fenotipicamente no período neonatal. Bioquimicamente, os EIM se caracterizam principalmente pela perda parcial ou total da atividade de uma enzima específica. Além de perda de função enzimática, outros tipos de proteínas, como proteínas estruturais, de transporte e imunoglobulinas, podem ter suas funções alteradas.

Os EIM normalmente se devem a um defeito genético em um único gene que codifica uma proteína específica, geralmente uma enzima a qual converte um determinado substrato em um produto. Com a deficiência da enzima, a mesma não é mais capaz de catalisar a reação, o que pode ocasionar um acúmulo de substâncias tóxicas nos tecidos e líquidos corporais ou a falta de síntese de substâncias essenciais. Essas condições levam a danos no desenvolvimento mental e/ou físico dos indivíduos acometidos por essas doenças (Del Rio, 1962). Outro problema é o aparecimento de outras substâncias possivelmente tóxicas por meio de rotas alternativas do metabolismo da substância acumulada. Os EIM podem ser classificados em quatro grupos, que vão depender da função exercida pela enzima deficiente e do tecido envolvido, bem como dos aspectos bioquímicos, patológicos, clínicos e terapêuticos. Estes grupos são: desordens de transporte, desordens de armazenamento, desordens de síntese e desordens do metabolismo intermediário (Sinclair, 1982).

Atualmente se conhece o defeito bioquímico de mais de 600 EIM, sendo que a maioria deles envolve processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Scriver et al., 2001). Os pacientes acometidos por essas doenças possuem uma sintomatologia muito variada e inespecífica, mesmo entre aqueles com o mesmo EIM. Essa variabilidade se deve às diferentes áreas do metabolismo e aos tecidos afetados, bem como aos diferentes graus de deficiência enzimática. Os sintomas mais comuns nos pacientes afetados por essas doenças

envolvem o sistema nervoso central (SNC), onde retardo neuropsicomotor e neurodegeneração progressiva são as características predominantes (Burton, 1987).

1.2. Peroxissomos e doenças peroxissomais

Os peroxissomos são organelas presentes em praticamente todas as células eucariotas. Na maioria das células humanas, sua presença pode variar de menos de cem a mais de mil peroxissomos por célula, sendo que na maioria das células há centenas de peroxissomos. O peroxissomo contém mais de 50 enzimas, contribuindo com múltiplas rotas bioquímicas de síntese e de catabolismo, sendo que a maioria está envolvida no metabolismo intermediário de lipídeos (Braverman et al., 2013). Dentre estes processos estão inclusos a β e α -oxidação de certos ácidos graxos e também a biossíntese de fosfolipídeos, ácidos biliares e compostos isoprenoides (Scriver et al., 2001). Essa organela possui enzimas envolvidas na detoxificação de espécies reativas e representa um dos principais sítios na célula onde radicais de oxigênio são gerados e eliminados (Yeldandi et al., 2000; Wanders e Waterham, 2006).

As doenças peroxissomais constituem o grupo de EIM onde há alterações nessa organela. A incidência estimada dessas desordens é de 1:20.000 a 1:100.000 nascidos vivos. Elas são divididas em dois grupos: 1) defeitos com alteração em uma única proteína envolvida na β ou α -oxidação e 2) doenças hereditárias causadas por defeitos na biogênese peroxissomal. O ácido fitânico (Fit) se acumula em diversas dessas doenças hereditárias (Scriver et al., 2001; Veldhoven, 2010; Wanders et al., 2011; Braverman et al., 2013).

1.3. Ácido fitânico e doenças peroxissomais

1.3.1. Ácido fitânico

O Fit (ácido 3,7,11,15-tetrametilhexadecanóico) é um ácido graxo saturado de cadeia lateral ramificada derivado de fontes exógenas, tanto o próprio Fit como o seu precursor fitol. O fitol é um constituinte obrigatório da clorofila presente nas folhas verdes de plantas e árvores. O sistema digestivo humano não é capaz de clivar o fitol a partir do anel de porfirina da clorofila, mas as bactérias, encontradas no rúmen de animais ruminantes, podem metabolizar a clorofila, liberando fitol que é então

convertido em Fit. Esse ácido graxo, portanto, é proveniente da dieta, principalmente de carne e laticínios. O Fit pode também ser proveniente de óleos, gorduras e leite derivados de espécies marinhas, já que espécies de fitoplâncton possuem clorofila (Wanders et al., 2011).

O Fit é primeiramente ativado a fitanoil-CoA, que então entra no peroxissomo a partir da proteína carreadora de esteróis 2. O metabolismo peroxissomal do Fit ocorre por α -oxidação principalmente nos rins e no fígado, onde atuam quatro enzimas que transformam o Fit em ácido pristânico (ácido 2,6,10,14-tetrametil pentadecanoico, Prist) (Figura 1). O Prist é posteriormente degradado através de três ciclos da β -oxidação peroxissomal, seguido pela β -oxidação mitocondrial (Wanders e Komen, 2007; Wierzbicki e Lloyd, 2007). O primeiro passo na degradação do Fit é a sua ativação a fitanoil-CoA, a qual pode ocorrer na mitocôndria, no retículo endoplasmático e nos peroxissomos. Duas enzimas da família das acil-CoA sintetases participam dessa ativação, a ácido graxo de cadeia longa-CoA ligase 1 (localizada na mitocôndria, no retículo endoplasmático e no citosol) e a ácido graxo de cadeia muito longa-CoA ligase 1 (ACSVL1) (localizada no retículo endoplasmático e no peroxissomo). O fitanoil-CoA ativado então entra no peroxissomos, e segue a α -oxidação. A enzima fitanoil-CoA 2-hidroxilase catalisa o segundo passo da α -oxidação, formando 2-hidroxifitanoil-CoA. A 2-hidroxiacil-CoA liase catalisa a quebra de 2-hidroxifitanoil-CoA em pristanal e formil-CoA. No último passo da rota da α -oxidação, o pristanal é convertido a Prist pela pristanal desidrogenase. A quebra posterior do Prist requer a sua ativação a pristanoil-CoA, e a provável enzima envolvida nesse processo é a ACSVL1. O pristanoil-CoA produzido pelos peroxissomos ou obtido do citosol começa sua degradação no peroxissomo, onde passa por três ciclos de β -oxidação, e os produtos finais da β -oxidação peroxissomal são subseqüentemente enviados para a mitocôndria, onde seguem a β -oxidação mitocondrial (Verhoeven e Jakobs, 2001; Wanders et al., 2011).

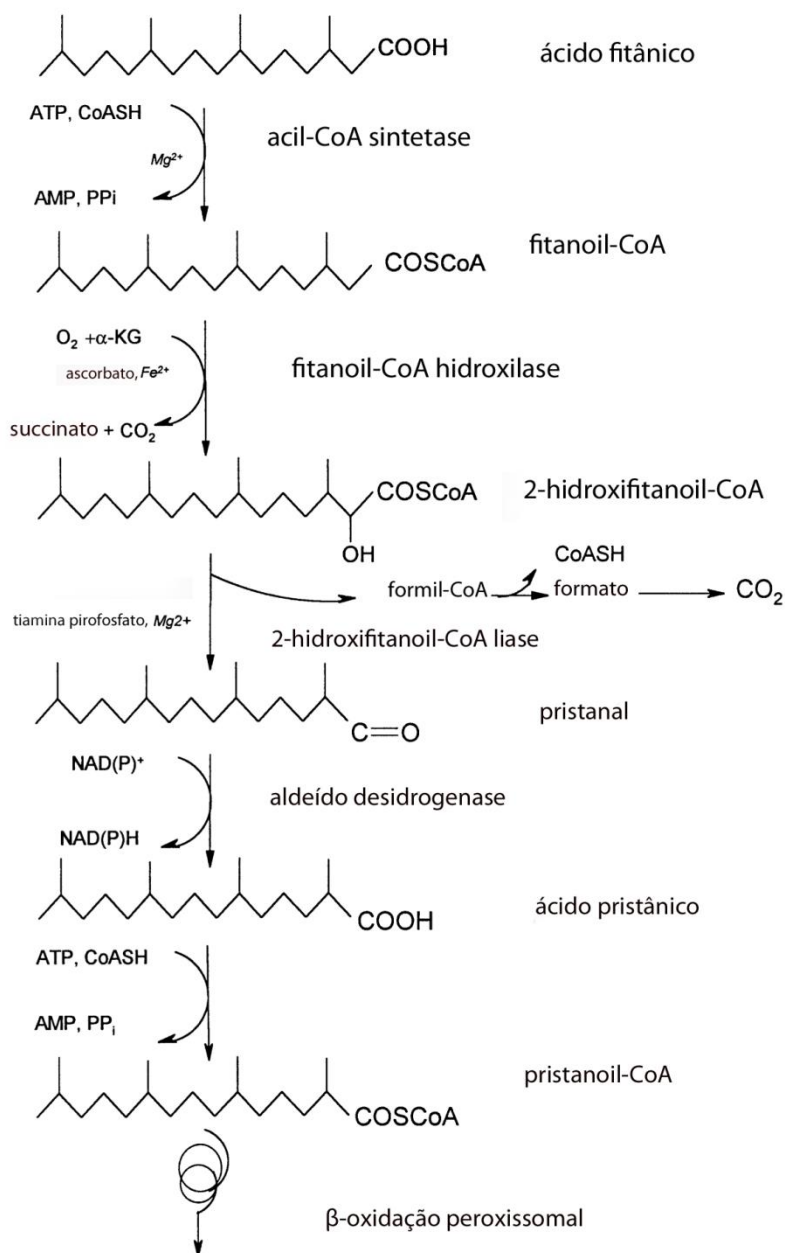


Figura 1. α -Oxidação peroxissomal. Adaptado de Verhoeven e Jakobs 2001.

1.3.2. Doença de Refsum

A doença de Refsum (DR) apresenta uma forma clássica e uma adulta (OMIM 26650) e é uma doença neurometabólica rara caracterizada por um defeito na α -oxidação peroxissomal de ácidos graxos de cadeia ramificada. O dano ocorre devido a um defeito no gene estrutural que codifica a enzima fitanoil-CoA hidroxilase, levando ao acúmulo de Fit nos tecidos e nos líquidos biológicos dos pacientes. Essa enzima

catalisa o primeiro passo da α -oxidação peroxissomal, convertendo fitanoil-CoA em 2-hidroxi-fitanoil CoA (Reiser et al., 2005, Wierzbicki e Lloyd, 2007). Com o bloqueio na atividade da enzima, as concentrações plasmáticas de Fit nos pacientes podem atingir até 5000 μ M, comparado com níveis de até 30 μ M em indivíduos normais (Wanders et al., 2003).

Os pacientes acometidos pela DR clássica apresentam sintomatologia variada, que normalmente inicia na infância, sendo por isso também chamada de DR infantil. Os principais sinais clínicos são neurológicos e incluem retinite pigmentosa, polineuropatia periférica, convulsões e disfunção cerebelar. Achados menos comuns incluem arritmias cardíacas, déficits auditivo e olfatório, ictiose, perda de visão, distúrbios psiquiátricos e proteinúria. Todos os pacientes afetados apresentam sinais de degeneração da retina (retinite pigmentosa), sendo considerado o mais importante sintoma inicial da doença, o qual precede até mesmo os achados bioquímicos característicos. Essa degeneração retinal característica parece ser devida ao acúmulo excessivo de Fit no tecido ocular. Exames patológicos revelam uma perda quase completa dos fotorreceptores, afinamento da camada nuclear interna e redução no número de células ganglionais da retina. A neuropatia periférica afeta a parte motora e sensorial, sendo caracterizada por fraqueza e atrofia muscular e distúrbios sensoriais. Estes sintomas, ao contrário da retinite, podem não ser detectados no início da doença. Já as disfunções cerebelares, que são bem estabelecidas nos pacientes, incluem ataxia e tremores (Wierzbicki, 2007, Wierzbicki e Lloyd, 2007).

Na infância (DR infantil), os sintomas clínicos incluem retardo psicomotor, hipotonia, perda de visão pela degeneração retinal e perda sensoroneural da audição (Braverman et al., 2013). Já a DR adulta, diferentemente da DR infantil, geralmente inicia na infância tardia com progressiva deterioração da visão noturna, retinite pigmentosa progressiva e anosmia. A anosmia é uma característica constante na DR adulta. Após 10 a 15 anos podem surgir disfunções de surdez, ataxia, polineuropatia e arritmias cardíacas (Wierzbicki, 2007).

1.3.3. Síndrome de Zellweger

A síndrome de Zellweger (SZ) (OMIM 214100) constitui-se em um grupo de desordens com diferentes defeitos genéticos que apresentam em comum a ausência de peroxissomos funcionais, levando a várias anormalidades bioquímicas, bem como sintomas clínicos variáveis (Verhoeven e Jakobs, 2001; Braverman, 2013). Ela é uma desordem hereditária autossômica recessiva fatal, sendo a desordem de biogênese peroxissomal (DBP) que apresenta fenótipo clínico mais severo (Rafique et al., 2013). As DBPs são causadas por uma mutação em qualquer um dos genes PEX que codificam as proteínas peroxinas, as quais são necessárias para a formação de importantes proteínas na matriz e na membrana peroxissomal, que por sua vez importam proteínas a serem metabolizadas nos peroxissomos (Müller et al., 2010). Mutação no gene PEX 1 é a causa mais comum de DBP e é uma das principais causas de SZ (Poll-The et al., 2004).

A SZ é caracterizada por malformações que afetam o desenvolvimento do cérebro, do fígado, dos rins e do esqueleto. Crianças com essa doença têm má alimentação, problemas de crescimento e morte precoce, normalmente morrendo no primeiro ano de vida. Os pacientes também apresentam anormalidades craniofaciais e estruturais no sistema nervoso central e periférico, hipotonia profunda, convulsões neonatais, retardo psicomotor, atrofia ótica, retinopatia e deficiência auditiva neurossensorial. Os pacientes podem também apresentar hepatomegalia, elevados níveis de enzimas hepáticas e alto nível de ácidos graxos de cadeia muito longa no plasma e nos fibroblastos, bem como baixos níveis de fosfolípidos de éter nos glóbulos vermelhos (Krause et al., 2009, Rafique et al., 2013). Por outro lado, alguns defeitos da biogênese peroxissomal podem ocasionar sintomas menos severos, como retardo psicomotor e disfunção neurológica leve, aumentando a expectativa de vida que pode ser de mais de 10 anos, diferentemente das formas mais graves da SZ, na qual os pacientes costumam ter um período de sobrevivência menor do que um ano. No plasma dos pacientes afetados pela SZ, o Fit está presente em concentrações elevadas, podendo atingir níveis plasmáticos superiores a 500 µM (Scriver et al., 2001, Verhoeven e Jakobs, 2001, Ferdinandusse et al., 2002).

1.3.4. Defeito da proteína D-bifuncional

A proteína multifuncional-2, também conhecida como proteína D-bifuncional (OMIM 261515), catalisa reações de degradação de ácidos graxos de cadeia ramificada, como o Fit e o Prist, e intermediários de ácidos biliares. Essa proteína catalisa a segunda (hidratação) e a terceira (desidrogenação) etapa dessa rota de degradação (Baes et al., 2000). A deficiência da proteína D-bifuncional pode ser classificada em 3 tipos: tipo I com deficiência das unidades hidratase e desidrogenase, tipo II com deficiência isolada na hidratase e tipo III com deficiência isolada na desidrogenase (Khan et al., 2010). Os pacientes portadores dessa desordem morrem normalmente no primeiro ano de vida. As principais alterações clínicas são hipotonia, dismorfismo facial, atraso psicomotor, convulsões neonatais, defeitos de migração neonatal ou desmielinização (Möller et al., 2001). Os pacientes acometidos pela deficiência da proteína D-bifuncional acumulam ácidos graxos de cadeia muito longa, intermediários dos sais biliares, Prist (até 80 μM em plasma) e/ou Fit (mais de 190 μM em plasma) (Verhoeven e Jakobs, 2001, Ferdinandusse et al., 2002).

1.3.5. Deficiência da α -metil-acil CoA racemase

A deficiência da α -metil-acil CoA racemase (AMACR) (OMIM 604489) é uma doença rara causada pelo acúmulo de R-isômeros de Prist e de intermediários de sais biliares. A idade do aparecimento dos sintomas é variável, indo da infância até a idade adulta, e a mutação predominante da enzima é a c.154T>C (Smith et al., 2010). Essa doença afeta principalmente adultos, e os pacientes acometidos pela AMACR apresentam neuropatia periférica que afeta a parte motora e sensorial (Setchell et al., 2003). Nos portadores observa-se acúmulo no plasma de Fit (25 μM) e de Prist (300 μM), bem como de intermediários de sais biliares (Ferdinandusse et al., 2002).

1.3.6. Adrenoleucodistrofia neonatal

A adrenoleucodistrofia neonatal (OMIM 202370) é uma desordem de defeitos da biogênese peroxissomal e pertence às DBP de espectro Zellweger que inclui a SZ e a DR infantil. Essa doença pode resultar de mutações em diversos genes envolvidos na

biogênese peroxissomal, como os genes PE formadores das peroxinas. É uma desordem que leva à desmielinização difusa, afetando cérebro e cerebelo, causando leucodistrofia progressiva, hipotonia, perda de audição, retinopatia, retardo no desenvolvimento psicomotor, convulsões e problemas cardíacos. É uma doença menos severa que a SZ e os pacientes normalmente morrem na infância. Há presença de níveis elevados de Fit, ácidos graxos de cadeia muito longa, ácidos biliares e ácido piperólico nos líquidos e tecidos biológicos dos portadores da doença (Poll-The et al., 2004).

1.3.7. Diagnóstico das doenças com acúmulo do ácido fitânico

O diagnóstico bioquímico das desordens metabólicas onde há acúmulo de Fit é feito através de cromatografia gasosa para a medição da concentração plasmática desse ácido graxo. No caso de defeito nos processos de α ou β oxidação, também pode ser feita a medida da atividade da enzima defeituosa em fibroblastos. A medida da concentração de outros compostos que possam estar acumulados nas doenças com acúmulo de Fit, como Prist e ácidos graxos de cadeia muito longa, também pode auxiliar no diagnóstico (Ferdinandusse et al., 2002, Müller et al., 2010, Smith et al., 2010).

1.3.8. Fisiopatologia das doenças com acúmulo do ácido fitânico

Os mecanismos fisiopatogênicos do dano cerebral e principalmente cerebelar dos pacientes acometidos por doenças peroxissomais onde há o acúmulo de Fit estão pouco esclarecidos. Entretanto, existem evidências de uma ação tóxica desse ácido e de seu envolvimento nos sintomas clínicos dos pacientes afetados por essas patologias.

Um estudo realizado recentemente estabeleceu um modelo genético nocaute do gene codificante da proteína PEX13 para a SZ em camundongos e foi possível observar nesse modelo estresse oxidativo, morte neuronal e anormalidades cerebelares (Müller et al., 2010). Um modelo nocaute de camundongos para a proteína D-bifuncional também foi desenvolvido e foi observado que os animais apresentaram retardo severo no crescimento nas primeiras semanas de vida, levando a morte

prematura de aproximadamente 1/3 dos animais (Baes et al., 2000). Outro estudo realizado recentemente mostrou alterações patogênicas em um modelo animal da DR através de uma linhagem de camundongos nocaute para a enzima fitanoil-CoA hidroxilase, no qual os animais foram submetidos a uma dieta suplementada com fitol (precursor do Fit). Foi possível verificar neuropatia periférica e ataxia cerebelar com perda das células de Purkinje (Ferdinandusse et al., 2008). Estudos cerebrais de pacientes portadores da DR infantil também demonstram um número reduzido de neurônios e atrofia cerebelar, podendo haver heterotopia das células de Purkinje e olivas displásticas (Barth, 2004).

Também foi demonstrado que o Fit está envolvido na indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), levando a morte celular apoptótica via ativação e secreção de fator de necrose tumoral α (Idel et al., 2002). Além disso, foi verificado que o Fit induz geração substancial de espécies reativas de oxigênio (ERO) em mitocôndrias isoladas e em células intactas (Reiser et al., 2005). Nosso grupo demonstrou recentemente que o Fit reduz as defesas antioxidantes e induz dano oxidativo *in vitro* em córtex e cerebelo de ratos jovens (Leipnitz et al., 2010). Também foi verificado que o Fit causa comprometimento do metabolismo energético mitocondrial com envolvimento de estresse oxidativo em cérebro, cerebelo e coração de ratos jovens (Grings et al., 2012; Schönfeld et al., 2006; Busanello et al., 2010; Busanello et al., 2013 a,b). Foi observado também que o Fit provoca morte celular astrocitária de culturas de hipocampo de ratos (Kahlert et al., 2005). Além disso, foi demonstrado que houve dano oxidativo a lipídeos e ao DNA em plasma e em urina de pacientes portadores da deficiência da enzima D-bifuncional (Ferdinandusse et al., 2003). Também foi verificado um desequilíbrio entre a produção de H_2O_2 e a atividade da enzima catalase (responsável pela degradação do peróxido) em fibroblastos de pacientes.

Esses estudos realizados *in vitro* indicam que o Fit pode alterar o metabolismo energético mitocondrial e induzir a produção de ER, sendo então essas alterações patológicas consideradas possíveis mecanismos de toxicidade em pacientes portadores de doenças peroxissomais onde ocorre o acúmulo do Fit. Os mecanismos

fisiopatogênicos exatos pelos quais esse ácido graxo intermedeia esses efeitos tóxicos são, entretanto, ainda pouco conhecidos.

1.3.9. Tratamento

Como o Fit é obtido exclusivamente da dieta, principalmente de alimentos como carne e derivados do leite, o tratamento da DR e da AMACR baseia-se principalmente na restrição dietética desse ácido graxo ou na sua eliminação através de plasmaferese ou aferese (Ferdinandusse et al., 2002; Smith et al., 2010, Wierzbicki, 2007). Diversos pacientes submetidos a esse tratamento obtiveram diminuição das concentrações de Fit e melhora nos sintomas, porém no início do tratamento os níveis de Fit podem aumentar pela mobilização das reservas teciduais de gordura pela diminuição da ingesta (Baldwin et al., 2010; Scriver et al., 2001). Desse modo, é necessário um rigoroso controle da ingesta calórica juntamente com a restrição de Fit a fim de evitar uma excessiva mobilização de gordura e um conseqüente aumento nos níveis de Fit. É importante ressaltar que, apesar de este tratamento ser benéfico aos pacientes, ele não pode ser considerado um tratamento efetivo, já que os mecanismos patológicos envolvidos com as doenças em que o Fit se acumula não estão bem esclarecidos.

1.4. Radicais Livres

1.4.1. Definição

Radicaís livres são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e que têm a capacidade de existir de forma independente (Southorn e Powis, 1988; Halliwell e Gutteridge, 2007). Essas espécies possuem uma alta reatividade devido ao desemparelhamento de elétrons, o qual deixa a molécula energeticamente instável. Os radicaís livres podem ser formados através de duas maneiras: ganho de um elétron por uma molécula não-radical ou perda de um elétron de uma molécula não-radical. Outra possível maneira é por meio de uma fissão homolítica, onde uma ligação covalente é quebrada e cada átomo envolvido fica com um dos elétrons compartilhados (Halliwell e Gutteridge, 2007). Um radical livre pode gerar outro radical livre ao reagir com uma molécula não-radical; a presença de um

único radical livre pode, então, iniciar uma sequência de reações em cadeia de transferência de elétrons (redox) (Maxwell, 1995). Nessas reações redox, um radical livre leva a formação de um outro radical livre, que poderá reagir com uma outra molécula e gerar outro radical livre, e assim por diante.

No metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente aceitando quatro elétrons, que resulta na formação de água (H_2O). Aproximadamente 5% do O_2 usado na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, porém, não é completamente reduzido a H_2O , podendo ser convertido em intermediários reativos de O_2 , como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e a hidroxila (OH^{\cdot}), bem como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em condições patológicas, esse processo pode ser aumentado ocasionando danos a células e a seus componentes celulares (Boveris e Chance, 1973).

Os radicais originados pela redução de oxigênio ($O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot}) e os não radicais derivados de O_2 , como o oxigênio singlete e o H_2O_2 são chamados genericamente de ERO (Halliwell e Gutteridge, 2007). Existem também espécies reativas de nitrogênio (ERN), cujos principais representantes são o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$).

1.4.2. Mecanismos celulares fisiológicos e patológicos induzidos por radicais livres

As ERO e ERN ocorrem em processos fisiológicos e patológicos. Elas possuem várias funções fisiológicas, como regulação do tônus vascular e monitoramento da tensão de O_2 no controle da ventilação e na produção de eritropoietina (Dröge, 2002; Bergendi et al., 1999). Um aumento na liberação local de radicais livres, portanto, pode ser benéfico, que é o caso da liberação local de espécies tóxicas oxidantes pelos neutrófilos, as quais podem atuar na defesa do hospedeiro contra uma infecção (Delanty e Dichter, 1998). Os radicais livres também podem participar da sinalização celular e da síntese e regulação de algumas proteínas (Ward e Peters, 1995). Apesar de possuírem papéis fisiológicos, essas espécies reativas podem oxidar moléculas biológicas como proteínas, lipídeos e DNA (Maxwell, 1995). Dentre os efeitos prejudiciais que os radicais livres podem causar ao organismo estão a lipoperoxidação,

onde os radicais podem causar oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e de lipídeos de membranas biológicas; a oxidação de proteínas, levando à inativação das mesmas; a oxidação de DNA e de RNA, levando a mutações somáticas e a distúrbios na transcrição (Delanty e Dichter, 1998); entre outros danos.

1.5. Defesas antioxidantes

Antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que reduzem a formação de radicais livres ou reagem com os mesmos, neutralizando-os. A célula pode se proteger contra o dano oxidativo através de antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos. Embora diferindo na composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo e compreendem agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), entre outras; proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo) ao se ligarem aos mesmos, como as transferrinas; proteínas que protegem biomoléculas de danos (incluindo dano oxidativo) por outros mecanismos; agentes de baixo peso molecular que aprisionam ERO e ERN, como a glutathione reduzida (GSH), α -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina.

1.5.1. Defesas antioxidantes não enzimáticas

As defesas antioxidantes não enzimáticas podem ser separadas em dois grandes grupos: agentes hidrossolúveis e lipossolúveis. O primeiro grupo inclui GSH, ácido ascórbico, ácido úrico, melatonina, os cofatores selênio e coenzima Q10 e as proteínas plasmáticas. O tripeptídeo GSH é um dos mais efetivos e abundantes antioxidantes contra ERO, particularmente no cérebro, onde as concentrações alcançam 1-10 mmol / L (Bast, 1993). A GSH atua mantendo o equilíbrio redox na célula e inativando as ERO. O ácido ascórbico também parece ser muito importante no cérebro, porque as células neurais têm um sistema de captação altamente eficiente e os níveis de ácido ascórbico no líquido cérebro espinhal são muito mais altos do que no plasma (Lonnrot et al., 1996). Os agentes antioxidantes lipossolúveis, incluindo α -

tocopherol, β -caroteno, bilirrubina, são mais efetivos no combate contra lipoperoxidação. Outros agentes antioxidantes não enzimáticos incluem flavonóides, licopenos, quelantes de metais e precursores endógenos de antioxidantes, como N-acetilcisteína.

1.5.2. Defesas antioxidantes enzimáticas

A atividade de enzimas antioxidantes também é importante para a detoxificação de radicais livres. Alguns exemplos de defesas antioxidantes enzimáticas são as isoenzimas da SOD contendo cobre e zinco (Cu, Zn-SOD) ou magnésio (Mn-SOD), a CAT, a GPx, a glutathione redutase (GR) e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Qualquer desequilíbrio nesse sistema pode levar a um aumento de radicais livres derivados de O_2 . As isoenzimas Cu, Zn-SOD e Mn-SOD estão presentes no citosol e nas mitocôndrias cerebrais, e, juntamente com a GSH, representam a defesa mais importante contra a toxicidade do $O_2^{\cdot-}$. As isoformas da SOD geram H_2O_2 , que é removido pela GPx combinada com GSH, ou pela enzima CAT ou adicionalmente por outras peroxidases, como as da família das peroxiredoxinas (Chae *et al.*, 1999).

1.6. Estresse Oxidativo

Espécies reativas são necessárias para a função normal da célula, servindo como moléculas de sinalização para importantes papéis fisiológicos. Elas são continuamente produzidas e neutralizadas por sistemas de defesa antioxidante. No entanto, quando produzidos em altas concentrações ou quando as defesas antioxidantes estão deficientes, as espécies reativas podem causar dano celular. Se o aumento de espécies reativas é relativamente pequeno, a resposta antioxidante será suficiente para compensar esse aumento. No entanto, sob certas condições patológicas, a produção de espécies reativas está muito mais aumentada, e as defesas antioxidantes podem ser insuficientes para restabelecer a homeostase redox.

O rompimento entre o equilíbrio pró-oxidante e antioxidante é descrito como estresse oxidativo, e pode representar um mecanismo fundamental de doenças humanas (Sies, 1985; Halliwell e Gutteridge, 2007). Assim, o termo “Estresse Oxidativo” é usado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas

ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis. Pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a combinação de quaisquer desses fatores (Halliwell, 2001).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular. Quando ocorre adaptação, as células podem em geral tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em *upregulation* da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço oxidante/antioxidante. Apesar disso, nem sempre o estresse oxidativo precisa envolver defesas antioxidantes aumentadas. No dano celular, o estresse oxidativo pode danificar todos os alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A resposta ao dano pode ser reversível: a célula entra em *steady state* alterado temporário ou prolongado que não leva à morte celular. A morte celular pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose. Na morte celular por necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. Pode haver a liberação de antioxidantes, como a CAT e a GSH, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e as proteínas do grupo HEME, agentes esses que podem afetar as células adjacentes, podendo até mesmo impor a elas um estresse oxidativo. Já na apoptose, o mecanismo intrínseco de suicídio celular é ativado, e não há a liberação do conteúdo celular. A morte celular por apoptose pode ser acelerada em certas doenças, como as desordens neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Além da indução de necrose e apoptose, o estresse oxidativo pode levar a um aumento da lipoperoxidação, cujos produtos [malondialdeído e 4-hidroxinonenal, entre outros] são altamente neurotóxicos, e a um dano oxidativo tanto a proteínas, inibindo a atividade de diversas enzimas e alterando a função celular, quanto ao DNA, causando alteração de bases púricas e pirimídicas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

1.7. Susceptibilidade Cerebral ao Dano Oxidativo

O cérebro é altamente dependente de energia para o seu funcionamento normal, e a mitocôndria é a estrutura intracelular responsável pela produção dessa energia.

Para a produção eficiente de energia na forma de ATP, a mitocôndria possui uma alta demanda por O₂, já que utiliza uma grande quantidade de O₂ em uma massa de tecido relativamente pequena, o que torna esse tecido altamente susceptível à ação de espécies reativas.

Além disso, a presença de membranas celulares ricas em ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada, os quais são especialmente sensíveis ao ataque de radicais livres e a uma consequente oxidação de lipídeos, pode levar ao dano por radicais livres no tecido cerebral. O alto conteúdo de ferro, que favorece a lipoperoxidação e a autooxidação de neurotransmissores através do radical OH[•] formado na reação de Fenton (Zaleska e Floyd, 1985), a considerável quantidade de microglia e de macrófagos residentes do sistema nervoso que podem produzir O₂^{•-} e H₂O₂ e a sua modesta defesa antioxidante, sendo os níveis de CAT particularmente baixos em muitas regiões cerebrais (Halliwell, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2007), aumentam a suscetibilidade do cérebro ao dano causado por radicais livres.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos da administração intracerebelar *in vivo* do Fit sobre importantes parâmetros da homeostase redox em cerebelo de ratos jovens, visando uma melhor compreensão dos mecanismos tóxicos desse ácido graxo sobre o cerebelo de ratos jovens.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da administração intracerebelar do Fit em cerebelo de ratos de 30 dias sobre os parâmetros de:
 - Oxidação de lipídeos (níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico);
 - Oxidação de proteínas (formação de carbonilas e o conteúdo de sulfidrilas);

- Defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e glicose 6-fosfato desidrogenase) e não enzimáticas (glutathione reduzida);
- Produção de radicais livres (formação de óxido nítrico e oxidação de DCFH);
- Detecção de GFAP (proteína fibrilar glial ácida) e imunoc conteúdo de nitrotirosina por imunohistoquímica.

PARTE II
Artigo Científico

Capítulo I

Reactive nitrogen species mediate oxidative stress and astrogliosis provoked by in vivo administration of phytanic acid in cerebellum of adolescent rats: a potential contributing pathomechanism of cerebellar injury in peroxisomal disorders

Clarissa Günther Borges, Caroline Rossi Canani, Carolina Gonçalves Fernandes, Ângela Zanatta, Bianca Seminotti, César Augusto João Ribeiro, Guilhian Leipnitz, Carmen Regla Vargas, Moacir Wajner

Artigo científico submetido para a revista científica Neuroscience

Reactive nitrogen species mediate oxidative stress and astrogliosis provoked by in vivo administration of phytanic acid in cerebellum of adolescent rats: a potential contributing pathomechanism of cerebellar injury in peroxisomal disorders

Clarissa Günther Borges^a, Caroline Rossi Canani^a, Carolina Gonçalves Fernandes^a,
Ângela Zanatta^a, Bianca Seminotti^a, César Augusto João Ribeiro^a, Guilhian Leipnitz^a,
Carmen Regla Vargas^{b,c}, Moacir Wajner^{a,b}

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

^bServiço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

^cDepartamento de Análises, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

***Corresponding author:** Moacir Wajner, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS – Brasil. Phone: +55 51 3308-5571, fax: +55 51 3308-5540, e-mail: mwajner@ufrgs.br

Abstract

Phytanic acid (Phyt) accumulates in various peroxisomal diseases including Refsum disease (RD) and Zellweger syndrome (ZS). Since the pathogenesis of the neurological symptoms and especially the cerebellar abnormalities in these disorders are poorly known, we investigated the effects of *in vivo* intracerebral administration of Phyt on a large spectrum of redox homeostasis parameters in cerebellum of young rats. Malondialdehyde (MDA) levels, sulfhydryl oxidation, carbonyl content, nitrite and nitrate concentrations, 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) oxidation, total (tGS) and reduced glutathione (GSH) levels and the activities of important antioxidant enzymes were determined at different periods after Phyt administration. Immunohistochemical analysis was also carried out in cerebellum. Phyt significantly increased MDA and nitric oxide (NO) production and decreased GSH levels, without altering tGS, DCFH oxidation, sulfhydryl oxidation, carbonyl content and the activities of GPx, SOD, CAT, GR and G6PD. Furthermore, immunohistochemical analysis revealed that Phyt caused astrogliosis and protein nitrosative damage in cerebellum. It was also observed that the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME prevented the increase of MDA and NO production as well as the decrease of GSH and the immunohistochemical alterations caused by Phyt, strongly suggesting that reactive nitrogen species (RNS) were involved in these effects. The present data provide *in vivo* solid evidence that Phyt disrupts redox homeostasis and causes astrogliosis in rat cerebellum probably mediated by RNS production. It is therefore presumed that disequilibrium of redox status may contribute at least in part to the cerebellum alterations characteristic of patients affected by RD and other disorders with Phyt accumulation.

Key words: phytanic acid, peroxisomal disorders, redox homeostasis, astrogliosis, cerebellum.

1. Introduction

Phytanic acid (3,7,11,15-tetramethylhexadecanoic acid, Phyt) is derived from chlorophyll, which is generated in the gastrointestinal system of ruminants by chlorophyll break, releasing phytol which is then converted into Phyt. Dairy products (milk, cheese) and red meat (cow and sheep) are rich sources of Phyt. This fatty acid accumulates in various peroxisomal disorders, such as Refsum's disease (RD), Zellweger syndrome (ZS), rhizomelic chondrodysplasia punctate type I and α -methylacyl-CoA racemase (Wierzbicki, 2007; Van Veldhoven, 2010; Wanders et al., 2011; Braverman et al., 2013). RD is an autosomal recessive lipid-storage disorder caused by deficient activity of peroxisomal phytanoyl-CoA hydroxylase (EC 1.14.11.18) that converts phytanoyl-CoA into 2-hydroxy-phytanoyl-CoA (Reiser et al., 2006). The blockage of this pathway results in accumulation of Phyt in tissues and body fluids of the affected patients that may reach up to 5,000 μ M in plasma (normal individuals up to 30 μ M) (Schönfeld and Struy, 1999; Wanders et al., 2001; Al-Dirbashi et al., 2008).

The onset of RD symptoms is typically observed in late childhood or adolescence, but may occur from seven months to over 50 years (Wills et al., 2001; Verhoeven and Jakobs, 2001). Retinitis pigmentosa, chronic neuropathy and cerebellar

ataxia are common clinical features. Retinal degeneration is an early sign of the disease, and the neurological symptoms are generally accompanied by a slowly progressive peripheral neuropathy, manifested by motor weakness and muscular wasting (Kahlert et al., 2005; Gould et al., 2001). Patients can also present anosmia, sensorial hearing loss, ichthyosis, skeletal alterations and cardiomyopathy. It is of note that cerebellar ataxia is a prominent clinical manifestation of RD, affecting more than half of the patients, being usually more severe than muscular weakness and sensory loss. Histopathological abnormalities including alterations of Purkinje cells in the molecular layer of the cerebellum are commonly seen in RD, highlighting that this cerebral structure is highly vulnerable in this disorder (Wanders et al., 2001; Wierzbicki et al., 2002; Chow et al., 1992). This is in line with the observations drawn from the genetic mouse models of ZS and RD, showing abnormal histogenesis with reduced granule neuron population, loss and delayed Purkinje cell dendrite development and astrocytosis in the cerebellum (Faust, 2003; Ferdinandusse et al., 2008).

However, the pathophysiology of the brain and particularly cerebellum alterations in peroxisomal disorders with accumulation of Phyt is still poorly known, although the progression of the symptoms may be blocked by reduction of the plasma concentrations of this fatty acid. Thus, it was observed that reduction of dietary phytol intake decreases Phyt levels and ameliorates the polyneuropathy and ataxia, besides slowing down the progression of the other clinical manifestations in patients with RD, suggesting potential neurotoxic effects for Phyt (Kohlschütter et al., 2012; Baldwin et al., 2010; Masters-Thomas et al., 1980; Rüether et al., 2010). In this scenario, experimental *in vitro* studies demonstrated that Phyt causes oxidative stress, cell death and impairs mitochondrial

function in neural tissues (Reiser et al., 2006; Kahlert et al., 2005; Schönfeld et al., 2006; Schönfeld and Reiser, 2006; Leipnitz et al., 2010; Busanello et al., 2010; Busanello et al., 2013a; Busanello et al., 2013b; Nagai et al., 2015).

Although Phyt provokes mitochondrial dysregulation in neural cells, the exact neurotoxic effects of this fatty acid and its role *in vivo* on the cerebellum redox homeostasis have not been yet evaluated. Therefore, in the present study we investigated the *ex vivo* effects of intracerebellar administration of Phyt on a large spectrum of important parameters of redox homeostasis, namely malondialdehyde (MDA) (thiobarbituric acid-reactive substances, TBA-RS) levels (lipid oxidation), sulfhydryl content and carbonyl formation (protein oxidation), total (tGS) and reduced glutathione (GSH) concentrations, the activity of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) (antioxidant defenses), as well as the production of reactive species (nitrite and nitrate content and 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) oxidation). Immunohistochemical analysis was also carried out in cerebellum to assess oxidative stress markers and astrogliosis.

2. Experimental Procedures

2.1. Animals and reagents

Thirty-day-old Wistar male rats obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto

Alegre, RS – Brazil, were used. The animals were maintained on a 12:12h light/dark cycle (lights on 7 – 19 h) in air conditioned with constant temperature ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), in a colony room with free access to water and a 20% (w/w) protein commercial chow (SUPRA, Porto Alegre, RS, Brazil). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (protocol number 28057), and followed the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85-23, revised 1996). All efforts were made to minimize the number of animals used, as well as to minimize their suffering.

Reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), unless otherwise stated. Phyt solution (40 mM) was prepared in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO), whereas control solution was made with PBS containing 0.5 % DMSO, and the pH was adjusted to 7.4 with NaOH. N ω -nitro-Larginine methyl Ester (L-NAME) and saline solution (NaCl 0.9%) were prepared in water and the pH adjusted to 7.4.

2.2. Intracerebellar administration of phytanic acid (Phyt)

Rats were deeply anesthetized with ketamine plus xilazine (75 and 10 mg/kg i.p., respectively). The animals were placed in the stereotaxic apparatus and one small hole was drilled in the skull. Two microliters of Phyt (80 nmol) or vehicle (controls) were slowly injected into the cerebellum over 2 min via a needle connected by a polyethylene tube to a 10 μ L Hamilton syringe. The needle was left in place for another 3 min, so that the total procedure lasted 5 min. The coordinates for intracerebellar injection were 9.5 mm posterior to the bregma and 3.5 mm ventral from dura (Paxinos and Watson, 1997).

The correct position of the needle was tested by injecting 2 μ L of methylene blue (4% in NaCl 0.9%) followed by histological analysis. In some experiments animals were pre-treated intracerebellarly with L-NAME (0.2 nmol) 30 min before the administration of Phyt.

2.3. Cerebellum preparation

Animals were sacrificed by decapitation without anesthesia 1 h, 4 h or 24 h after the intracerebellar injection of Phyt or PBS. The cerebellum was quickly removed and kept on a Petri dish placed on an ice plate, where the blood and vessels were removed. The cerebellum was homogenized in 4 (1:4, w/v) (measurement of nitrite and nitrate content) or 10 (1:10, w/v) volumes (measurement of the other oxidative stress parameters) in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at 750 g for 10 min at 4 °C to discard nuclei and cell debris (Evelson et al., 2001). The pellet was discarded and the supernatant containing mixed and preserved organelles including mitochondria was separated and used for the measurements.

2.4. Oxidative stress measurements

2.4.1. Lipid oxidative damage

2.4.1.1. Malondialdehyde (MDA) levels

MDA concentrations were measured by the TBA-RS method described by Yagi (1998) with slight modifications. The method is based on the MDA resulting reaction of

lipid peroxidation with the thiobarbituric acid forming a compound that is read in a fluorimeter. Briefly, 200 μL of 10% trichloroacetic acid and 300 μL of 0.67% thiobarbituric acid in 7.1% sodium sulfate were added to 150 μL of tissue supernatant in ependorf and incubated for 2 h in boiling water bath. The mixture was cooled down with running tap water for 5 min. Four hundred μL of butanol was added, the tubes were centrifuged at 5000 g for 3 min and the resulting pink-stained complex was extracted. Fluorescence of the organic phase was read at 515 nm and 553 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane and subjected to the same treatment as supernatants. MDA levels were calculated as nmol TBA-RS/mg of protein.

2.4.2. Protein oxidative damage

2.4.2.1. Sulfhydryl (thiol) content

Sulfhydryl content measurement was performed according to the assay described by Aksenov and Markesbery (2001). The method is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid; DTNB) by thiols present in the sample, generating a yellow derivative (TNB) and the absorbance was read in a spectrophotometer. Briefly, 30 μL of 10 mM DTNB and 980 μL of PBS were added to 50 μL cerebellum supernatant. The samples were then incubated for 30 min at room temperature in dark room. The absorption was measured at 412 nm and was proportional to the thiol groups present in the sample. The thiol content was calculated as nmol TNB/mg of protein.

2.4.2.2. Protein carbonyl formation

Protein carbonyl formation (marker of protein oxidative damage) was measured according to the method of Reznick and Packer (1994). The assay is based on the reaction of the carbonyl groups with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) generating a corresponding dinitrophenyl hydrazone, and the absorbance is read in spectrophotometer. Briefly, 200 μ L of supernatant cerebellum were treated with 400 μ L of 10 mM DNPH dissolved in 2,5 M HCl or with 2,5 M HCl (blank) and left in the dark for 1 h. Samples were then precipitated with 600 μ L 20% TCA and centrifuged for 5 min at 9000 g. The pellet was washed with 1 ml of ethanol:ethyl acetate (1:1, v/v) and suspended in 550 μ L of 6 M guanidine prepared in 2,5 N HCl at 37 °C for 5 min. The difference between the treated samples with DNPH and with HCl (blank) was used to calculate the carbonyl content determined at 365 nm. The results were calculated as nmol carbonyl groups/mg of protein, using the extinction coefficient of 22,000 x 10⁶ nmol/mL for aliphatic hydrazones.

2.4.3. Determination of reactive species formation

2.4.3.1. 2',7'-Dichlorofluorescin (DCFH) oxidation

DCFH oxidation was determined according to LeBel (1992). 2',7'-Dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA) was prepared in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl and incubated with cerebellar tissue slices (30 mg) during 30 min at 37 °C. DCFH-DA is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases forming non-fluorescent DCFH, that is then rapidly oxidized forming highly

fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of ROS. The DCF fluorescence intensity indicates the amount of ROS formed. Fluorescence was read at 480 nm and 535 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. The calibration curve was made with standard DCF (0.1 – 1 μ M) and the levels of ROS were calculated as pmol DCF formed/mg of protein.

2.4.3.2. Nitrate and nitrite content

Nitrate and nitrite content was evaluated according to Navarro-González (1998) with slight modifications (Fernandes et al., 2013). Hundred and fifty μ L of cerebellar supernatant (containing approximately 1.2 mg of protein) were deproteinized by adding 125 μ L of a 75 mM ZnSO₄ solution, followed by a centrifugation at 9000 g for 2 min at 25°. The obtained supernatant was neutralized with 55 mM of NaOH solution and then diluted in 5 volumes of glycine buffer solution pH 9.7. Copper-coated cadmium granules (600 – 1000 mg), previously activated with a 5 mM of CuSO₄ solution in glycine-NaOH buffer pH 9.7, were added to the diluted supernatants and gently mixed for 20 min in the dark. The cadmium treatment was used to convert all the nitrate into nitrite in the biological samples, leading to a more accurate estimate of the total formation of NO. Two hundred μ L aliquots were treated with 200 μ L of Griess reagent (2% sulfanilamide in 5% HCl and 0.1% N-1-(naphthyl)ethylenediamine in H₂O) and incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was read at 505 nm in a spectrophotometer. The calibration curve was prepared with NaNO₂ in concentrations from 1 to 125 μ M. The final results were calculated as μ mol nitrate and nitrite/mg of protein.

2.4.4. Determination of antioxidant defenses

2.4.4.1. Non enzymatic antioxidant defenses

2.4.4.1.1. Reduced (GSH) and total (tGS) glutathione levels

GSH concentrations were measured according to Browne and Armstrong (1998) with slight modifications. The assay is based on the reaction between o-phthalaldehyde and GSH forming fluorescent adducts of GSH. Briefly, 150 μ L of cerebellar supernatant were added to 150 μ L of metaphosphoric acid. The sample was then centrifuged at 7000 g for 10 min to precipitate proteins. Hundred μ L of this preparation was incubated with an equal volume of o-phthalaldehyde (1 mg / ml of methanol) at room temperature for 15 minutes in the dark. The fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 nm and 420 nm, respectively. A calibration curve was prepared with standard GSH (0.001 – 1 mM). The GSH concentrations were calculated as nmol GSH/mg of protein.

tGS concentrations were determined by following the enzymatic recycling method described by Teare et al. (1993) with some modifications (da Rosa et al., 2015). Briefly, the cerebellum was immediately homogenized in 4 vol (w/v) of a mixture (1:1 ratio) of sulfosalicylic acid (11%) and Triton X-100 (0.11%). A brief incubation of 5 min at 4 °C under continuous shaking was performed and then the samples were centrifuged at 10,000g for 10 min (4 °C), and the supernatant was collected for analysis of tGS levels. The samples were then subjected to enzymatic recycling analysis in a recycling buffer system consisting of 300 μ M NADPH, 225 μ M DTNB, 1.6 U/mL GR and

1.0 mM EDTA in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4). The linear increase in absorbance at 405 nm over time was monitored using a microplate reader (Spectramax M5, Molecular Devices, California, US).

2.4.4.2. Enzymatic antioxidant defenses

2.4.4.2.1. Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was measured according to Wendel (1981) using tert-butylhydroperoxide as substrate. The activity was determined by monitoring the NADPH decrease at 340 nm in a medium with sodium phosphate buffer 100 mM/EDTA 1mM pH 7.7, GSH 2 mM, glutathione reductase 0.1 U/ml, azide 0.4 mM, tert-butylhydroperoxide 0,5 mM, NADPH 0,1 mM and cerebellum supernatants (approximately 3 µg of protein). The specific activity was calculated as U/mg of protein.

2.4.4.2.2. Glutathione reductase (GR) activity

GR activity was measured according to Carlberg and Mannervik (1985). The activity of the enzyme was determined by monitoring the NADPH decrease at 340 nm in a medium containing sodium phosphate buffer 200 mM pH 7.5 with 6.3 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM GSSG, 0.1 mM NADPH and the cerebellum supernatants (approximately 3 µg of protein). The specific activity was calculated as U/mg of protein.

2.4.4.2.3. Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was measured according to Marklund (1985). The reaction medium contained 50 mM Tris buffer/ 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid pH 8.2, 80 U/ml catalase 0.38 mM pyrogallol and the cerebellum supernatants (approximately 1 µg of protein). The inhibition of the pyrogallol autoxidation, a process dependent on superoxide, occurs in the presence of SOD, whose activity can be then indirectly measured at 420 nm. The results were calculated as U/mg of protein.

2.4.4.2.4. Catalase (CAT) activity

CAT activity was measured according to Aebi (1984) by the determination of the decrease in the absorbance at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0.1% triton X-100, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 and cerebellum supernatants (approximately 1 µg of protein). The specific activity was calculated as U/mg of protein.

2.4.4.2.5. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)

G6PD activity was measured according to the method of Leong and Clark (1984). The reaction medium was composed by 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺ and cerebellar supernatants (approximately 3 µg of protein). The reaction starts with the addition of glucose-6-phosphate 1 mM and the absorbance was read at 340 nm. The specific activity was calculated as U/mg of protein.

2.5. Immunohistochemistry analysis

Immunohistochemistry was performed in cerebellum to study the different cell populations and oxidative stress markers. Twenty four hours after surgery the rats were euthanized and intracardiacally perfused with citrate-saline solution followed by 4% paraformaldehyde (PAF) in 0.01 M PBS pH 7.4. The brain was quickly removed and postfixed overnight at 4 °C in 4% PAF and changed to PBS until sectioning. A 1000S Leica vibratome was used to obtain 50 µm thick consecutive coronal series. Sections were stored either free-floating at 4 °C or mounted on gelatin-coated slides for histological analysis. For each animal and staining procedure, 5 to 8 equivalent sections were immunostained. Astrocytic population was recognized by labeling against glial fibrillary acidic protein (GFAP). To perform immunohistochemical assays, free-floating sections were washed with PBS, submitted to antigen retrieval by boiling in 10 mM sodium citrate pH 6.0 for 1 min and then washed twice for 10 min. The slices were then permeabilized with PBS plus 0.3% Triton X-100 (PBST) and blocked with 5% bovine serum albumin (in PBS 0.3% Triton X-100) during 60 min. Slices were then incubated with anti-GFAP (1:500) and anti-nitrotyrosine (1:500). All dilutions were made in PBST. After a 4 °C overnight incubation, sections were washed with PBS and then incubated at room temperature for 120 min with 1:500 dilutions of corresponding secondary antibodies conjugated with fluorescent probes (Molecular Probes). Sections were then washed, mounted in glycerol and imaged in an Olympus IX-81 confocal FV300 microscope provided with a green Helium Neon gas laser (543 nm) and a red Helium Neon gas laser (633 nm), and images were analyzed with OLYMPUS FLUOVIEW

software (Shinjuku, Tokyo, Japan). Primary or secondary antibodies were omitted in negative controls (2011).

2.6. Protein content

The protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

2.7. Statistical analysis

Results were presented as mean \pm standard deviation and expressed as percentage of controls. Assays were performed in duplicate or triplicate and the mean was used for statistical analysis. Assuming a normal distribution for the data, comparisons between two means were performed by the t Student test for unpaired samples. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Duncan multiple range test when F value was significant was also used to compare more than two means. Significant values were considered at $P < 0.05$. All analyses were carried out in an IBM-compatible PC computer using GraphPad and Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software.

3. Results

3.1. Phyt intracerebellar administration induces lipid oxidative damage in rat cerebellum

Lipid oxidation was measured by measuring MDA concentrations. Figure 1 shows that Phyt significantly increased MDA levels (A) 4h ($P<0.001$) and 24h ($P<0.05$) after injection, indicating that this fatty acid induces lipid oxidative damage in rat cerebellum. Protein oxidative damage was also investigated by measuring carbonyl formation and sulfhydryl oxidation. It was seen that Phyt did not alter carbonyl (Fig. 1B) and sulfhydryl content (Fig. 1C), indicating that it does not provoke protein oxidative damage.

3.2. Phyt intracerebellar administration increases reactive nitrogen species production in rat cerebellum

We next investigated the production of reactive species by determining 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) oxidation and nitrate and nitrite production (nitric oxide, NO formation). Phyt did not alter DCFH oxidation (Fig. 2A) but significantly increased NO production (Fig. 2B) in rat cerebellum 1 h ($P<0.05$) and 4 h ($P<0.001$) after injection. The data indicate that Phyt induces reactive nitrogen species formation.

3.3. Phyt intracerebellar administration reduces GSH levels but does not change the enzymatic antioxidant defenses in rat cerebellum

We evaluated the non-enzymatic antioxidant defenses through the measurement of tGS and GSH concentrations. We observed that Phyt significantly decreased GSH

levels (Fig. 3) in rat cerebellum 4h ($P<0.01$) and 24h ($P<0.05$) after injection, demonstrating that this fatty acid decreases the principal brain antioxidant defense. In contrast, tGS concentrations were not altered by Phyt ($\mu\text{mol} / \text{g}$ of tissue: Controls: 6.11 ± 0.38 ; Phyt: 6.23 ± 0.25 , $n=6$). Furthermore, Phyt was not able to change the activities of the antioxidant enzymes GPx, SOD, GR, CAT and G6PD 1h, 4h and 24h after injection (Fig. 4 A, B and C).

3.4. L-NAME intracerebellar administration prevents Phyt-induced increase of malondialdehyde levels, reactive nitrogen species and the decrease of GSH levels in rat cerebellum

The next step of this work was to investigate the effects of intracerebellar pre-treatment with the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NAME on Phyt-induced lipid oxidative damage (MDA levels), increase of nitrogen reactive species formation (nitrite and nitrate concentrations) and reduction of GSH levels in rat cerebellum. We observed that L-NAME fully prevented Phyt-elicited lipid peroxidation (Fig. 5A) and decrease of GSH levels (Fig. 5B), and also attenuated NO formation (Fig. 5C). We then evaluated the influence of intracerebellar injection of the non-competitive NMDA receptor antagonist MK-801 on NO production induced by Phyt in rat cerebellum. It was observed that MK-801 could not prevent Phyt-induced increase of NO formation (Fig. 6), making unlikely the participation of NMDA glutamate receptors in this effect.

3.5. *Phyt intracerebellar administration provokes astrogliosis and protein nitrosative damage in rat cerebellum*

We also carried out immunohistochemistry analysis in cerebellum 24 hours after Phyt injection. GFAP staining was stronger and GFAP+ cells were increased in cerebellum of Phyt-treated rats, indicating that Phyt induces reactive astrogliosis (Fig. 7B). Furthermore, Phyt-treated rats showed an increased number of neurons stained with nitrotyrosine, reflecting nitrosative damage (Fig. 7E). Finally we observed that L-NAME pre-treatment diminished GFAP staining and the increase of GFAP+ cell number, as well as prevented the induction of nitrotyrosine staining provoked by Phyt (Fig 7C and F).

4. Discussion

Patients affected by Refsum disease (RD) and other peroxisomal disorders present ataxia and cerebellum abnormalities whose pathogenesis is not yet established (Wanders et al., 2001; Brosius and Gartner, 2002). Since Phyt accumulates in these disorders, especially in RD (Wanders et al., 2011; Verhoeven and Jakobs, 2001; Ferdinandusse et al., 2002), and a decrease of Phyt levels by dietary regimen with poor phytol intake is associated with improvement of the neurologic symptoms and slow down of the progressive neuropathology, it is presumed that Phyt is neurotoxic (Baldwin et al., 2010; Masters-Thomas et al., 1980). In this context, previous *in vitro* studies reported that Phyt impairs redox status and mitochondrial energy metabolism in

cerebral cortex and cerebellum of young rats (Leipnitz et al., 2010; Busanello et al., 2010; Busanello et al., 2013a; Busanello et al., 2013b). Furthermore, Phyt was also shown to induce mitochondrial abnormality in neuronal Neuro2a cells via activation of histone deacetylase 2 and 3, which was proposed to cause neuronal damage in Refsum disease and other peroxisomal disorders in which this complex fatty acid accumulates (Nagai et al., 2015).

However, to the best of our knowledge, there are so far no reports describing *in vivo* effects caused by Phyt on the central nervous system and particularly the cerebellum. In the present work, we evaluated the effects of *in vivo* intracerebellar administration of Phyt on important parameters of oxidative stress in cerebellum from adolescent rats, a cerebral structure mostly altered in patients affected by RD and other peroxisomal disorders (Braverman et al., 2013; Ferdinandusse et al., 2008; Powers et al., 1999).

We first demonstrated that *in vivo* administration of Phyt induced a significant increase of MDA formation in the cerebellum, corroborating with previous *in vitro* findings observed in rat brain (Leipnitz et al., 2010). Considering that MDA is a final product of the oxidation of unsaturated fatty acids, it is concluded that Phyt induces lipid oxidative damage *in vivo*. Noteworthy, lipid peroxidation may provoke disruption of cell membrane lipids leading to changes in the membrane assembly, fluidity and permeability that may alter ion transport and metabolic processes (Yadav and Ramana, 2013). In contrast, Phyt did not significantly alter carbonyl formation and sulfhydryl oxidation, implying that this fatty acid does not provoke protein oxidative damage.

These observations may be tentatively explained by differential effects of reactive species on lipid and protein cell components or to the distinct sensitivity of the techniques used to determine lipid and protein oxidation (Dalle-Donne et al., 2003).

We also found that Phyt provoked a significant reduction of GSH levels, without changing tGS and the activities of the antioxidant enzymes GPx, SOD, CAT, GR and G6PD in the cerebellum. These findings indicate an impairment of the non-enzymatic antioxidant defenses in this cerebral structure since GSH is considered the most abundant antioxidant in the brain, being an efficient protector of sulfhydryl groups and a free radical scavenger. Indeed, GSH concentrations are used to evaluate the capacity of the brain to prevent oxidative damage associated to free radical processes (Halliwell and Gutteridge, 2007). At least two mechanisms could explain the GSH decreased levels. It is possible that this reduction was due to oxidative changes caused by an augment of reactive species generation or alternatively due to alterations in the rate of GSH synthesis (Halliwell and Gutteridge, 2007; Anderson, 1998) or degradation by changes in the activities of glyoxalases and/or glutathione S-transferase (Halliwell and Gutteridge, 2007; Currais and Maher, 2013). Although more work is necessary to elucidate the Phyt-induced decrease of GSH concentrations, our data showing unchanged tGS concentrations point to a higher consumption/oxidation of GSH due to a higher production of reactive species.

Thus, in an attempt to evaluate the reactive species involved in lipid oxidative damage and reduction of GSH levels, we tested whether Phyt could alter DCFH oxidation and nitrate plus nitrite concentrations. We verified that Phyt *in vivo*

administration significantly increased NO production (augmented nitrates and nitrites content), but did not affect DCFH oxidation in rat cerebellum. It is of interest that the DCFH probe predominantly detects ROS and has a lower sensitivity to RNS (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Therefore, we cannot exclude the possibility that the augmented production of reactive nitrogen species elicited by Phyt may have contributed to the reduction of cerebellum GSH concentrations. Since depletion of this potent antioxidant renders cells incapable of appropriately remove free radicals and protect lipids from oxidation, the augmented levels of MDA levels may have been a consequence of reduce antioxidant defenses. Our present results are in agreement with a previous study demonstrating pro-oxidant effects elicited by Phyt *in vitro* in hippocampal astrocytes and in mixed cultures of astrocytes, oligodendrocytes and neurons (Schönfeld et al., 2006; Röncke et al., 2009).

Taken together, our findings indicate that RNS are probably involved in the pro-oxidant effects of Phyt. This conclusion is reinforced by the observations showing that L-NAME (a nitric oxide synthase inhibitor) fully prevented the Phyt-induced lipid oxidative damage and the reduction of antioxidant defenses, validating our conclusion that increased RNS formation probably underlies the Phyt-induced alterations of oxidative stress parameters as here observed. This is also in accordance with previous observations performed in vascular smooth muscle cells showing that nitric oxide-dependent apoptosis is induced by Phyt (Idel et al., 2002) and with human studies showing accumulation of lipid peroxidation markers and increase of NO in patients with

peroxisomal diseases (Ferdinandusse et al., 2003; Surdacki et al., 2003; El-Bassyouni et al., 2012).

In contrast, MK-801 (a non-competitive antagonist of NMDA glutamate receptors) did not prevent the increase of malondialdehyde levels and the reduction of GSH concentrations, therefore ruling out a major effect of NMDA receptors in the oxidative effects elicited by Phyt.

Since oxidative stress is characterized by an imbalance between the total antioxidant defenses and the reactive species generated in favor of the latter, our study indicates that Phyt induces this condition in the rat cerebellum *in vivo*. At this point it should be stressed that the brain is highly susceptible to oxidative damage as compared to other tissues because it has lower activity of antioxidant enzymes, reduced content of non-enzymatic antioxidants and higher peroxidation potential because of its elevated content of polyunsaturated fatty acids (Dalle-Donne et al., 2003).

In order to test whether Phyt *in vivo* administration could cause cerebellum histological alterations, immunohistochemical studies were carried out 24 h after Phyt injection and revealed astrogliosis (increased GFAP fluorescence) and nitrosative damage (augmented nitrotyrosine fluorescence). Furthermore, L-NAME pretreatment attenuated astrogliosis and prevented protein nitrotyrosine formation, reinforcing the role of RNS in Phyt-induced disruption of redox homeostasis and the histochemical alterations observed in the cerebellum (Idel et al., 2002; Surdacki et al., 2003; El-Bassyouni et al., 2012).

Finally, it should be pondered that reactive species are capable to oxidize a variety of molecules, including lipids, proteins, sugars and DNA in a pathogenic cascade leading to necrotic or apoptotic cell death (Reed and Kroemer, 2000; Niizuma et al., 2009; Circu and Aw, 2009). Since the present *in vivo* data were confirmed in tissues from patients affected by RD and other peroxisomal disorders (Ferdinandusse et al., 2003; Surdacki et al., 2003; El-Bassyouni et al., 2012), it is conceivable that oxidative stress may mediate, at least partially, the cerebellar ataxia and abnormalities characteristic of patients affected by RD and other pathologies in which Phyt is found at high concentrations. Furthermore, the present experimental *in vivo* data allied to previous *in vitro* observations (Schönfeld et al., 2006; Leipnitz et al., 2010; Idel et al., 2002; Ferdinandusse et al., 2003; El-Bassyouni et al., 2012) showing that Phyt induces disruption of mitochondrial redox homeostasis through reactive nitrogen species and that these species were found in high levels in urine and blood of patients with RD and other peroxisomal diseases strongly suggest that Phyt represents an important factor disturbing cellular redox status and possibly contributing to the neuropathology of these disorders. We cannot, however, rule out that other damaging mechanisms such as mitochondrial energy disruption (Schönfeld et al., 2006; Busanello et al., 2010, Busanello et al., 2013a; Busanello et al., 2013b; Nagai et al., 2015) caused by Phyt may also contribute to the neurotoxicity of this fatty acid.

5. Conclusion

We demonstrate for the first time a disruption of redox homeostasis and immunohistochemical alterations (astrogliosis and nitrosative damage) probably through reactive nitrogen species provoked *in vivo* by Phyt administration in cerebellum of adolescent rats. Therefore, it is conceivable that antioxidants could be tentatively proposed as a potential adjuvant therapy for patients affected by peroxisomal disorders in which Phyt accumulates.

Acknowledgments

We are grateful to the financial support of CNPq, CAPES, PROPESq/UFRGS, FAPERGS, PRONEX, FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia- Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCT-EN).

Conflict of Interest Statement: The authors declare that there are no potential conflicts of interest.

6. References

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

Aksenov MY and 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.

Al-Dirbashi OY, Santa Y, Rashed MS, Al-Hassnan Z, Shimozawa N, Chedrawi A, Jacob M, Al-Mokhadab M (2008), Rapid UPLC-MS/MS method for routine analysis of plasma pristanic, phytanic, and very long chain fatty acid markers of peroxisomal disorders. *J Lipid Res* 49:1855-1862.

Anderson ME (1998), Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact* 24:111-112:1-14.

Baldwin EJ, Gibberd FB, Harley C, Sidey MC, Feher MD, Wierzbicki AS (2010), The effectiveness of long-term dietary therapy in the treatment of adult Refsum disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81:954-957.

Braverman NE, D'Agostino MD, MacLean GE (2013), Peroxisome Biogenesis Disorders: Biological, Clinical and Pathophysiological Perspectives. *Dev Disabil Res Rev* 17:187-196.

Brosius U and Gartner J (2002), Cellular and molecular aspects of Zellweger syndrome and other peroxisome biogenesis disorders. *Cell Mol Life Sci* 59:1058-1069.

Browne RW and Armstrong D (1998), Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347-352.

Busanello EN, Viegas CM, Moura AP, Tonin AM, Grings M, Vargas CR, Wajner M (2010), In vitro evidence that phytanic acid compromises Na(+),K(+)-ATPase activity and the electron flow through the respiratory chain in brain cortex from young rats. *Brain Res* 1352:231-238.

Busanello EN, Amaral AU, Tonin AM, Zanatta A, Viegas CM, Vargas CR, Wajner M (2013a), Disruption of mitochondrial homeostasis by phytanic acid in cerebellum of young rats. *Cerebellum* 12:362-369.

Busanello EN, Zanatta A, Tonin AM, Viegas CM, Vargas CR, Leipnitz G, Ribeiro CA, Wajner M (2013b), Marked inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity and the respiratory chain by phytanic acid in cerebellum from young rats: possible underlying mechanisms of cerebellar ataxia in Refsum disease. *J Bioenerg Biomembr* 45:137-144.

Carlberg I and Mannervik B (1985), Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113:484-490.

Circu ML and Aw TY (2009), Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 15;48:749-62.

Chow CW, Poulos A, Fellenberg AJ, Christodoulou J, Danks DM (1992), Autopsy findings in two siblings with infantile Refsum disease. *Acta Neuropathol* 83:190-195.

Currais A and Maher P (2013), Functional consequences of age-dependent changes in glutathione status in the brain. *Antioxid Redox Signal* 10;19:813-822. doi: 10.1089/ars.2012.4996.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003), Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329:23-38.

El-Bassyouni HT, Maksoud Abdel SA, Salem FA, Badr El-Deen R, Abdel Aziz H, Thomas MM (2012), Evidence of oxidative stress in peroxisomal disorders. *Singapore Med J* 53:608-614.

Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi E, Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys* 388:261-266.

Faust PL (2003), Abnormal cerebellar histogenesis in PEX2 Zellweger mice reflects multiple neuronal defects induced by peroxisome deficiency. *J Comp Neurol* 461:394-413.

Ferdinandusse S, Rusch H, van Lint A, Dacremont G, Wanders R, Vreken P (2002), Stereochemistry of the peroxisomal branched-chain fatty acids alpha- and beta-oxidation systems in patients suffering from different peroxisomal disorders. *J Lipid Res* 43:438-444.

Ferdinandusse S, Finckh B, de Hingh YC, Stroomer LE, Denis S, Kohlschutter A, Wanders RJ (2003), Evidence for increased oxidative stress in peroxisomal D-bifunctional protein deficiency. *Mol Genet Metab* 79(4):281-287.

Ferdinandusse S, Zomer AW, Komen JC, van den Brink CE, Thanos M, Hamers FP, Wanders RJ, van der Saag PT, Poll-The BT, Brites P (2008), Ataxia with loss of Purkinje cells in a mouse model for Refsum disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(46):17712-7.

Fernandes CG, da Rosa MS, Seminotti B, Pierozan P, Martell RW, Lagranha VL, Busanello EN, Leipnitz G, Wajner M (2013), In vivo experimental evidence that the major metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency induce oxidative stress in striatum of developing rats: a potential pathophysiological mechanism of striatal damage in this disorder. *Mol Genet Metab* 109:144-153.

Gould SJ, Raymond GV, Valle D (2001), The peroxisome biogenesis disorders, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, pp. 3181-3217.

Halliwell B and Gutteridge JMC (2007), Measurement of reactive species. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed.:268-340.

Idel S, Ellinghaus P, Wolfrum C, Nofer JR, Gloerich J, Assmann G, Spener F, Seedorf U (2002), Branched chain fatty acids induce nitric oxide-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 277:49319-49325.

Kahlert S, Schönfeld P, Reiser G (2005), The Refsum disease marker phytanic acid, a branched chain fatty acid, affects Ca²⁺ homeostasis and mitochondria, and reduces cell viability in rat hippocampal astrocytes. *Neurobiol Dis* 18:110-118.

Kohlschütter A, Santer R, Lukacs Z, Altenburg C, Kemper MJ, Rüther K (2012), A child with night blindness: preventing serious symptoms of Refsum disease. *J Child Neurol* 27:654-656.

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992), Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:347-352.

Leipnitz G, Amaral AU, Zanatta A, Seminotti B, Fernandes CG, Knebel LA, Vargas CR, Wajner M (2010). Neurochemical evidence that phytanic acid induces oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in cerebellum and cerebral cortex of rats. *Life Sci* 87(9-10):275-80.

Leong SF and Clark JB (1984), Regional development of glutamate dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* 43:106-111.

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

Marklund SL (1985), Pyrogallol autoxidation, *Handbook for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Boca Raton, FL 243-247.

Masters-Thomas A, Bailes J, Billimoria JD, Clemens ME, Gibberd FB, Page NG (1980), Heredopathia atactica polyneuritiformis (Refsum's disease): 1. Clinical features and dietary management. *J Hum Nutr* 34:245-250.

Nagai K (2015), Phytanic acid induces Neuro2a cell death via histone deacetylase activation and mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicol Teratol* 48:33-39.

Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J (1998), Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 44:679-681.

Niizuma K, Endo H, Chan PH (2009), Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem* 109 Suppl 1:133-138.

Olivera-Bravo S, Fernández A, Sarlabós MN, Rosillo JC, Casanova G, Jiménez M, Barbeito L (2011), Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I. *PLoS One* 6:e20831.

Paxinos G and Watson C (1997), *The rat brain in stereotaxic coordinates*, second ed., Academic Press, San Diego.

Powers JM, Kenjarski TP, Moser AB, Moser HW (1999), Cerebellar atrophy in chronic rhizomelic chondrodysplasia punctata: a potential role for phytanic acid and calcium in the death of its Purkinje cells. *Acta Neuropathol* 98:129-134.

Reed JC and Kroemer G (2000), Mechanisms of mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ* 7:1145.

Reiser G, Schönfeld P, Kahlert S (2006), Mechanism of toxicity of the branched-chain fatty acid phytanic acid, a marker of Refsum disease, in astrocytes involves mitochondrial impairment. *Int J Dev Neurosci* 24:113-122.

Reznick AZ and Packer L (1994), Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:357-363.

Rüether K, Baldwin M, Casteels M, Feher MD, Horn M, Kuranoff S, et al (2010), Adult Refsum disease: a form of tapetoretinal dystrophy accessible to therapy. *Surv Ophthalmol* 55:531-538.

Rönicke S, Kruska N, Kahlert S, Reiser G (2009), The influence of the branched-chain fatty acids pristanic acid and Refsum disease-associated phytanic acid on mitochondrial functions and calcium regulation of hippocampal neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Neurobiol Dis* 36:401-410.

da Rosa MS, Ribeiro CAJ, Seminotti B, Teixeira RR, Amaral AU, Coelho DM, Oliveira FH, Leipnitz G, Wajner M (2015), In vivo intracerebral administration of L-2-hydroxyglutaric acid provokes oxidative stress and histopathological alterations in striatum and cerebellum of adolescent rats. *Free Radic Biol Med* 83:201-213.

Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G (2006), A study of the cytotoxicity of branched-chain phytanic acid with mitochondria and rat brain astrocytes. *Exp Gerontol* 41:688-696.

Schönfeld P and Reiser G (2006), Rotenone-like action of the branched-chain phytanic acid induces oxidative stress in mitochondria. *J Biol Chem* 281:7136-7142.

Schönfeld P and Struy H (1999), Refsum disease diagnostic marker phytanic acid alters the physical state of membrane proteins of liver mitochondria. *FEBS Lett* 457:179-183.

Surdacki A, Tsikas D, Mayatepek E, Frölich JC (2003), Elevated urinary excretion of nitric oxide metabolites in young infants with Zellweger syndrome. *Clin Chim Acta* 334:111-115.

Teare JP, Punchard NA, Powell JJ, Lumb PJ, Mitchell WD, Thompson RPH (1993), Automated spectrophotometric method for determining oxidized and reduced glutathione in liver. *Clin Chem* 39:686-689.

Van Veldhoven PP (2010), Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. *J Lipid Res* 51:2863-2895.

Verhoeven NM and Jakobs C (2001), Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. *Prog Lipid Res* 40:453-466.

Wanders RJ, Jansen G, Skjeldal O (2001), Refsum disease, peroxisomes and phytanic acid oxidation: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:1021-1031.

Wanders RJ, Komen J, Ferdinandusse S (2011), Phytanic acid metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1811:498-507.

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

Wierzbicki A (2007), Peroxisomal disorders affecting phytanic acid alpha-oxidation: a review. *Biochem Soc Trans* 35:881-886.

Wierzbicki A, Lloyd M, Schofield C, Feher M, Gibberd F (2002), Refsum's disease: a peroxisomal disorder affecting phytanic acid alpha-oxidation. *J Neurochem* 80:727-735.

Wills AJ, Manning NJ, Reilly MM (2001), Refsum's disease. *Q J Med* 94:403-406.

Yadav UC and Ramana KV (2013), Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev* 2013:690545.

Yagi K (1998), Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 108:107-110.

Figure legends:

Fig. 1. Effect of intracerebellar administration of phytanic acid (Phyt, 80 nmol) on malondialdehyde (MDA) levels (A), carbonyl formation (B) and sulfhydryl content (C) in rat cerebellum 1 h, 4 h and 24 h after injection. Data are represented as mean \pm SD of 5 to 6 independent experiments (animals) and expressed as percentage of control. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, compared to rats that received intracerebellar vehicle injection (Student's *t* test for unpaired samples).

Fig. 2. Effect of intracerebellar administration of phytanic acid (Phyt, 80 nmol) on DCFH oxidation (A) 4h after injection and on nitrate and nitrite content (B) 1 h, 4 h and 24 h after injection in rat cerebellum. Data are represented as mean \pm SD of 5 to 6 independent experiments (animals) and expressed as percentage of control. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, compared to rats that received intracerebellar vehicle injection (Student's *t* test for unpaired samples).

Fig. 3. Effect of intracerebellar administration of phytanic acid (Phyt, 80 nmol) on reduced (GSH) glutathione concentrations 1h, 4h and 24h after injection in rat cerebellum. Data are represented as mean \pm SD of 5 to 6 independent experiments (animals) and expressed as percentage of control. *P < 0.05, **P<0.01, compared to rats that received intracerebellar vehicle injection (Student's *t* test for unpaired samples).

Fig. 4. Effect of intracerebellar administration of phytanic acid (Phyt, 80 nmol) on the activities of glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), catalase (CAT) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in rat cerebellum 1 h, 4 h and 24 h after injection. Data are represented as mean \pm SD of 5 to 6 independent experiments (animals) and expressed as percentage of control. No significant differences were observed (Student's *t* test for unpaired samples).

Fig. 5. Effect of N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 0.2 nmol) on phytanic acid (Phyt, 80 nmol)-induced alterations of malondialdehyde (MDA) levels (A), glutathione (GSH) concentrations (B) and nitrite and nitrate content (C) in rat cerebellum 4h after injection. Data are represented as mean \pm SD of 5 to 6 independent experiments (animals) and expressed as percentage of control. *P<0.05, **P<0.01 compared to rats that received vehicle injection; #P<0.05, ##P<0.01, compared to rats that received Phyt (one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test).

Fig. 6. Effect of dizocilpine maleate (MK-801; 6 nmol) on phytanic acid (Phyt, 80 nmol)-induced alteration on nitrate and nitrite concentrations in rat cerebellum 4h after injection. Data are represented as mean \pm SD of 5 to 6 independent experiments (animals) and expressed as percentage of control. *P<0.05, compared to rats that received vehicle injection (one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test).

Fig. 7. Phytanic acid (Phyt, 80 nmol)-induced alterations of GFAP (A-C) and nitrotyrosine (D-F) immunohistochemistry. Representative images are shown. A and D represent control, whereas B and E Phyt and C and F L-NAME plus Phyt-treated rats. Scale bar: 40 μm (magnification: 40x).

Figures:

Fig. 1

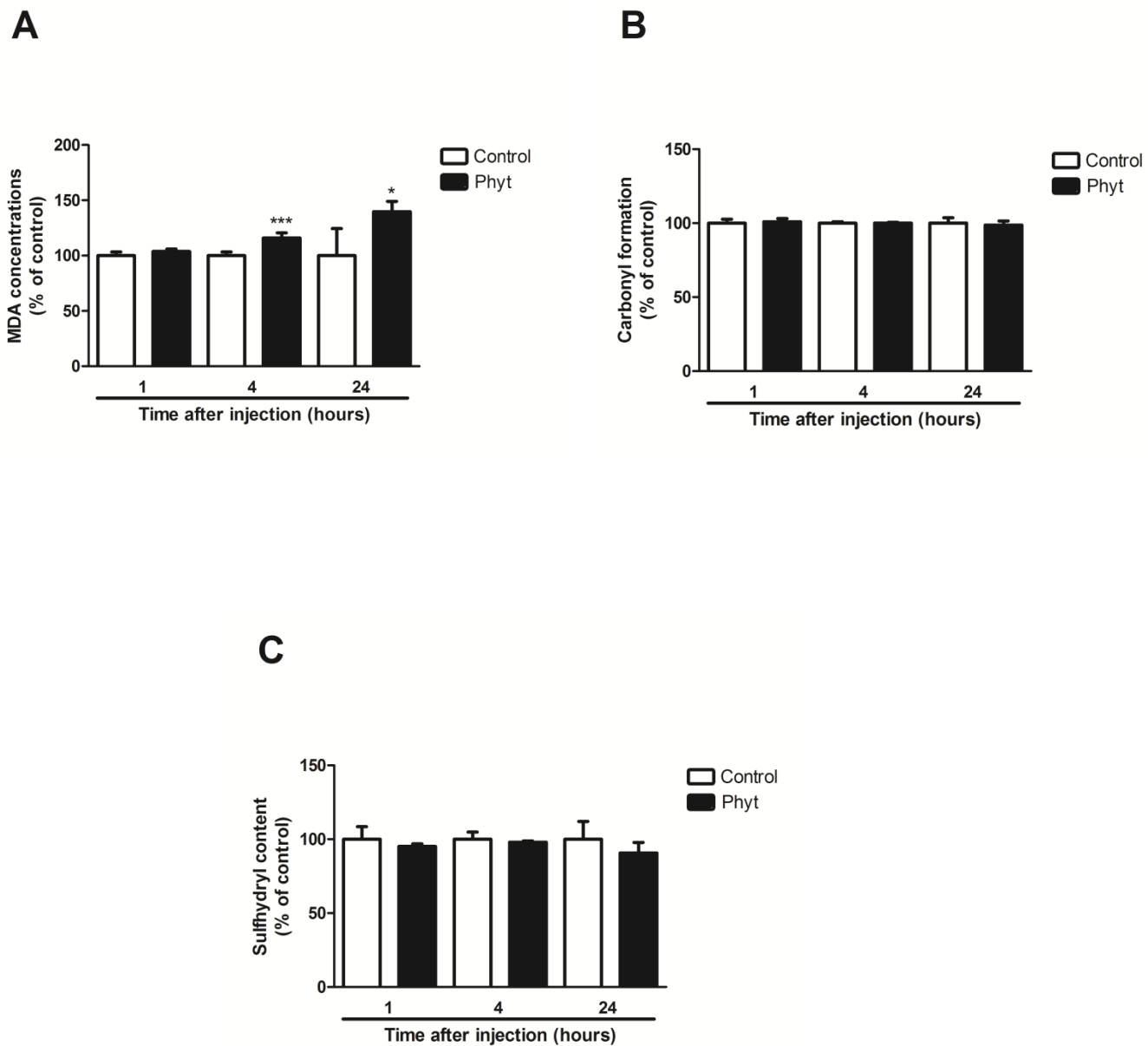


Fig. 2

A



B



Fig. 3



Fig. 4

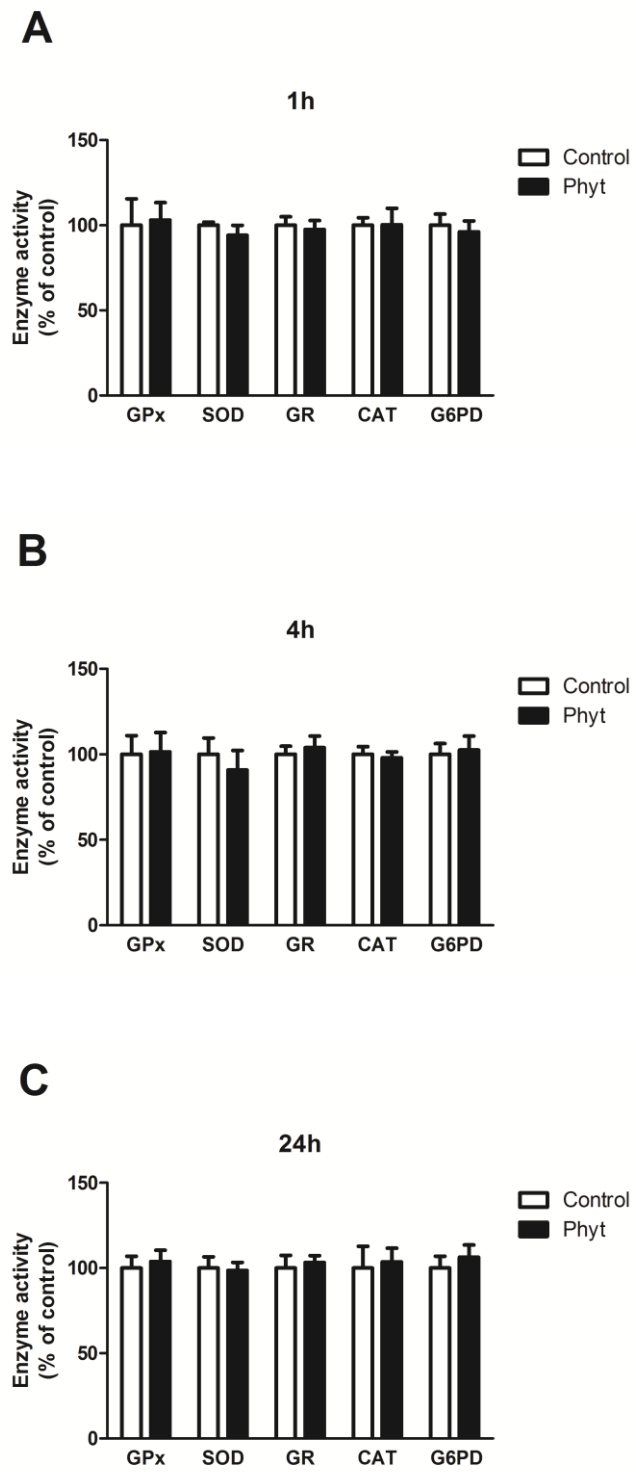


Fig. 5

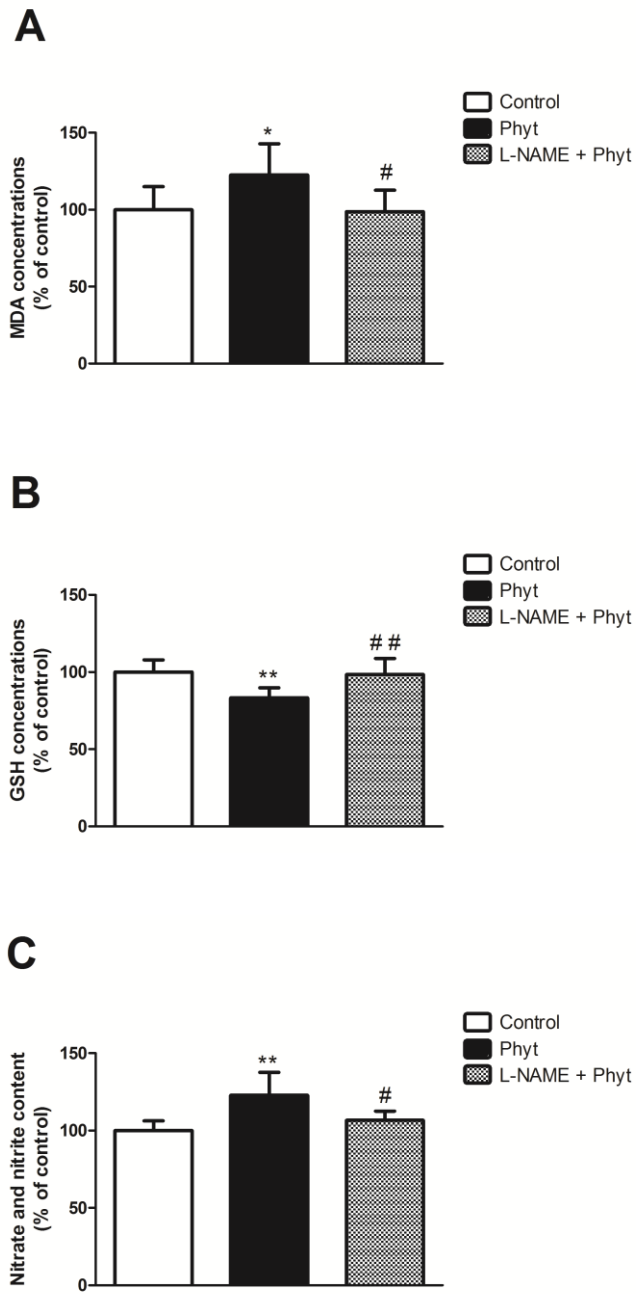


Fig. 6

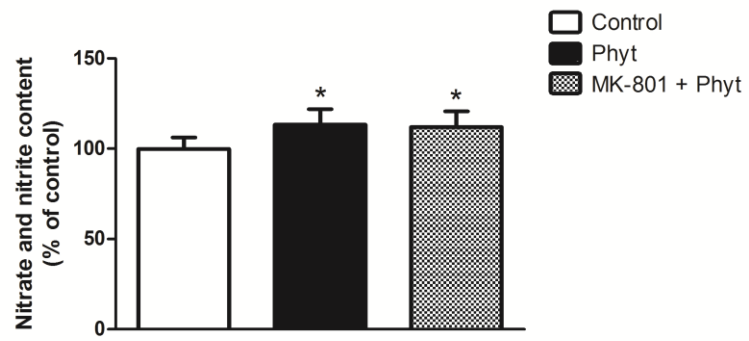
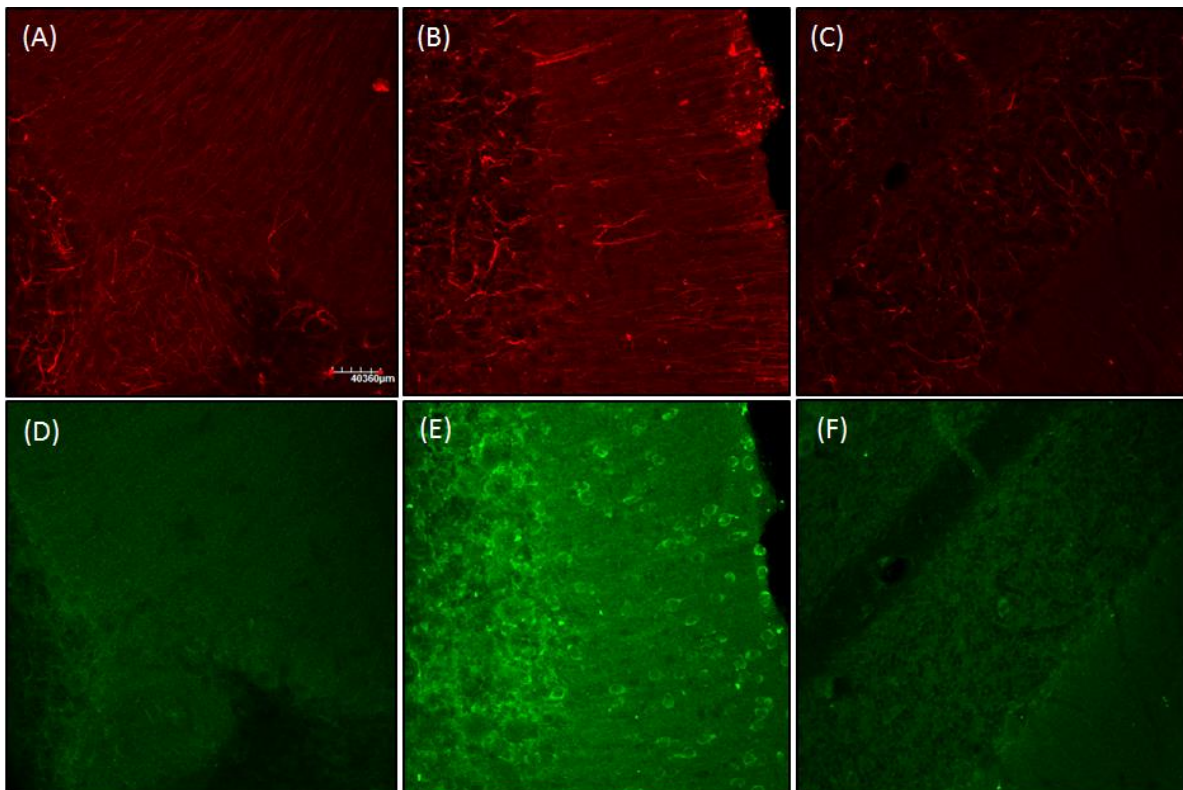


Fig. 7



PARTE III
Discussão, Conclusões e Perspectivas

III.1. DISCUSSÃO

As doenças peroxissomais são distúrbios causados por defeitos na biogênese peroxissomal ou por defeitos em enzimas específicas envolvidas na β ou α -oxidação peroxissomal, levando ao acúmulo do ácido fitânico (Fit) nos pacientes afetados. Em conjunto, essas doenças apresentam uma incidência estimada de 1:20.000 a 1:100.000 nascidos vivos. (Scriver et al., 2001, McLean et al., 2002). Esse ácido graxo possui um papel importante em diversas doenças peroxissomais, especificamente na doença de Refsum (RD) (Wanders et al., 2011; Verhoeven et al., 1998). O Fit também se acumula em outras doenças, como a síndrome de Zellweger (ZS) e o defeito da proteína D-bifuncional (Verhoeven e Jakobs, 2001, Ferdinandusse et al., 2002). As manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes são bem variáveis, entretanto sabe-se que sintomas neurológicos e alterações cerebrais são predominantes, sendo as anormalidades cerebelares particularmente proeminentes na DR. Entretanto, os mecanismos patológicos do dano cerebral que afeta os pacientes ainda são pouco conhecidos, e especialmente os efeitos neurotóxicos do Fit, já que a redução da ingestão de alimentos que contêm precursores desse ácido graxo diminui os níveis de Fit e simultaneamente melhora os sintomas neurológicos (Baldwin et al., 2010; Rüether et al., 2010). Neste contexto, diversos estudos experimentais têm evidenciado essa hipótese. Foi demonstrado que o Fit prejudica as funções mitocondriais, já que ele inibe a cadeia transportadora de elétrons, estimula a geração de espécies reativas e o escapamento de elétrons da cadeia transportadora (Schönfeld et al., 2006; Reiser et al., 2006; Kahlert et al., 2005). Enfatize-se que camundongos nocaute PEX2 apresentam histogênese cerebelar anormal e um modelo com níveis elevados de Fit em camundongos knockout demonstraram ataxia cerebelar com perda das células de Purkinje (Faust 2003; Ferdinandusse et al., 2008). Um outro estudo com células musculares lisas vasculares mostrou apoptose dependente de NO[•] induzida pelo Fit (Idel et al., 2002). Há também evidência de estresse oxidativo em pacientes com doenças peroxissomais, com acúmulo de marcadores de lipoperoxidação e também de NO[•] (Ferdinandusse et al., 2003; El-Bassyouni et al., 2012, Surdacki et al., 2003). Neste cenário, nosso grupo demonstrou recentemente que o Fit induz dano oxidativo e reduz

as defesas antioxidantes em córtex e cerebelo de ratos, além de prejudicar o metabolismo cerebral (Leipnitz et al., 2010; Busanello et al., 2010; Busanello et al., 2013 a,b).

Apesar de o Fit induzir dano mitocondrial em células neurais e no cérebro de ratos, a patogênese das alterações cerebelares ainda não está bem estabelecida e os estudos realizados até aqui foram essencialmente em modelos *in vitro*. Assim, considerando que não existem estudos sobre a citotoxicidade do Fit em um modelo *in vivo* e que o acúmulo de Fit está possivelmente envolvido com dano oxidativo, principalmente na DR, este trabalho se propôs a investigar pela primeira vez os efeitos uma injeção aguda intracerebelar de Fit sobre diversos parâmetros de homeostase redox em cerebelo de ratos adolescentes. Foram inicialmente avaliados os efeitos do Fit sobre parâmetros de lipoperoxidação, através dos níveis de TBA-RS, de dano oxidativo proteico (conteúdo de sulfidrilas e formação de carbonilas), das defesas antioxidantes não enzimáticas (concentrações de GSH) e enzimáticas (GPx, GR, G6PD, SOD e CAT) e de produção de espécies reativas (formação de óxido nítrico e oxidação de DCFH). Além disso, também foram feitas análises imunohistoquímicas para verificar mudanças em marcadores de estresse oxidativo.

Verificamos inicialmente que o Fit aumentou significativamente a formação de TBA-RS 4h e 24h após a injeção em cerebelo, porém não causou mudanças na formação de carbonilas ou no conteúdo de sulfidrilas, marcadores de dano oxidativo proteico, indicando que este ácido graxo induz dano oxidativo lipídico, mas não proteico, quando administrado *in vivo*. Tais resultados estão parcialmente de acordo com um estudo *in vitro* feito recentemente, demonstrando dano lipídico provocado por doses baixas de Fit (1 μ M e maiores) em cerebelo de ratos jovens (Leipnitz et al., 2010). Entretanto, este mesmo trabalho revelou um aumento na concentração de carbonila e na oxidação de sulfidrilas com doses altas de Fit (100 e 500 μ M), sugerindo que os lipídios são mais suscetíveis ao dano lipídico causado por esse ácido. É possível, no entanto, que tais resultados discrepantes possam ter sido devido a diferentes concentrações do Fit utilizadas no estudo prévio *in vitro* em comparação com o presente trabalho ou a abordagens diferentes (*in vitro* x *in vivo*). Além disso, analisamos também a produção de espécies reativas, e constatamos que o Fit provoca

um aumento na produção de NO[•] 1h e 4h após a injeção no cerebelo, sem alterar a oxidação de DCFH em comparação ao controle após a injeção no cerebelo. Esses resultados demonstram uma formação seletiva de ERN induzida pelo Fit. Neste particular, um estudo realizado em crianças com até 12 meses de vida com SZ demonstrou um nível aumentado de NO[•] na urina dos pacientes (Surdacki et al., 2003). Outro estudo com pacientes portadores de doenças peroxissomais mostrou um aumento dos níveis de NO[•] e de TBA-RS em relação aos controles, tanto em pacientes com SZ quanto com DR (El-Bassyouni et al., 2012), corroborando, portanto, com nossos resultados. É importante ressaltar que a ausência de alteração de DCFH não descarta o envolvimento de ERO, mas indica que as ERN parecem ter um envolvimento maior nos danos oxidativos observados. Pelo modelo de uma injeção aguda e de uma dose mais baixa do que os pacientes de doenças peroxissomais normalmente apresentam é possível que essas condições não sejam suficientes para causar dano proteico e aumento de ERO. Deve-se considerar que os pacientes apresentam a doença cronicamente e acúmulos elevados do Fit, enquanto que nesse modelo a exposição ao Fit foi aguda.

Observamos também que o Fit provocou uma diminuição significativa dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), uma defesa antioxidante não enzimática, 4h e 24h após a sua administração, o que também está de acordo com estudos prévios *in vitro* realizados em cerebelo (Leipnitz et al., 2010). Por outro lado, as defesas antioxidantes enzimáticas GPx, GR, G6PD, CAT e SOD não foram alteradas pela injeção intracerebelar de Fit. Além disso, os níveis de glutathiona total (tGS) não foram alterados pelo Fit, indicando que a diminuição das concentrações de GSH provavelmente ocorreram devido à oxidação desse antioxidante por espécies ativas induzidas pelo Fit e que esse ácido graxo, portanto, não muda a quantidade de tGS (soma da GSH e da glutathiona oxidada). É interessante avaliar que os resultados encontrados demonstram que o aumento na formação de NO[•] ocorre antes dos danos oxidativos a lipídeos e da diminuição de GSH, podendo então ser inferido que as ERN tem envolvimento e levam à lipoperoxidação e à diminuição das defesas antioxidantes não enzimáticas.

Considerando que o Fit causou um aumento nos níveis de ERN mas não de ERO, testamos se o L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase, preveniria os efeitos pró-oxidantes encontrados. Observamos que o L-NAME preveniu totalmente a lipoperoxidação e a diminuição dos níveis de GSH induzidas pelo Fit, bem como atenuou a formação de NO[•], indicando que o aumento de NO[•] está de fato relacionado com o desequilíbrio redox causado por esse ácido graxo. Também avaliamos se o MK-801, um antagonista não competitivo do receptor NMDA, poderia diminuir os danos oxidativos provocados pelo Fit. MK-801 é um receptor de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do cérebro. Este canal normalmente é bloqueado com Mg⁺² e necessita de despolarização do neurônio para remover o Mg⁺² e então permitir que o glutamato se ligue e abra o canal, levando a um influxo de Ca⁺² que então leva a despolarização. O MK-801 se liga no interior do canal do NMDA e então inibe o fluxo de íons, incluindo o influxo de Ca⁺² pelo canal. O glutamato é um aminoácido excitatório, e se liberado em quantidades tóxicas leva a um aumento de excitotoxicidade contribuindo para neurodegeneração. O bloqueio desse canal, portanto, poderia prevenir essa degeneração do tecido cerebral. Como o Fit é tóxico em quantidades elevadas e os pacientes acometidos por doenças peroxissomais apresentam neurodegeneração, avaliamos se os receptores NMDA poderiam estar envolvidos com um aumento da excitotoxicidade. Verificamos que o MK-801 não alterou o dano oxidativo provocado pelo Fit, visto que a produção aumentada de NO[•] observada pela administração de Fit se manteve elevada na presença do inibidor glutamatérgico. Podemos concluir, portanto, que não há envolvimento de receptores de glutamato do tipo NMDA nos efeitos causados pelo Fit.

Em uma etapa posterior de nosso estudo, fizemos análises imunohistoquímicas no cerebelo 24 h após a injeção do Fit. Observamos um aumento da fluorescência/intensidade da marcação e do número de células marcadas com GFAP, indicando que o Fit induziu astrogliose reativa. Além disso, verificamos uma marcação significativamente aumentada da nitrotirosina, indicando que esse ácido graxo provoca dano oxidativo protéico através da nitração de proteínas por ERN, corroborando com o aumento na produção de NO[•] previamente observado em nosso estudo através da medição de nitratos e nitritos. Considerando que a toxicidade do NO[•] per se não é

muito alta, a reação do mesmo com $O_2^{\bullet-}$ forma $ONOO^-$, um potente agente oxidante que modifica resíduos de tirosina de proteínas, levando à formação de nitrotirosina (Beckman and Koppenol, 1996). Assim, é possível que esse achado imunohistoquímico possa ter sido devido ao ataque do $ONOO^-$ a resíduos proteicos de tirosina. Por fim, utilizamos o L-NAME para verificar uma possível prevenção do ataque nitrosativo causado pelo Fit nas proteínas do cerebelo. Nossos resultados mostraram que o L-NAME preveniu totalmente o dano nitrosativo provocado pelo Fit. Além disso, o inibidor da iNOS atenuou a astrogliose, medida através da imunofluorescência para o GFAP, sugerindo que ERN são parcialmente responsáveis pela gliose reativa. Nesse particular, um estudo realizado previamente com células vasculares demonstrou que o Fit e o ácido pristânico provocaram um aumento nas concentrações de mRNA e da proteína iNOS, além de induzir apoptose (Idel et al., 2002). Os mesmos autores demonstraram nesse estudo que inibidores competitivos da iNOS foram capazes de diminuir a apoptose.

Os resultados do presente trabalho demonstram que uma injeção única de Fit provocou uma alteração da homeostase redox em cerebelo de ratos jovens. Verificamos que a administração intracerebelar do Fit na dose utilizada induziu dano oxidativo lipídico, mas não proteico, além de diminuição das defesas antioxidantes. Observamos também que esse ácido graxo induziu a produção de nitratos e nitritos, mas não aumento da oxidação de DCFH, indicando uma ação principal de ERN sobre os efeitos verificados. O uso do inibidor da óxido nítrico sintase L-NAME inibiu o dano oxidativo lipídico e a diminuição de GSH, reforçando a importância das ERN nos efeitos pró-oxidantes do Fit. Os estudos imunohistoquímicos revelaram astrogliose através do aumento da marcação fluorescente da proteína GFAP, o que está de acordo com nossos resultados mostrando vários parâmetros de estresse oxidativo. A imunohistoquímica ainda revelou um ataque nitrosativo proteico, refletido pelo aumento da nitrotirosina, que foi prevenido pelo L-NAME, o que também está de acordo com nossos resultados indicando uma ação preponderante das ERN. Deve-se ressaltar que os resultados encontrados refletem a uma injeção aguda de Fit, enquanto que nas doenças peroxissomais, à exceção da DR, apresentam acúmulo de outros metabólitos, como o ácido pristânico e ácidos graxos de cadeia muito longa, portanto as alterações

verificadas correspondem apenas à ação do Fit e a sua ação isolada. Os dados aqui descritos podem demonstrar, portanto, pelo menos em parte, os mecanismos patológicos do dano cerebral apresentado pelos pacientes acometidos por essas doenças.

III.1.2. Resumo dos resultados

- A administração intracerebelar do Fit causou lipoperoxidação, sem provocar dano oxidativo proteico.
- A administração intracerebelar do Fit diminuiu as defesas antioxidantes, verificada pela redução dos níveis de GSH
- A administração intracerebelar do Fit aumentou a produção de ERN, medida pelas concentrações de nitratos e nitritos (produtos do óxido nítrico, NO[•]; estudo bioquímico), e por nitrotirosina (estudo imunohistoquímico). Não houve alteração da oxidação de DCFH, sugerindo que ERO não estavam envolvidas nos efeitos do Fit
- A administração intracerebelar do Fit causou astrogliose (aumento de GFAP em estudo imunohistoquímico), observada provavelmente pelo aumento de ERN
- O inibidor da óxido nítrico sintase L-NAME preveniu a lipoperoxidação e a diminuição dos níveis de GSH induzidas pelo Fit e também atenuou a formação de NO[•], reforçando o papel das ERN nos efeitos provocados pelo Fit
- O desequilíbrio da homeostase redox pode explicar, ao menos em parte, a patogênese do dano cerebelar que ocorre na DR em que o Fit se acumula

III.2. CONCLUSÕES

Tomando em conjunto os resultados encontrados, podemos inferir que o dano oxidativo e a astrogliose ocorrem provavelmente em função de um aumento da formação de ERN, demonstrando que o Fit induz estresse oxidativo *in vivo* em cerebelo de ratos jovens. Baseados nesses resultados e em resultados prévios *in vitro* sobre o papel pró-oxidante do Fit, é possível que um desequilíbrio da homeostase redox corresponda a um mecanismo relevante para explicar a fisiopatologia do dano cerebral (cerebelo no presente estudo) das doenças onde se acumula o Fit, como por exemplo a DR. Podemos presumir que o NO^{\bullet} produzido em quantidades excessivas, evidenciado pelo aumento da produção de NO^{\bullet} , poderia interagir com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ formando o tóxico ONOO^- , provocando nitrosilação proteica como evidenciado pelas análises imunohistoquímicas. Finalmente, propomos que o uso de antioxidantes que diminuam a formação de ERN possa servir potencialmente como um tratamento para as doenças em que o Fit se acumula.

III.3. PERSPECTIVAS

- Investigar os efeitos da administração *in vivo* do ácido fitânico sobre outros parâmetros de estresse oxidativo e morte celular de análises imunohistoquímicas em ratos jovens
- Investigar os efeitos da administração intracerebroventricular *in vivo* do ácido fitânico sobre parâmetros da homeostase redox em córtex cerebral de ratos jovens
- Investigar os efeitos da administração *in vivo* do ácido fitânico sobre parâmetros da bioenergética em córtex cerebral e em cerebelo de ratos jovens

III.4. REFERÊNCIAS

Baes, M., Huyghe, S., Carmeliet, P., Declercq, P., Collen, D., Mannaerts, G., Van Veldhoven, P., 2000. *Inactivation of the peroxisomal multifunctional protein-2 in mice impedes the degradation of not only 2-methyl-branched fatty acids and bile acid intermediates but also of very long chain fatty acids.* J Biol Chem 275:16329-16336

Baldwin EJ, Gibberd FB, Harley C, Sidey MC, Feher MD, Wierzbicki AS, 2010. *The effectiveness of long-term dietary therapy in the treatment of adult Refsum disease.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 81:954-957. doi: 10.1136/jnnp.2008.161059

Barth, P.G., Majoie, C.B., Gootjes, J., et al., 2004. *Neuroimaging of peroxisome biogenesis disorders (Zellweger spectrum) with prolonged survival.* Neurology 62:439-444

Bast, 1993. A. *Oxidative stress and calcium homeostasis.* In: Halliwell, B., Aruoma, O.I., eds. DNA and Free Radicals. Chichester: Ellis Horwood, 95-108

Beckman JS, Koppenol WH, 1996. *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and ugly.* Am J Physiol 271(5 Pt 1): C1424-37

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

Boveris, A., Chance, B., 1973. *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.* Biochem J. 134:707-716

Braverman, N.E., D'Agostino, M.D., MacLean, G.E., 2013. *Peroxisome Biogenesis Disorders: Biological, Clinical and Pathophysiological Perspectives.* Dev Disabil Res Rev 17:187-196

Burton, B.K., 1987. *Inborn Errors of Metabolism: The clinical diagnosis in early infancy.* Pediatrics 79:359-369

Busanello, E.N., Viegas, C.M., Moura, A.P., Tonin, A.M., Grings, M., Vargas, C.R., Wajner, M., 2010. *In vitro* evidence that phytanic acid compromises Na(+),K(+)-ATPase activity and the electron flow through the respiratory chain in brain cortex from young rats. *Brain Res* 1352:231-238

Busanello, E.N., Amaral, A.U., Tonin, A.M., Zanatta, A., Viegas, C.M., Vargas, C.R., Wajner, M., 2013 a. *Disruption of mitochondrial homeostasis by phytanic acid in cerebellum of young rats*. *Cerebellum* 12:362-369

Busanello, E.N., Zanatta, A., Tonin, A.M., Viegas, C.M., Vargas, C.R., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A., Wajner, M, 2013 b. *Marked inhibition of Na+, K(+)- ATPase activity and the respiratory chain by phytanic acid in cerebellum from young rats: possible underlying mechanisms of cerebellar ataxia in Refsum disease*. *J Bioenerg Biomembr* 45:137-144

Chae, H.Z., Kim, H.J., Kang, S.W., Rhee, S.G., 1999. *Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin*. *Diabetes Res Clin Pract* 45(2-3):101-12.

Del Rio, R.M., 1962. *Aminoacidopatias congenitas y sus repercusiones en el desarrollo del SNC*

Delanty, N.; Dichter, M. A., 1998. *Oxidative injury in the nervous system*. *Acta Neurol Scand* 98:145-153

Dröge, W., 2002. *Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*. *Physiol Rev* 82:47-95

El-Bassyouni, H.T., Maksoud Abdel, S.A., Salem, F.A., Badr El-Deen, R., Abdel Aziz, H., Thomas, M.M, 2012. *Evidence of oxidative stress in peroxisomal disorders*. Singapore Med J 53:608-614

Faust, P.L., 2003. *Abnormal cerebellar histogenesis in PEX2 Zellweger mice reflects multiple neuronal defects induced by peroxisome deficiency*. J Comp Neurol 461:394-413

Ferdinandusse S., Rusch, H., van Lint, A., Dacremont, G., Wanders, R., Vreken, P., 2002. *Stereochemistry of the peroxisomal branched-chain fatty acids alpha- and beta-oxidation systems in patients suffering from different peroxisomal disorders*. J Lipid Res 43:438-444

Ferdinandusse, S., Finckh, B., de Hingh, Y.C., Stroomer, L.E., Denis, S., Kohlschutter, A., Wanders, R.J., 2003. *Evidence for increased oxidative stress in peroxisomal D-bifunctional protein deficiency*. Mol Genet Metab 79(4):281-287

Ferdinandusse, S., Zomer, A.W., Komen, J.C., van den Brink, C.E., Thanos, M., Hamers, F.P., Wanders, R.J., van der Saag, P.T., Poll-The, B.T., Brites, P., 2008. *Ataxia with loss of Purkinje cells in a mouse model for Refsum disease*. Proc Natl Acad Sci U S A 105(46):17712-7

Grings, M., Tonin, A.M., Knebel, L.A., Zanatta, A., Moura, A.P., Filho, C.S., Wajner, M., Leipnitz, G., 2012. *Phytanic acid disturbs mitochondrial homeostasis in heart of young rats: a possible pathomechanism of cardiomyopathy in Refsum disease*. Mol Cell Biochem 366:335-343

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Measurement of reactive species*. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th ed.:268-340

Halliwell, B., 2001. *Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment*. Drugs & Aging 18:685-716

Halliwell, B., 1996. *Free radicals, protein and DNA: oxidative damage versus redox regulation*. *Biochem Soc Trans* 24:1023-1027

Idel, S., Ellinghaus, P., Wolfrum, C., Nofer, J.R., Gloerich, J., Assmann, G., Spener, F., Seedorf, U., 2002. *Branched chain fatty acids induce nitric oxide-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem* 277:49319-49325

Kahlert, S., Schönfeld, P., Reiser, G., 2005. *The Refsum disease marker phytanic acid, a branched chain fatty acid, affects Ca²⁺ homeostasis and mitochondria, and reduces cell viability in rat hippocampal astrocytes*. *Neurobiol Dis* 18:110-118

Khan, A., Wei, X., Snyder, F., Mah, J., Waterham, H., Wanders, R., 2010. *Neurodegeneration in D-bifunctional protein deficiency: diagnostic clues and natural history using serial magnetic resonance imaging*. *Neuroradiology* 52(12):1163-6

Krause, C., Rosewich, H., Gärtner, J., 2009. *Rational diagnostic strategy for Zellweger syndrome spectrum patients*. *Eur J Hum Genet* 17:741-8

Leipnitz, G., Amaral, A.U., Zanatta, A., Seminotti, B., Fernandes, C.G., Knebel, L.A., Vargas, C.R., Wajner, M., 2010. *Neurochemical evidence that phytanic acid induces oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in cerebellum and cerebral cortex of rats*. *Life Sci* 87(9-10):275-80

Lonnrot, K., Metsa-Ketela, T., Molnar, G., et al. *The effect of ascorbic acid and ubiquinone supplementation on plasma and CSF total antioxidant capacity*. *Free Radic Biol Med* 21:211-217

Maxwell, S.R.J., 1995. *Prospects for the use of antioxidant therapies*. *Drugs* 49:345-361

McLean, B., Allen, J., Ferdinandusse, S., Wanders, R., 2002. *A new defect of peroxisomal function involving pristanic acid: a case report*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72:396-399

Möller, G., van Grunsven, E., Wanders, R., Adamski, J., 2001. *Molecular basis of D-*

bifunctional protein deficiency. Mol Cell Endocrinol 171:61-70

Müller, C.C., Nguyen, T.H., Ahlemeyer, B., Meshram, M., Santrampurwala, N., Cao, S., Sharp, P., Fietz, P.B., Baumgart-Vogt, E., Crane, D.I., 2010. *PEX13 deficiency in mouse brain as a model of Zellweger syndrome: abnormal cerebellum formation, reactive gliosis and oxidative stress*. Dis Model Mech 4(1):104-19

Poll-The B.T., Gootjes, J., Duran, M., De Klerk, J.B., Wenniger-Prick, L.J., et al., 2004. *Peroxisome biogenesis disorders with prolonged survival: phenotypic expression in a cohort of 31 patients*. Am J Med Genet A 126A:333-8

Rafique, M., Zia, S., Rana, M.N., Mostafa, O.A., 2013. *Zellweger syndrome – a lethal peroxisome biogenesis disorder*. J Pediatr Endocr Met 26(3-4):377-379

Reiser, G., Schönfeld, P., Kahlert, S., 2005. *Mechanism of toxicity of the branched-chain fatty acid phytanic acid, a marker of Refsum disease, in astrocytes involves mitochondrial impairment*. Int J Dev Neurosci 24:113-122

Rüether, K., Baldwin, M., Casteels, M., Feher, M.D., Horn, M., Kuranoff S., et al, 2010. *Adult Refsum disease: a form of tapetoretinal dystrophy accessible to therapy*. Surv Ophthalmol 55:531-538

Schönfeld, P., Kahlert, S., Reiser, G., 2006. *A study of the cytotoxicity of branched-chain phytanic acid with mitochondria and rat brain astrocytes*. Exp Gerontol 41:688-696

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., 2001. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill Inc., p. 3-45

Setchell K, Heubi J, Bove K, O'Connell N, Brewsaugh T, Steinberg S, Moser A, Squires RJ, 2003. *Liver disease caused by failure to racemize trihydroxycholestanic acid: gene mutation and effect of bile acid therapy*. Gastroenterology 124 (1):217-232. doi: S0016508503500336

Sinclair, L.A., 1982. *A new look at the inborn errors of metabolism*. Ann Clin Biochem 19:314-321

Sies, H., 1985. *Oxidative stress: introductory remarks*. In: Sies, H., ed. Oxidative Stress. London: Academic Press

Smith E, Gavrilov D, Oglesbee D, Freeman W, Vavra M, Matern D, Tortorelli S, 2010. *An adult onset case of alpha-methyl-acyl-CoA racemase deficiency*. J Inherit Metab Dis doi: 10.1007/s10545-010-9183-6

Southorn, P. A., Powis, G. *Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions*. Mayo Clin. Proc. v. 63, p. 381-389, 1988

Surdacki, A., Tsikas, D., Mayatepek, E., Frölich, J.C., 2003. *Elevated urinary excretion of nitric oxide metabolites in young infants with Zellweger syndrome*. Clin Chim Acta 334:111-115

Van Veldhoven, P.P., 2010. *Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism*. J Lipid Res 51:2863-2895

Verhoeven, N.M., Roe, D.S., Kok, R.M., Wanders, R.J., Jakobs, C., Roe, C., 1998. *Phytanic acid and pristanic acid are oxidized by sequential peroxisomal and mitochondrial reactions in cultured fibroblasts*. J Lipid Res 39:66-74

Verhoeven, N.M., Jakobs, C., 2001. *Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid*. Prog Lipid Res 40:453-466

Wanders, R., Jansen, G., Lloyd, M., 2003. *Phytanic acid alpha-oxidation, new insights into an old problem: a review*. Biochim Biophys Acta 1631:119-135

Wanders, R.J., Waterham, H.R., 2006. *Peroxisomal disorders: the single peroxisome enzyme deficiencies*. Biochim Biophys Acta 1763:1707-1720

Wanders, R.J., Komen, J., 2007. *Peroxisomes, Refsum's disease and the alpha- and omega-oxidation of phytanic acid*. *Biochem Soc Trans* 35:865-869

Wanders, R.J., Komen, J., Ferdinandusse, S., 2011. *Phytanic acid metabolism in health and disease*. *Biochim Biophys Acta* 1811:498-507

Ward, R. J.; Peters, T. J., 1995. Free Radicals. In: Marshall, W.J.; Bangert, S.K. (Eds). *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. New York: Churchill Livingstone, 765-777

Wierzbicki, A., 2007. *Peroxisomal disorders affecting phytanic acid alpha-oxidation: a review*. *Biochem Soc Trans* 35:881-886

Wierzbicki, A., Lloyd, M., 2007. *Dr Brian Gibberd (1931-2006): a pioneering clinician in Refsum's disease*. *Biochem Soc Trans* 35:862-864

Yeldandi, A., Rao, M., Reddy, J., 2000. *Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis*. *Mutat Res* 448:159-177

Zaleska, M.M., Floyd, R.A., 1985. *Regional lipid peroxidation in rat brain in vitro: possible role of endogenous iron*. *Neurochem Res* 10:397-410