

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Trabalho de Conclusão em Ciências Biológicas

**O ÁCIDO FITÂNICO INDUZ DANO OXIDATIVO LIPÍDICO E PROTEICO E  
REDUZ AS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS EM CORAÇÃO  
DE RATOS JOVENS**

Autor: Mateus Grings

Orientador: Prof. Dr. Guilhian Leipnitz

Co-orientadora: Anelise Miotti Tonin

Porto Alegre, 2011

**Artigo escrito de acordo com as normas da revista “Life Sciences”**

**O ácido fitânico induz dano oxidativo lipídico e proteico e reduz as defesas antioxidantes não enzimáticas em coração de ratos jovens**

Mateus Grings<sup>a</sup>, Anelise Miotti Tonin<sup>a</sup>, Ângela Zanatta<sup>a</sup>, Lisiane Aurélio Knebel<sup>a</sup>,  
Alana Pimentel Moura<sup>a</sup>, Moacir Wajner<sup>a,b</sup>, Guilhian Leipnitz<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>b</sup>Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

**Autor correspondente:** Guilhian Leipnitz, Departamento de Bioquímica,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 -  
Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel: +55 51 33085572. Fax:  
+55 51 33085539, E-mail: [guilhian@ufrgs.com](mailto:guilhian@ufrgs.com)

## **Resumo**

*Objetivos:* Considerando que a fisiopatologia da cardiomiopatia encontrada em portadores da doença de Refsum é pouco conhecida, o presente trabalho investigou os efeitos in vitro do ácido fitânico (Fit), metabólito acumulado na doença de Refsum, sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo em coração de ratos jovens.

*Métodos:* Foram determinados os efeitos do Fit sobre a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS; peroxidação lipídica), formação de grupamentos carbonila e oxidação de grupamentos sulfidril (dano proteico), concentrações de glutathiona reduzida (GSH; defesa antioxidante não enzimática) e oxidação da diclorofluorescina (DCFH; geração de espécies reativas).

*Resultados:* Os resultados mostram que o Fit aumentou significativamente os níveis de TBA-RS, indicando que esse ácido graxo induz lipoperoxidação. O Fit também induziu dano oxidativo proteico (aumento na formação de grupamentos carbonila). Além disso, foi verificado que o Fit diminuiu os níveis de GSH. O aumento nos níveis de TBA-RS e a diminuição de GSH causado pelo Fit foram prevenidos pela adição de melatonina e trolox, indicando o envolvimento de espécies reativas nesses efeitos. Finalmente, o Fit aumentou a oxidação do DCFH, reforçando os achados de que esse ácido graxo induz a produção de espécies reativas.

*Importância:* Pode ser presumido que o estresse oxidativo induzido pelo Fit em coração pode contribuir, ao menos em parte, para a fisiopatologia da cardiomiopatia apresentada pelos pacientes acometidos pela doença de Refsum.

*Palavras-chave:* Doença de Refsum, ácido fitânico, estresse oxidativo, coração.

## **Introdução**

O ácido fitânico (Fit, ácido 3,7,11,15-tetrametilhexadecanóico) é um ácido graxo saturado de cadeia ramificada derivado da clorofila (Verhoeven e Jakobs 2001) que encontra-se acumulado em várias doenças peroxissomais, sendo a principal delas a doença de Refsum (Brosius e Gartner 2002; Gould et al. 2001; Wanders et al. 1993). A doença de Refsum é uma desordem de herança autossômica recessiva caracterizada pela deficiência da enzima fitanoil-CoA hidroxilase, que catalisa o primeiro passo da  $\alpha$ -oxidação peroxissomal de ácidos graxos ramificados, convertendo fitanoil-CoA em 2-hidroxifitanoil-CoA. O bloqueio dessa rota leva ao acúmulo do Fit nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes, podendo atingir concentrações de até 5000  $\mu$ M no plasma (níveis plasmáticos em indivíduos normais: 5  $\mu$ M) (Wanders et al. 2003).

Os portadores da doença de Refsum apresentam retinite pigmentosa, polineuropatia periférica, ataxia cerebelar e cardiomiopatia, a qual é caracterizada principalmente por arritmia e é uma das principais causas de morte dos pacientes (Mönnig et al. 2004; Wanders et al. 2006; Wanders et al. 2001; Weinstein et al. 1999; Wierzbicki 2007). Outros achados clínicos envolvendo o coração incluem taquicardia, sopro sistólico, insuficiência cardíaca e cardiomegalia (Koh et al. 2001; Mönnig et al. 2004).

Os mecanismos responsáveis pela cardiomiopatia nos pacientes ainda são pouco conhecidos, embora já tenha sido observado que a redução dos níveis de fitol na dieta leva a uma diminuição dos níveis de Fit e atrasa a progressão de sintomas, indicando uma ação tóxica do Fit no coração (Baldwin et al. 2010; Ferdinandusse et al. 2008; Gibberd et al. 1979; Hungerbuhler et al.

1985; Masters-Thomas et al. 1980). Já foi verificado também que as arritmias estão diretamente relacionadas aos níveis plasmáticos de Fit (Gibberd et al. 1985; Weinstein et al. 1999) e que o acúmulo de Fit em fosfolipídios de membrana do miocárdio está associado com bradicardia e danos na condução de impulsos intraventriculares e do nodo atrioventricular (Mönnig 2004). Nesse contexto, estudos prévios já demonstraram que o Fit induz despolarização no potencial de membrana e altera o fluxo de elétrons na cadeia respiratória em mitocôndrias de cérebro de ratos (Kahlert et al. 2005; Komen et al. 2007; Reiser et al. 2006; Schönfeld et al. 2004). Além disso, foi evidenciado que o Fit aumenta a produção de espécies reativas e induz estresse oxidativo em córtex cerebral e cerebelo de ratos (Leipnitz et al. 2010; Ronicke et al. 2009). Tais resultados sugerem que defeitos no metabolismo energético mitocondrial e a produção aumentada de espécies reativas são importantes mecanismos envolvidos na toxicidade do Fit em cérebro.

Considerando que a fisiopatologia da cardiomiopatia encontrada em portadores da doença de Refsum não está estabelecida, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do Fit sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), a formação de grupamentos carbonila, a oxidação de grupamentos sulfidrila, os níveis de glutatona reduzida (GSH) e a oxidação da diclorofluorescina (DCFH) em coração de ratos jovens.

## **Material e Métodos**

### *Animais*

Foram utilizados ratos Wistar machos de 30 dias de vida criados no biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Os animais foram

mantidos em ciclo de 12 h claro / escuro em uma sala com temperatura controlada de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , com livre acesso à água e comida (ração comercial Supra, contendo 20% de proteínas P/P). Os experimentos realizados seguiram o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (publicação do NIH N° 80-23, revisado em 1996) e as normas do “Canadian Council on Animal Care (CCAC)”. Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais utilizados e o seu sofrimento.

### *Reagentes*

Todos os reagentes utilizados foram da marca Sigma (St. Louis, MO, USA). O ácido fitânico foi primeiramente preparado em metanol e, no dia dos experimentos, foi diluído no tampão utilizado para cada técnica, tendo o seu pH ajustado para 7,4. A concentração máxima de metanol no meio de incubação foi de 1 %, a qual não causa modificações em nenhum dos parâmetros testados.

### *Preparação da amostra e incubação*

No dia dos experimentos os animais foram anestesiados com cetamina / xilazina (9:6 V/V) e sofreram perfusão intracardíaca com solução salina (NaCl 0,9 %). O coração foi removido e homogeneizado em tampão contendo fosfato de sódio 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4, na proporção de 1:10 (P/V). O homogeneizado obtido foi então centrifugado a 1000 g a  $4^\circ\text{C}$  durante 20 min (Evelson et al. 2001). O sobrenadante, constituído de uma mistura de organelas preservadas, incluindo mitocôndrias, foi separado e alíquotas foram utilizadas para a realização de uma incubação de 1 h a  $37^\circ\text{C}$  na ausência do



metabólito (grupo controle) ou na presença do mesmo (grupos teste). Para a avaliação do efeito in vitro do Fit sobre os vários parâmetros de estresse oxidativo, o ácido foi suplementado no meio de incubação em concentrações que variaram de 1 a 500  $\mu\text{M}$ . Em alguns experimentos o sobrenadante de coração foi co-incubado por 1 h com Fit 500  $\mu\text{M}$  e com cada um dos seguintes antioxidantes: trolox (TRO, 10  $\mu\text{M}$ ), GSH (1500  $\mu\text{M}$ ), melatonina (MEL, 500 ou 1500  $\mu\text{M}$ ) ou  $\text{N}^\omega$ -nitro-L-arginina (L-NAME, 500  $\mu\text{M}$ ). Para a medida da produção de espécies reativas a partir do método da oxidação do DCFH, o coração foi isolado e cortado em fatiador (McIlwain), sendo preparadas fatias de 75 mg.

#### *Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)*

Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foram determinados de acordo com o método de Yagi (1998) com modificações. Após a incubação, uma alíquota de amostra foi adicionada de dois volumes de ácido tricloroacético 10 % e de um volume de ácido tiobarbitúrico 0,67 % preparado em sulfato de sódio. Os tubos contendo a mistura foram incubados durante 1 h em banho de água fervente e, após, foram resfriados durante 5 min. O complexo rosa resultante foi extraído com 400  $\mu\text{L}$  de butanol e a fluorescência da fase orgânica foi lida a 515 nm (excitação) e 553 nm (emissão). Uma curva de calibração foi realizada utilizando-se 1,1,3,3-tetrametoxipropano e submetida ao mesmo tratamento que as amostras. Os níveis de TBA-RS foram calculados como nmol / mg de proteína e os resultados representados em porcentagem do controle.

### *Formação de grupamentos carbonila*

A medida de formação de grupamentos carbonila foi realizada espectrofotometricamente, de acordo com o método de Reznick e Packer (1994). Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da incubação foi tratada com 400  $\mu\text{L}$  de uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) 10 mM preparada em HCl 2,5 N ou com HCl 2,5 N (branco) e posteriormente deixada no escuro por 1 h à temperatura ambiente. As amostras foram então precipitadas com ácido tricloroacético 20 % e centrifugadas durante 5 min a 9000 g. Após a centrifugação, o sedimento obtido foi lavado com uma mistura de etanol:acetato de etila (1:1, V/V) e ressuspendido em 550  $\mu\text{L}$  de guanidina 6 M. Para calcular o conteúdo de carbonilas da amostra a 370 nm foi utilizada a diferença entre as absorvâncias obtidas para as amostras tratadas com DNFH e as tratadas com HCl (branco). Os resultados foram calculados como nmol de carbonilas / mg de proteína utilizando-se o coeficiente de extinção de  $22.000 \times 10^6$  nmol / mL para hidrazonas alifáticas e foram expressos em porcentagem do controle.

### *Oxidação de grupamentos sulfidrila*

Este parâmetro é baseado na redução do reagente ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) por grupamentos tióis, gerando um derivado de cor amarela (TNB), cuja absorção é medida espectrofotometricamente (Aksenov e Markesbery 2001). Primeiramente, 0,1 mM de DTNB foi adicionado a uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  proveniente da incubação, sendo seguida de uma incubação de 30 min no escuro à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a

medida da absorbância a 412 nm. Os resultados foram calculados como nmol de TNB / mg de proteína e representados em porcentagem do controle.

#### *Concentrações de glutathiona reduzida (GSH)*

As concentrações de GSH foram determinadas através do método descrito por Browne e Armstrong (1998) modificado. Após a incubação, foi adicionado um volume de ácido metafosfórico à amostra, a qual foi então centrifugada a 7000 g por 10 min. Foram retiradas alíquotas de 30 µL do sobrenadante, às quais foram adicionados 185 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0, contendo EDTA 5 mM, e 15 µL de o-ftaldialdeído (1 mg / mL, preparado em metanol). Esta mistura foi incubada no escuro à temperatura ambiente durante 15 min e posteriormente lida em fluorímetro a 350 nm (excitação) e 420 nm (emissão). As concentrações de GSH foram calculadas a partir de uma curva padrão de GSH (0,001-1 mM) como nmol / mg de proteína e representadas em porcentagem do controle.

#### *Oxidação da diclorofluorescina (DCFH)*

A produção de espécies reativas foi determinada de acordo com o método de Lebel et al. (1992) modificado. Durante a incubação de 1 h a 37 °C na presença de Fit, as fatias de coração (75 mg) também foram expostas à 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) (5 µM), a qual é permeável à membrana celular. No meio intracelular, esterases clivam o grupamento acetato do DCF-DA, gerando a forma reduzida não fluorescente DCFH. As espécies reativas presentes no meio oxidam o DCFH, produzindo então o produto fluorescente DCF. A fluorescência foi medida em fluorímetro em

diferentes períodos de incubação (1-60 min), utilizando-se comprimentos de onda de excitação e emissão de 480 e 535 nm, respectivamente. Uma curva de calibração foi realizada com DCF padrão (1-100  $\mu$ M) e a produção de espécies reativas foi calculada em pmol de DCF formado / g de tecido e representada em porcentagem do controle.

#### *Dosagem de proteínas*

A determinação da concentração de proteínas no sobrenadante de coração foi feita através do método de Lowry et al. (1951) usando como padrão a albumina sérica bovina.

#### *Análise estatística*

Os dados foram analisados através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan quando o valor de F foi significativo. A análise de variância com regressão linear também foi aplicada quando necessário. A análise estatística foi realizada através do programa SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”) em um computador compatível. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

### **Resultados**

Inicialmente, foi avaliado o efeito do Fit sobre a medida de TBA-RS em coração de ratos jovens. A Figura 1A mostra que o Fit aumentou significativamente os níveis de TBA-RS (até 470%) [ $F_{(4,15)}=14,561$ ;  $P < 0,001$ ] de forma dose-dependente [ $\beta=0,811$ ;  $P < 0,001$ ]. Também foi investigado o efeito de antioxidantes sobre o aumento dos níveis de TBA-RS causado pelo Fit e foi

observado que o TRO (10  $\mu\text{M}$ ) e a MEL (1500  $\mu\text{M}$ ) atenuaram a peroxidação lipídica causada pelo ácido graxo [ $F_{(5,18)}=9,782$ ;  $P<0,001$ ] (Figura 1B). Por outro lado, a GSH (1500  $\mu\text{M}$ ) e o L-NAME (500  $\mu\text{M}$ ) não alteraram esse parâmetro.

A seguir, estudamos o efeito do Fit sobre a formação de grupamentos carbonila e a oxidação de grupamentos sulfidrila em sobrenadante de coração a fim de avaliar o dano oxidativo proteico. O Fit aumentou a formação de grupamento carbonila (até 135%) [ $F_{(4,15)}=3,569$ ;  $P<0,01$ ] (Figura 2A), mas não alterou significativamente a oxidação de grupamentos sulfidrila (Figura 2B).

O próximo passo foi investigar o efeito do Fit sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH), uma importante defesa antioxidante não-enzimática. Observamos que o Fit diminuiu significativamente os níveis de GSH (até 30%) [ $F_{(4,15)}=3,785$ ;  $P<0,05$ ] (Figura 3A). A diminuição de GSH causada pelo Fit foi totalmente prevenida na presença de MEL (500  $\mu\text{M}$ ) [ $F_{(4,25)}=18,155$ ;  $P<0,001$ ] (Figura 3B), mas não por TRO (10  $\mu\text{M}$ ) e L-NAME (500  $\mu\text{M}$ ).

A produção de espécies reativas pelo Fit foi então avaliada através da oxidação do DCFH. Os resultados mostram que o Fit aumentou a produção de espécies reativas nos tempos de incubação de 1 min [ $F_{(2,15)}=11,293$ ;  $P<0,001$ ], 15 min [ $F_{(2,15)}=34,357$ ;  $P<0,001$ ], 30 min [ $F_{(2,15)}=8,979$ ;  $P<0,01$ ], 45 min [ $F_{(2,15)}=6,340$ ;  $P<0,01$ ] e 60 min [ $F_{(2,15)}=6,332$ ;  $P<0,01$ ] em fatias de coração (Figura 4). Foi observado que o Fit, na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , aumentou significativamente a oxidação do DCFH em relação ao controle até o período de 30 min de incubação, ao passo que não houve alterações significativas nos períodos de 45 e 60 min. Já na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , o Fit aumentou a produção de espécies reativas em todos os tempos de incubação investigados.

## **Discussão**

A doença de Refsum é um distúrbio bioquimicamente caracterizado pelo acúmulo tecidual de Fit. Apesar de a cardiomiopatia ser apontada como uma das principais causas de óbito de portadores dessa doença, a fisiopatologia responsável por esse dano ainda não está bem estabelecida. Neste contexto, diversos trabalhos sugerem o envolvimento de espécies reativas e estresse oxidativo em doenças cardiovasculares (Sugamura, 2011; Wattanapitayakul, 2001). Dessa forma, no presente estudo investigamos os efeitos do Fit sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo em coração de ratos, a fim de melhor elucidar os mecanismos fisiopatogênicos envolvidos na cardiomiopatia apresentada pelos portadores da doença de Refsum.

Inicialmente, foi observado que o Fit aumentou significativamente os níveis de TBA-RS em coração de ratos jovens. A medida de TBA-RS reflete principalmente a formação de malondialdeído (MDA), um dos produtos resultantes da peroxidação de ácidos graxos de membrana. O MDA é altamente tóxico, já que reage com proteínas e bases do DNA, causando alterações nos resíduos de aminoácidos e provocando mutações, respectivamente (Halliwell e Gutteridge 2007). Portanto, o aumento deste parâmetro indica que o Fit induz peroxidação lipídica in vitro em coração. Além disso, foi observado que o dano oxidativo lipídico causado pelo Fit foi atenuado pelo TRO, um sequestrador de radicais peroxila, e pela MEL, a qual sequestra principalmente radicais hidroxila e peroxila, indicando que estes radicais livres estão envolvidos neste efeito. Estes resultados sugerem que o Fit provoca um pronunciado efeito pró-oxidante em lipídios de membrana de coração, mediado pela geração de espécies reativas.

O Fit também induziu a formação de grupamentos carbonila, indicando que este ácido graxo provoca dano oxidativo proteico. Por outro lado, foi observado que o ácido não alterou o conteúdo de grupamentos sulfidril. Grupamentos carbonila (aldeídos e cetonas) são produzidos principalmente por clivagem de proteínas ou pela oxidação direta das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos (principalmente Thr, Lys, Arg e Pro) (Dalle-Donne et al. 2003; Levine 2002). Os grupamentos carbonila também podem ser formados pela reação de aldeídos (incluindo aqueles gerados durante a peroxidação lipídica) com proteínas (Dalle-Donne et al. 2003; Halliwell e Whiteman 2004). Embora o exato mecanismo pelo qual o Fit causa dano oxidativo a proteínas em coração ainda seja desconhecido, é provável que espécies reativas ou produtos da lipoperoxidação possam interagir com os grupamentos das proteínas levando à sua oxidação.

Com relação às defesas antioxidantes, nossos resultados mostraram que o Fit diminuiu as concentrações de GSH, uma importante defesa antioxidante não-enzimática e a fonte não-proteica de grupos tióis mais abundante das células. Além disso, observamos que a MEL foi capaz de prevenir a diminuição dos níveis de GSH induzida pelo Fit, indicando que radicais peroxila e hidroxila estão envolvidos neste processo e reforçando o papel destes radicais no dano oxidativo causado pelo Fit, uma vez que esses radicais também parecem estar envolvidos na peroxidação lipídica induzida por este ácido. Nesse contexto, estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que o Fit não alterou o conteúdo de grupamentos sulfidril de uma solução comercial purificada de GSH na ausência de amostra, indicando que este ácido graxo não apresenta um efeito oxidativo direto (Leipnitz et al. 2010).

A seguir, foi mostrado que o Fit aumenta a oxidação de DCFH em coração, o qual pode ser diretamente convertido a DCF pelos radicais peroxila, alcoxila, dióxido de nitrogênio, carbonato e hidroxila, bem como por peroxinitrito (Bilski et al. 2002; Ischiropoulos et al. 1999; Lebel et al. 1992; Myhre et al. 2003; Ohashi et al. 2002; Wardman et al. 2002). O aumento na oxidação do DCFH, aliado ao fato de que sequestradores de espécies reativas preveniram o aumento dos níveis de TBA-RS e a diminuição de GSH induzido pelo Fit sugere que os efeitos causados pelo Fit são mediados por espécies reativas. Esses resultados estão de acordo com achados prévios que demonstram um aumento na produção de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias de coração de ratos (Schönfeld e Reiser 2006). Também é importante salientar que o fato de o L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase, não ter alterado a peroxidação lipídica e a diminuição de GSH causada pelo Fit em coração, indica que não há o envolvimento de espécies reativas de nitrogênio nesses efeitos.

Ainda com relação à medida da oxidação do DCFH, foi observado que o Fit, na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , aumentou esse parâmetro até os 30 min de incubação, mas não causou alteração significativa nos tempos de 45 e 60 min. Por outro lado, 1  $\mu\text{M}$  de Fit aumentou a oxidação de DCFH em todos os períodos de incubação avaliados (até 60 min). Essa variação encontrada no efeito do Fit em diferentes concentrações e em diferentes tempos de incubação poderia ser explicada por uma inibição de esterases intracelulares, enzimas responsáveis pela clivagem do grupamento acetato do DCF-DA, causada por altas concentrações de Fit (500  $\mu\text{M}$ ) ao longo do tempo. Vários compostos têm sido descritos como inibidores de esterases (Estévez et al. 2011; Qi et al. 2011;



Yan e Harding 1999), inclusive alguns ácidos graxos (Franco-Pons et al. 2008; Nguyen e Sok 2004; Romani et al. 2011; Tavori et al. 2011). Além disso, de acordo com Halliwell e Whiteman (2004), uma variação no conteúdo celular de esterases também pode afetar o uso do DCF-DA como uma sonda para a medida de produção de espécies reativas.

Não podemos determinar a relevância fisiopatológica dos nossos achados, uma vez que as concentrações do Fit no coração de pacientes afetados pela doença de Refsum são desconhecidas. Entretanto, considerando que os pacientes geralmente apresentam concentrações plasmáticas de Fit maiores que 200  $\mu\text{M}$ , podendo atingir até 5000  $\mu\text{M}$  (Ferdinandusse et al. 2008; Wanders et al. 2003), e que as alterações encontradas nos parâmetros de estresse oxidativo foram obtidas em concentrações similares ou até mesmo menores do que estas, é possível que os presentes resultados tenham importante relevância patológica.

## **Conclusão**

O presente estudo indica que o Fit induz dano oxidativo lipídico e proteico e diminui as defesas antioxidantes em coração de ratos jovens in vitro através da geração de espécies reativas. Caso estes achados sejam confirmados em experimentos in vivo e em tecidos de pacientes acometidos pela doença de Refsum, pode-se presumir que o estresse oxidativo pode contribuir, ao menos em parte, para a cardiomiopatia apresentada por estes pacientes. Além disso, o uso de agentes antioxidantes poderia representar uma nova abordagem terapêutica, junto com outras medidas, no tratamento dos pacientes afetados por esse distúrbio genético.

### **Declaração de conflito de interesses**

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo CNPq, PRONEX II, FINEP, Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00, INCT-EN.

## Referências

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

Baldwin EJ, Gibberd FB, Harley C, Sidey MC, Feher MD, Wierzbicki AS. The effectiveness of long-term dietary therapy in the treatment of adult Refsum disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81(9):954-7.

Bilski P, Belanger AG, Chignell CF. Photosensitized oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein: singlet oxygen does not contribute to the formation of fluorescent oxidation product 2',7'-dichlorofluorescein. *Free Radic Biol Med* 2002;33:938-946.

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

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

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

Estévez J, García-Pérez A, Barril J, Vilanova E. Inhibition with spontaneous reactivation of carboxyl esterases by organophosphorus compounds: paraoxon as a model. *Chem Res Toxicol* 2011;24(1):135-43.

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* 2001;388:261-266.

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. Ataxia with loss of Purkinje cells in a mouse model for Refsum disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17712–17717.

Franco-Pons N, Marsillach J, Joven J, Camps J, Closa D. Serum paraoxonase undergoes inhibition and proteolysis during experimental acute pancreatitis. *J Gastroint Surg* 2008;12(5):891-9.

Gibberd FB, Billimoria JD, Page NG, Retsas S. Heredopathia atactica polyneuritiformis (Refsum's disease) treated by diet and plasma-exchange. *Lancet* 1979;1:575–578.

Gibberd FB, Billimoria JD, Goldman JM, Clemens ME, Evans R, Whitelaw MN, Retsas S, Sherratt RM. Heredopathia atactica polyneuritiformis: Refsum's disease. *Acta Neurol Scand* 1985;72:1-17.

Gould SJ, Raymond GV, Valle D. The peroxisome biogenesis disorders. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 3181–3217, 2001.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Measurement of reactive species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editores. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press, p. 268–340, 2007.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004;142:231–255.

Hungerbuhler JP, Meier C, Rousselle L, Quadri P, Bogousslavsky J. Refsum's disease: management by diet and plasmapheresis. *Eur Neurol* 1985;24:153–159.

Ischiropoulos H, Gow A, Thom SR, Kooy NW, Royall JA, Crow JP. Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. *Methods Enzymol* 1999;301:367–373.

Kahlert S, Schonfeld P, Reiser G. The Refsum disease marker phytanic acid, a branched chain fatty acid, affects Ca<sup>2+</sup> homeostasis and mitochondria, and reduces cell viability in rat hippocampal astrocytes. *Neurobiol Dis* 2005;18: 110-118.

Koh JT, Choi HH, Ahn KY, Kim JU, Kim JH, Chun JY, Baik YH, Kim KK. Cardiac characteristics of transgenic mice overexpressing Refsum disease gene-associated protein within the heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:1107-1116.

Komen JC, Distelmaier F., Koopman WJH, Wanders RJA, Smeitink J, Willems PHMG. Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:3271-3281.

Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992;5:227-231.

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

Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 2002;32:790–796.

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

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

Mönnig G, Wiekowski J, Kirchhof P, Stypmann J, Plenz G, Fabritz L, Bruns HJ, Eckardt L, Assmann G, Haverkamp W, Breithardt G, Seedorf U. Phytanic acid accumulation is associated with conduction delay and sudden cardiac death in sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x deficient mice. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004;15(11):1310-6.

Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1575–1582.

Nguyen SD, Sok DE. Preferential inhibition of paraoxonase activity of human paraoxonase 1 by negatively charged lipids. *J Lipid Res* 2004;45(12):2211-20.

Ohashi T, Mizutani A, Murakami A, Kojo S, Ishii T, Taketani S. Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species *FEBS Lett* 2002;511:21–27.

Qi M, Wang P, Selinger LB, Yanke LJ, Forster RJ, McAllister TA. Isolation and characterization of a ferulic acid esterase (Fae1A) from the rumen fungus *Anaeromyces mucronatus*. *J Appl Microbiol.* 2011;110(5):1341-50.

Reiser G, Schonfeld P, Kahert S. Mechanism of toxicity of the branched-chain fatty acid phytanic acid, a marker of Refsum disease, in astrocytes involves mitochondrial impairment. *Int J Devl Neurosci* 2006;24:113-122.

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994;233:357-363.

Romani R, Galeazzi R, Rosi G, Fiorini R, Pirisinu I, Ambrosini A, Zolese G. Anandamide and its congeners inhibit human plasma butyrylcholinesterase. Possible new roles for these endocannabinoids? *Biochim* 2011;1-8.

Ronicke S, Kruska N, Kahlert S, Reiser G. 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* 2009; 36:401-10.

Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G. In brain mitochondria the branched-chain fatty acid phytanic acid impairs energy transduction and sensitizes for permeability transition. *Biochem J* 2004;383:121-128.

Schönfeld P, Reiser G. Rotenone-like action of the branched-chain phytanic acid induces oxidative stress in mitochondria. *J Biol Chem* 2006;281(11):7136-42.

Sugamura K, Keaney JF Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*. 2011; [Epub ahead of print].

Tavori H, Aviram M, Khatib S, Musa R, Mannheim D, Karmeli R, Vaya J. Human carotid lesion linoleic acid hydroperoxide inhibits paraoxonase 1 (PON1) activity via reaction with PON1 free sulfhydryl cysteine 284. *Free Radic Biol Med* 2011;50(1):148-56.

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

Wanders RJ, Schutgens RB, Barth PG, Tager JM, van den Bosch H. Postnatal diagnosis of peroxisomal disorders: a biochemical approach. *Biochim* 1993;75:269–279.

Wanders RJ, Jakobs C, Skjeldal OH. Refsum disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 3303–3322, 2001.



Wanders RJA, Janse GA, Lloyd MD. Phytanic acid alpha-oxidation, new insights into an old problem: a review. *Biochim Biophys Acta* 2003;1631:119-135.

Wanders RJA, Waterham HR, Leroy BP. Refsum disease. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K. (eds). *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993-2006.

Wardman P, Burkitt MJ, Patel KB, Lawrence A, Jones CM, Everett SA, Vojnovic B. Pitfalls in the use of common luminescent probes for oxidative and nitrosative stress. *J. Fluores* 2002;12:65–68.

Wattanapitayakul SK, Bauer JA. Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications. *Pharmacol Ther.* 2001; 89(2):187-206.

Weinstein R. Phytanic acid storage disease (Refsum's disease): Clinical characteristics, pathophysiology and the role of therapeutic apheresis in its management. *J Clin Apher* 1999;14:181-184.

Wierzbicki AS. Peroxisomal disorders affecting phytanic acid  $\alpha$ -oxidation: a review. *Biochem Soc Trans* 2007;35(5):881-886.

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

Yan H, Harding JJ. Inactivation and loss of antigenicity of esterase by sugars and a steroid. *Biochim Biophys Acta* 1999;1454(2):183-90.

## Legendas das figuras

**Figura 1.** Efeito in vitro do ácido fitânico (Fit) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em coração de ratos jovens. O sobrenadante de coração foi incubado na ausência (controle) ou na presença de Fit (1-500  $\mu$ M) (A). Em alguns experimentos foram utilizados os antioxidantes trolox (TRO; 10  $\mu$ M), glutathiona reduzida (GSH; 1500  $\mu$ M), melatonina (MEL; 1500  $\mu$ M) e N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina (L-NAME; 500  $\mu$ M) com o objetivo de avaliar os efeitos desses compostos sobre o aumento da peroxidação lipídica (TBA-RS) induzida pelo Fit em sobrenadante de coração de ratos jovens (B). Os valores estão representados em média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em triplicata e estão expressos em porcentagem do controle (Controles: níveis de TBA-RS [nmol/mg proteína]: (A):  $0,25 \pm 0,03$ ; (B):  $0,26 \pm 0,09$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , comparado aos controles; # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , comparado ao Fit 500  $\mu$ M (Teste de raios múltiplos de Duncan).

**Figura 2.** Efeito in vitro do ácido fitânico (Fit) sobre a formação de grupamentos carbonila (A) e oxidação de grupamentos sulfidríla em coração de ratos jovens. O sobrenadante de coração foi incubado na ausência (controle) ou na presença de Fit (1-500  $\mu$ M). Os valores estão representados em média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em triplicata e estão expressos em porcentagem do controle (Controles: conteúdo de carbonilas [nmol/mg de proteína] (A):  $0,60 \pm 0,06$ ; conteúdo de sulfidrílas [nmol/mg de proteína] (B):  $39,97 \pm 5,99$ ). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , comparado aos controles (Teste de raios múltiplos de Duncan).

**Figura 3.** Efeito in vitro do ácido fitânico (Fit) sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) em coração de ratos jovens. O sobrenadante de coração foi incubado na ausência (controle) ou na presença de Fit (1-500  $\mu\text{M}$ ) (A). Em alguns experimentos foram utilizados os antioxidantes trolox (TRO; 10  $\mu\text{M}$ ), melatonina (MEL; 500  $\mu\text{M}$ ) e N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina (L-NAME; 500  $\mu\text{M}$ ) com o objetivo de verificar os efeitos desses compostos sobre a diminuição das concentrações de GSH induzida pelo Fit em sobrenadante de coração de ratos jovens (B). Os valores estão representados em média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em triplicata e estão expressos em porcentagem do controle (Controles: níveis de GSH [nmol/mg proteína]: (A):  $2,74 \pm 0,44$ ; (B):  $5,69 \pm 0,65$ ). \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ , comparado aos controles; ### $P < 0,001$ , comparado ao Fit 500  $\mu\text{M}$  (Teste de raios múltiplos de Duncan).

**Figura 4.** Efeito in vitro do ácido fitânico (Fit) sobre a oxidação da diclorofluorescina (DCFH) em coração de ratos jovens. Fatias de coração foram incubadas na ausência (controle) ou na presença de Fit (1 e 500  $\mu\text{M}$ ). Os valores estão representados em média  $\pm$  desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em triplicata e estão expressos em porcentagem do controle (Controles: formação de DCF [pmol/g de tecido]: 0 min:  $0,41 \pm 0,02$ ; 15 min:  $0,73 \pm 0,03$ ; 30 min:  $1,32 \pm 0,15$ ; 45 min:  $2,46 \pm 0,29$ ; 60 min:  $3,48 \pm 0,52$ ). \*\* $P < 0,01$ , Fit 1  $\mu\text{M}$  comparado aos controles; ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$ , Fit 500  $\mu\text{M}$  comparado aos controles (Teste de raios múltiplos de Duncan).

Figura 1

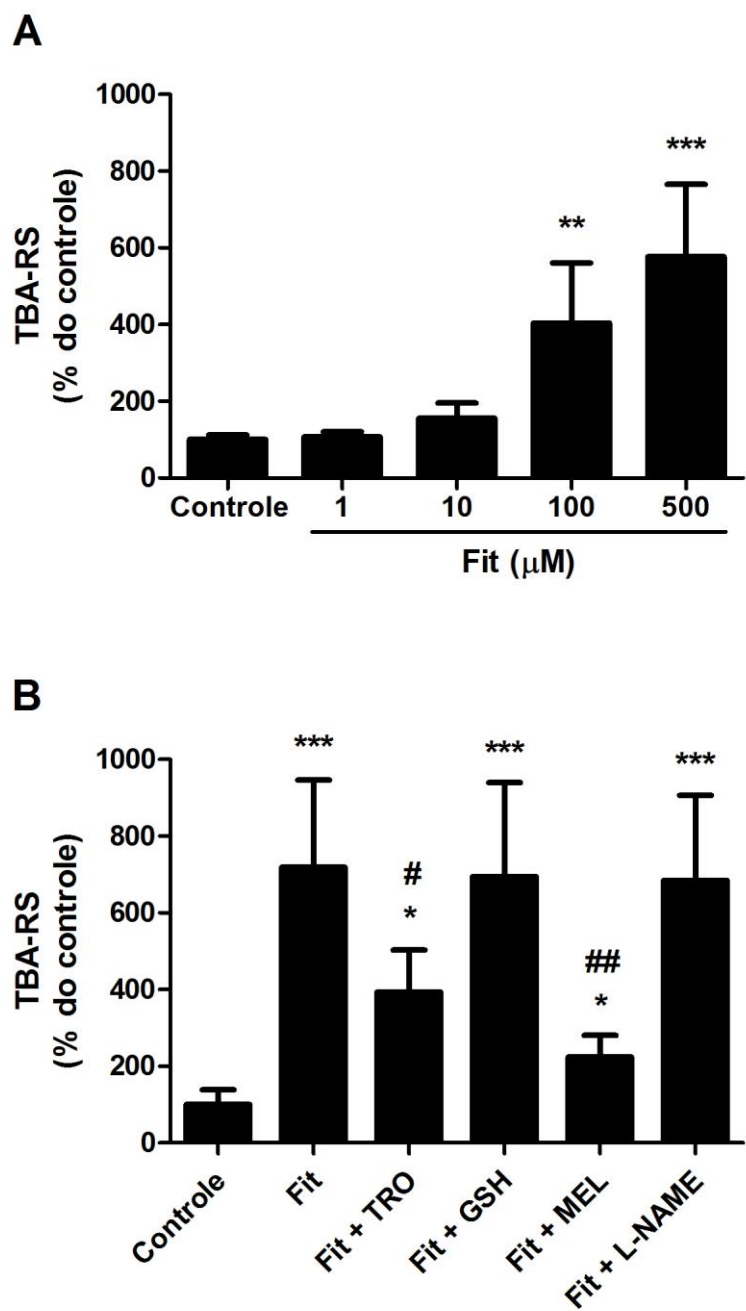


Figura 2

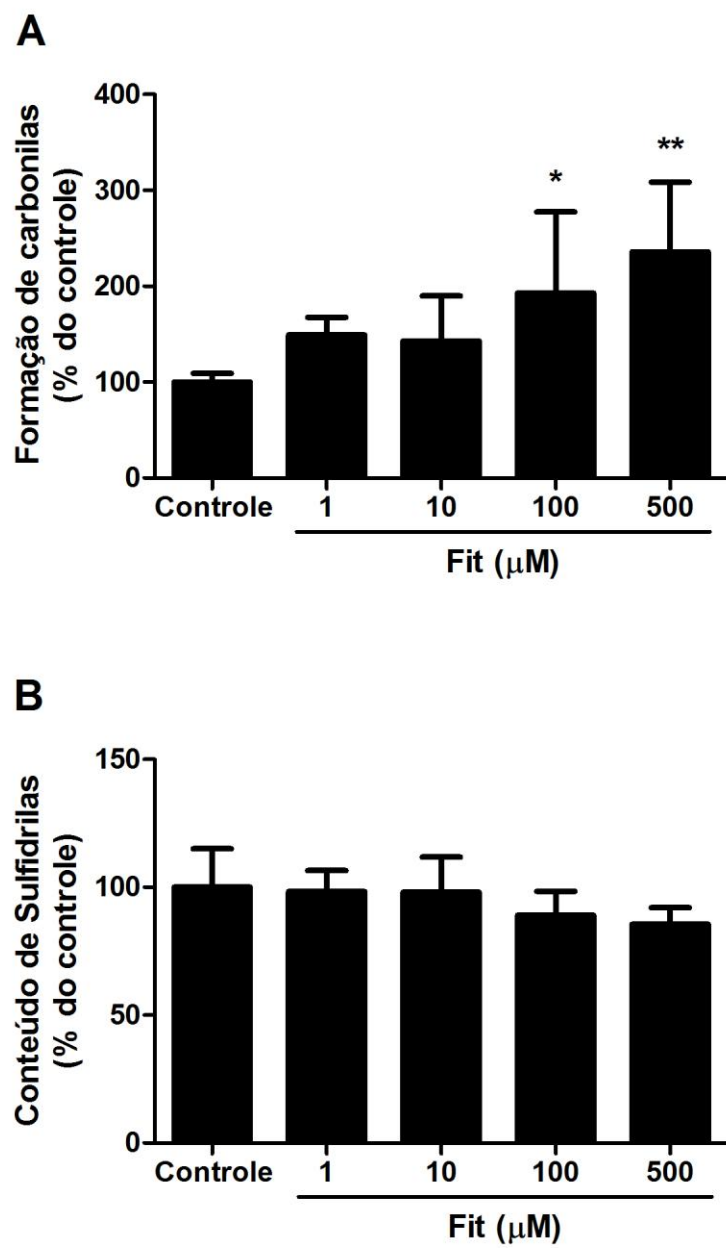


Figura 3

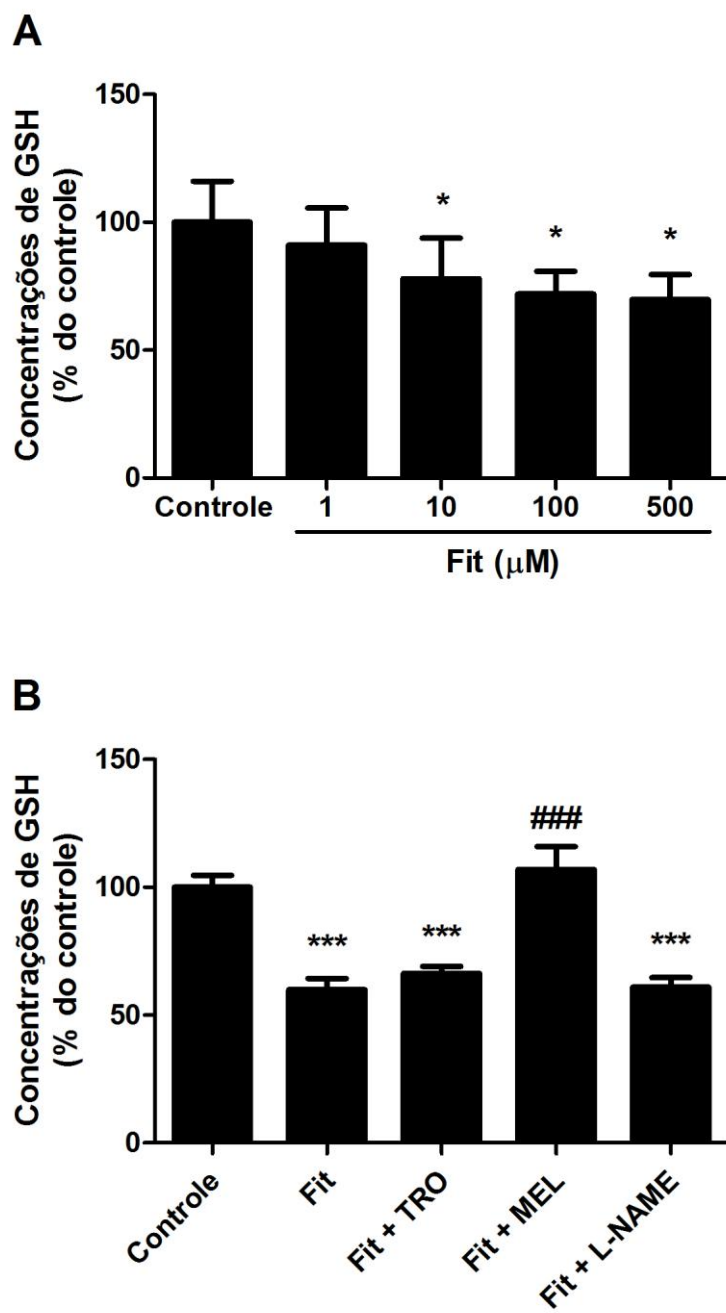


Figura 4

