

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

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS *IN VITRO* DA 3-METILCROTONILGLICINA  
E DO ÁCIDO 3-METILCROTÔNICO SOBRE VÁRIOS PARÂMETROS DE  
ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS**

**ÂNGELA ZANATTA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER**

**Porto Alegre, 2012**

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b> .....	<b>3</b>
RESUMO .....	4
ABSTRACT .....	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
I.1. INTRODUÇÃO .....	8
<i>I.1.1. Erros Inatos do Metabolismo</i> .....	8
<i>I.1.2. Catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada</i> .....	9
<i>I.1.2.1. Catabolismo da leucina</i> .....	10
<i>I.1.2.2. 3-Metilcrotonil - CoA carboxilase</i> .....	12
<i>I.1.3. Deficiência da enzima 3-metilcrotonil - CoA carboxilase</i> .....	12
<i>I.1.3.1. Achados clínicos</i> .....	13
<i>I.1.3.2. Diagnóstico</i> .....	13
<i>I.1.3.3. Tratamento</i> .....	14
<i>I.1.4. Radicais livres</i> .....	15
<i>I.1.4.1. Defesas antioxidantes</i> .....	16
<i>I.1.4.2. Estresse oxidativo</i> .....	17
<i>I.1.4.3. Estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas</i> .....	19
I.2. OBJETIVOS .....	21
<i>I.2.1 Objetivo geral</i> .....	21
<i>I.2.2 Objetivos específicos</i> .....	21
<b>PARTE II</b> .....	<b>23</b>
CAPÍTULO I .....	24
<b>PARTE III</b> .....	<b>55</b>
III.1. DISCUSSÃO .....	56
III.2. CONCLUSÕES .....	61
III.3. PERSPECTIVAS.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
LISTA DE FIGURAS .....	75

## **PARTE I**

### ***Introdução e Objetivos***

## Resumo

A deficiência da 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (3MCCD) é uma doença autossômica recessiva do metabolismo da leucina, caracterizada bioquimicamente por um acúmulo tecidual de 3-metilcrotonilglicina (3MCG), ácido 3-hidroxi-isovalérico e ácido 3-metilcrotônico (3MCA), bem como de uma deficiência secundária de L-carnitina. A apresentação clínica nos pacientes é bastante variável, mas geralmente apresentam sintomas neurológicos, atraso no desenvolvimento, cardiomiopatia, bem como desenlace fatal em crianças. Tendo em vista que a patogênese da doença ainda é desconhecida, no presente trabalho foram investigados os efeitos da 3MCG e do 3MCA sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens. Demonstrou-se que a 3MCG e o 3MCA aumentaram os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) bem como a formação de grupamentos carbonila, indicando que esses metabólitos provocam oxidação lipídica e proteica. Além disso, a elevação de TBA-RS provocada pela 3MCG foi prevenida pelos antioxidantes melatonina e trolox, sugerindo o envolvimento de espécies reativas na indução de lipoperoxidação. Considerando que o inibidor da óxido nítrico sintase N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) não alterou os efeitos da peroxidação lipídica e que a produção de óxido nítrico não foi alterada pela 3MCG, presume-se que espécies reativas de oxigênio estão envolvidas nesse efeito. Por outro lado, os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e a oxidação de grupamentos sulfidrila não foram alterados por 3MCG e 3MCA. Da mesma forma, a atividade de importantes enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase, catalase, superóxido dismutase e glutathiona redutase não foi alterada pela 3MCG. Os dados apresentados demonstram que os metabólitos acumulados na 3MCCD induzem oxidação lipídica e proteica e que esses danos podem estar envolvidos, ao menos em parte, na patogênese da doença e nas anormalidades cerebrais apresentadas pelos pacientes.

## Abstract

Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency (3MCCD) is an autosomal recessive disorder of leucine metabolism biochemically characterized by fecidial accumulation of 3-methylcrotonylglycine (3MCG), 3-hydroxyisovaleric acid and 3-methylcrotonic acid (3MCA), besides that, patients can present a secondary deficiency of L-carnitine. The clinical presentation is highly variable, ranging from severe neurological abnormalities, developmental delay, cardiomyopathy and death in infants, the pathogenesis is poorly known. In the present study, we investigated the *in vitro* effects of 3MCG and 3MCA on important parameters of oxidative stress in cerebral cortex of young rats. Considering that pathophysiology of this disorder is poorly known, in this present work we investigated the role of 3MCG and 3MCA on important parameters of oxidative stress in cortex cerebral of young rats. Our results show that 3MCG and 3MCA increased thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) and carbonyl formation, indicating that these compounds provoke lipid and protein oxidation, respectively. Furthermore, 3MCG-induced elevation of TBA-RS were prevented by melatonin and trolox (soluble  $\alpha$ -tocopherol), indicating that these effects were due to reactive species. Considering that the nitric oxide inhibitor N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) did not alter lipid oxidation and that nitric oxide production was not affected by 3MCG, it is presumed that reactive oxygen species were involved in these effects. In contrast, reduced glutathione (GSH) levels and sulfhydryl oxidation were not changed by 3MCG and 3MCA. Similarly, the activity of important antioxidants enzymes such as glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase and glutathione reductase were not altered by 3MCG. The present data demonstrate that metabolites accumulating in 3MCCD induce lipid and protein oxidative damage that may be involved, at least in part, in the pathophysiology of the brain abnormalities found in this disorder.

## LISTA DE ABREVIATURAS

3MCA- ácido 3-metilcrotônico

3MCCD – deficiência 3-metilcrotonil-CoA carboxilase

3MCG – 3-metilcrotonil glicina

Arg - Arginina

CAT – catalase

EIM – erros inatos do metabolismo

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

GSH – glutathiona reduzida

GPx – glutathiona peroxidase

GR – glutathiona redutase

LDL – lipoproteína de baixa densidade

L-NAME – N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster

Lys - Lisina

MDA – malondialdeído

MEL – melatonina

NO<sup>•</sup> – óxido nítrico

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – ânion superóxido

OH<sup>•</sup> – radical hidroxil

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – oxigênio singlete

ONOO<sup>-</sup> – peroxinitrito

OHIVA – ácido 3-hidroxiisovalérico

Pro - Polina

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

TBA-RS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Thr - treonina

TRO – trolox

## **I.1. INTRODUÇÃO**

### **I. 1. 1. Erros Inatos do Metabolismo**

Em 1908, Sir Archibald E. Garrod usou o termo erros inatos do metabolismo (EIM) para designar doenças como a alcaptonúria, em que os indivíduos afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. Garrod observou uma maior frequência desta doença em indivíduos de uma mesma família e maior incidência de consanguinidade entre os pais dos pacientes. Baseando-se nas leis de Mendel e no fato de que os pais dos indivíduos afetados não apresentavam a doença, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio. Através da observação de que o ácido homogentísico presente em excesso na urina dos pacientes era um metabólito normal da degradação protéica, ele relacionou este acúmulo a um bloqueio na rota de catabolismo da tirosina. Com o surgimento de novos distúrbios relacionados a alterações genéticas e que envolviam o acúmulo de outras substâncias nos líquidos biológicos dos pacientes, postulou-se que estas doenças resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, enzimática ou não, pertencente ao metabolismo (Scriver et al., 2001). Presumiu-se, então, que em consequência deste bloqueio metabólico pode ocorrer o acúmulo de precursores da reação catalisada pela enzima envolvida, com a formação de rotas metabólicas alternativas e a deficiência de produtos essenciais ao organismo (Bickel et al., 1987).



Até o momento foram descritos mais de 500 EIM, a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Scriver et al., 2001). Embora individualmente raras, essas doenças em seu conjunto afetam aproximadamente 1 a cada 500/2.000 recém nascidos vivos (Baric et al., 2001).

### **I.1.2. Catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada**

O passo inicial do catabolismo dos três aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), leucina, valina e isoleucina, é uma transaminação reversível para  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada. A deficiência de uma transaminase pode causar elevação do aminoácido sem elevação do correspondente  $\alpha$ -cetoácido ou outros metabólitos de ácidos orgânicos. O segundo passo no catabolismo é uma descarboxilação oxidativa irreversível dos  $\alpha$ -cetoácidos pela desidrogenase  $\alpha$ -cetoácido de cadeia ramificada, com formação de tioésteres de acil-CoA de cadeia ramificada. (Scriver et al., 2001).

Os tioésteres de acil-CoA de cadeia ramificada derivados dos três AACR são metabolizados através de vários passos para simples intermediários de ácidos orgânicos que entram no metabolismo geral. Uma característica distinta das deficiências de qualquer enzima do catabolismo desses aminoácidos é que somente os metabólitos dos ácidos orgânicos estão elevados, sem elevação dos AACR ou dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada, porque a reação da  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada não é reversível (Scriver et al., 2001). Por outro lado, muitas das

reações catabólicas dos tioésteres de acil-CoA de cadeia ramificada, após as reações iniciais da desidrogenase acil-CoA, são reversíveis, e como uma consequência geral, a deficiência de uma enzima pode causar a elevação de metabólitos de muitos intermediários próximos a rota deficiente. Os tioésteres de acil-CoA elevados podem também ser metabolizados por múltiplas rotas secundárias produzindo uma variedade de metabólitos adicionais (Scriver et al., 2001).

### **I.1. 2. 1. Catabolismo da leucina**

A rota normal do catabolismo da leucina que ocorre na mitocôndria está exemplificada na figura 1. Deficiências inatas já estão descritas em cada uma das seis enzimas de sua rota.

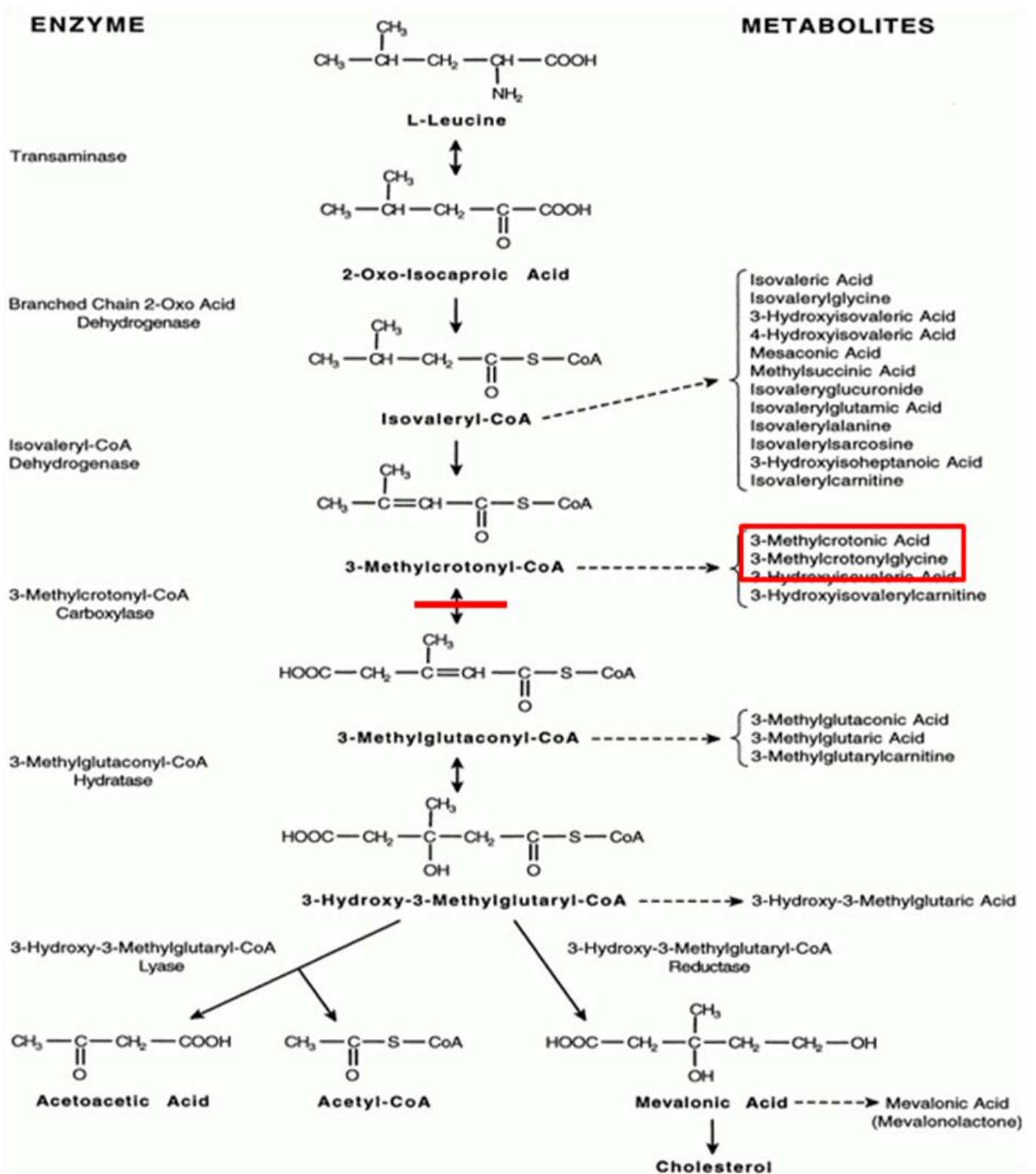


Figura 1. Rota do catabolismo da leucina (Scriver et al., 2001)

### **I. 1. 2. 2. 3-Metilcrotonil-CoA carboxilase**

A enzima 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (MCC, E.C. 6.4.1.4) é uma das enzimas do catabolismo da leucina dependente de biotina. É responsável pela conversão de 3-metilcrotonil-CoA a 3-metilglutaconil-CoA. Essa enzima é composta por duas diferentes subunidades,  $MCC\alpha$  e  $MCC\beta$ , as quais são codificadas pelos genes *MCCA* e *MCCB*, respectivamente. O gene *MCCA* está localizado no cromossomo 3q26-q28 e consiste em 19 éxons, enquanto que o gene *MCCB* está localizado no cromossomo 5q12-q13 e consiste em 17 éxons (Nguyen et al., 2011).

#### **I.1.3. Deficiência da atividade da enzima 3-metilcrotonil-CoA Carboxilase**

A deficiência isolada da 3-metilcrotonil - CoA carboxilase (3MCCD), também conhecida como 3-metilcrotonilglicinúria (OMIM 210200, OMIM 210210), é uma desordem de caráter autossômico recessivo e pode ocorrer devido a mutações tanto na subunidade  $MCC\alpha$  quanto na subunidade  $MCC\beta$  da enzima (Dirik et al., 2008; Nguyen et al., 2011). Pacientes acometidos por essa desordem podem apresentar atividade enzimática inferior a 2% comparados a indivíduos controle (Baumgartner, 2004). A prevalência da 3MCCD é estimada em torno de 1:36.000 nascidos vivos (Arnold et al., 2008).

Devido ao bloqueio enzimático, o ácido 3-metilcrotônico (3MCA) acumula-se, conjugando-se posteriormente com a glicina para então formar a 3-metilcrotonilglicina (3MCG) (Wendel e de Baulny, 2006). Os pacientes

afetados apresentam aumento na excreção urinária de 3MCG e ácido 3-hidroxi-isovalérico (OHIVA), além de apresentar uma deficiência secundária de L-carnitina (Ficicioglu e Payan, 2006; Darin et al., 2007).

### **I.1.3.1. Achados clínicos**

A apresentação clínica é bastante variável, podendo compreender manifestações no período neonatal, evoluindo para óbito, até mesmo pacientes adultos completamente assintomáticos (Visser et al., 2000; Baurmgartner et al., 2001; Wendel e de Baulny, 2006). Nos casos em que a apresentação de sintomas ocorre no período neonatal, é comum os pacientes apresentarem hipotonia, déficit no crescimento, cardiomiopatia e convulsões, que podem evoluir para microcefalia e atraso no desenvolvimento (Wendel e de Baulny, 2006; Ficicioglu e Payan, 2010). Além disso, em exames de imagem, pode-se observar atrofia cortical (de Kremer et al., 2002).

Durante as crises metabólicas, as quais podem seguir-se a uma infecção ou ainda da administração de uma dieta rica em proteínas, a grande maioria dos indivíduos acometidos pela 3MCCD apresenta hipoglicemia, acidose metabólica e hiperamonemia moderada (Visser et al., 2000; Dirik et al., 2008).

### **I.1.3.2. Diagnóstico**

O diagnóstico é baseado em um perfil característico de ácidos orgânicos encontrados na urina, os quais são quantificados através de

cromatografia gasosa / espectrometria de massa. Os pacientes apresentam aumento na excreção de 3MCG (50 a 4000 mmol/mol de creatinina) e OHIVA (500 a 7000 mmol/mol de creatinina) (Visser et al., 2000; Scriver et al., 2001). Além disso, os níveis de L-carnitina total e livre no plasma são extremamente baixos (Wendel e de Baulny, 2006).

Para um diagnóstico definitivo da 3MCCD isolada e exclusão da deficiência de múltiplas carboxilases é necessário confirmar a diminuição específica da atividade enzimática em leucócitos ou fibroblastos (Wendel e de Baulny, 2006). Heterozigotos para a 3MCCD não podem ser diagnosticados com segurança pelo ensaio enzimático em leucócitos e ou em cultura de fibroblastos devido a atividade da enzima apresentar-se geralmente dentro dos valores normais (Scriver et al., 2001).

### **I.1. 3. 3. Tratamento**

O tratamento durante crises agudas consiste em administrar glicose. Já o tratamento a longo prazo é baseado em uma dieta com restrição de leucina e resulta numa melhora geral do paciente, contribuindo para a diminuição da excreção dos ácidos orgânicos, porém, o tratamento não faz com que a excreção dos mesmos desapareça (Scriver et al., 2001; Wendel e de Baulny, 2006). Além disso, glicina (175 mg/Kg/dia) e L-carnitina (100 mg/Kg/dia) são administradas, com o intuito de aumentar a excreção de 3-OHIVA e 3MCG, respectivamente (Wendel e de Baulny, 2006).

#### I.4. Radicais Livres

Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (Southorn e Powis, 1988; Halliwell, 2001; Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007a).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente, resultando na formação de água ( $H_2O$ ). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido a intermediários reativos como o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), e também a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (Boveris, 1998).

O termo genérico “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do  $O_2$ , como por exemplo os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), mas também algumas substâncias reativas não-radicaais derivados do oxigênio, como o  $H_2O_2$  (Halliwell e Gutteridge, 2007a). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ) os principais representantes.

As ERO e ERN ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos do organismo. Fisiologicamente, essas espécies reativas são importantes para a função celular. Assim, um aumento eventual da liberação local de radicais livres pode ser benéfico, como é o caso da liberação de

espécies tóxicas oxidantes pelos neutrófilos que atuam na defesa do hospedeiro contra uma infecção. As espécies ativas ainda participam de processos de sinalização celular e também estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas (Halliwell e Gutteridge, 2007b; Veal e Day, 2011).

Por outro lado, quando formadas em excesso, essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas. Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, os radicais livres podem promover lipoperoxidação (oxidação lipídica), causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), reagir com proteínas, levando à sua inativação e conseqüente alteração de sua função, além de reagir com o DNA e RNA, levando a mutações somáticas e a alterações na transcrição gênica (Halliwell e Whiteman, 2004), dentre outros efeitos.

#### **I.4.1. Defesas Antioxidantes**

Para evitar os efeitos danosos das espécies reativas, existem mecanismos eficientes para sua eliminação, como a produção endógena de enzimas antioxidantes e alguns antioxidantes não-enzimáticos. Embora diferindo na sua composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo (Halliwell e Gutteridge, 2007c) e compreendem:

- agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase;



- proteínas que diminuem 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 dano oxidativo por outros mecanismos, como as chaperonas;
- agentes de baixo peso molecular que seqüestram espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como glutathiona (GSH),  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina;

#### **I.4.2. Estresse Oxidativo**

Organismos saudáveis em condições normais produzem espécies reativas, que em sua maior parte são controladas pelos sistemas de defesa antioxidante. No entanto, em determinadas condições patológicas pode haver um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes, favorecendo a ocorrência do estresse oxidativo.

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 que aceleram a produção de algumas espécies reativas, ou então da combinação de quaisquer desses fatores (Halliwell, 2006).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular:

- Adaptação: as células podem tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em um aumento da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço pró-oxidante / antioxidante.
- Dano celular: o estresse oxidativo pode provocar dano a alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (Halliwell e Gutteridge, 2007b). Nesses casos, a resposta à injúria tecidual pode ser reversível: a célula entra em um estado de homeostase alterado temporário ou prolongado, que não leva à morte celular.
- 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 catalase e a GSH, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e proteínas do grupo heme, agentes esses que podem afetar as células adjacentes, podendo até mesmo induzi-las a um estresse oxidativo. Já na apoptose, o mecanismo intrínseco de morte celular programada é ativado e não há a liberação do conteúdo celular. A apoptose pode estar acelerada em certas doenças, tais como as desordens neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007c).

### **I.1.4.3. Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas**

Numerosas hipóteses têm sido propostas para explicar a neurodegeneração das doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson (Alexi et al., 2000; Mendéz-Álvarez et al., 2001; Behl et al., 2002; Halliwell, 2006), sem, entretanto, obter até o momento uma explicação completamente satisfatória para elucidar o dano cerebral dessas doenças. No entanto, acredita-se que possíveis mecanismos envolvam deficiência no metabolismo energético, estresse oxidativo e neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (excitotoxicidade), ou, possivelmente, um somatório desses fatores (Rose e Henneberry, 1994).

Estudos demonstraram uma diminuição na atividade do complexo I da cadeia respiratória em cérebros *postmortem* de pacientes portadores de doença de Parkinson (Schapira et al., 1990a). Essa inibição do complexo I pode acarretar um aumento na geração de espécies reativas, tais como ânion superóxido, radicais hidroxila e peroxinitrito, as quais poderiam causar um prejuízo ainda maior na cadeia transportadora de elétrons. Dessa forma, é possível que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial formem um “ciclo vicioso” na doença de Parkinson (Schapira et al., 1989, 1990a,b; Janetzky et al., 1994; Gu et al., 1998).

Na doença de Alzheimer, a mais comum dentre as doenças neurodegenerativas, é possível que o estresse oxidativo tenha um papel chave na morte neuronal. Tem sido proposto que o peptídeo  $\beta$ -amilóide, o formador das chamadas placas senis, tenha a capacidade de gerar radicais

livres espontaneamente. Estudos *in vivo* também evidenciaram um dano oxidativo em cérebros humanos *postmortem* com doença de Alzheimer, através da observação de aumento de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdGA), produtos de oxidação de outras bases e de RNA, carbonilas de proteínas, nitrotirosina e marcadores de peroxidação lipídica (Smith et al., 1991; Markesbery e Carney, 1999; Nourooz-Zadeh et al., 1999; Lovell et al., 2000).

Por outro lado, verificou-se um dano oxidativo importante em pacientes portadores da doença de Huntington, particularmente representado pela formação de 3-nitrotirosina nas áreas afetadas (Alexi et al., 2000). Entretanto, o dano oxidativo observado nessa doença aparentemente tem menor importância do que nas doenças de Parkinson e Alzheimer.

Nos últimos anos, foi também verificado que vários metabólitos acumulados em alguns EIM com comprometimento severo do SNC induzem estresse oxidativo no cérebro de animais experimentais (Latini et al., 2007; Ribeiro et al., 2007; Feksa et al., 2008; Kessler et al., 2008; Zugno et al., 2008) e em seres humanos (Sitta et al., 2006; Deon et al., 2007; Barschak et al., 2008a,b; Deon et al., 2008), indicando que os compostos acumulados nestas doenças possam causar dano oxidativo. Além disso, sabe-se que o acúmulo de ácidos orgânicos leva a um aumento de radicais livres e a uma diminuição de antioxidantes, como por exemplo o  $\alpha$ -tocoferol. Porém, é difícil determinar precisamente se a indução no aumento da produção de radicais livres por esses ácidos orgânicos ocorre indiretamente, através de uma inibição no metabolismo energético celular ou se ainda os mesmos são uma fonte direta de radicais livres (Wajner et al., 2004)

## **I.2. OBJETIVOS**

### **I.2.1. Objetivo Geral**

Considerando que os mecanismos de dano cerebral apresentado pelos pacientes portadores da 3MCCD ainda não estão completamente esclarecidos e que não há conhecimento prévio dos efeitos tóxicos da 3MCG e de outros metabólitos acumulados, como por exemplo o 3MCA, o objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos *in vitro* da 3-metilcrotonil glicina (3MCG) e ácido 3-metilcrotônico (3MCA) sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens. O estudo visou a uma melhor compreensão dos mecanismos tóxicos desses metabólitos acumulados na 3MCCD.

### **I.2. 2. Objetivos Específicos**

a) Determinar os efeitos *in vitro* da 3MCG e do 3MCA sobre a peroxidação lipídica, medida através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.

b) Determinar os efeitos *in vitro* da 3MCG e do 3MCA sobre a oxidação de proteínas, determinada através da formação de carbonilas em córtex de ratos de 30 dias de vida.

c) Determinar os efeitos *in vitro* da 3MCG e do 3MCA sobre a produção de óxido nítrico, determinada através da produção de nitratos e nitritos em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.

d) Determinar os efeitos *in vitro* da 3MCG e do 3MCA sobre as defesas antioxidantes não enzimáticas, medidas pelo conteúdo de glutathione reduzida (GSH) e de grupamentos sulfidrílica em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.

e) Determinar os efeitos *in vitro* da 3MCG sobre as atividades das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR) em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.

## **PARTE II**

### ***Artigo Científico***

# Capítulo I

**Neurochemical evidence that 3-methylcrotonylglycine and 3-methylcrotonic acid provoke lipid and protein oxidative damage in cerebral cortex of young rats probably by induction of reactive oxygen species**

Ângela Zanatta, Alana Pimentel Moura, Anelise Miotti Tonin, Lisiane Aurélio Knebel, Mateus Grings, Vannessa Araújo Lobato, Carlos Severo Dutra-Filho, Guilhian Leipnitz, Moacir Wajner

Artigo científico submetido para publicação no periódico  
International Journal of Developmental Neuroscience



**Neurochemical evidence that 3-methylcrotonylglycine and 3-methylcrotonic acid provoke lipid and protein oxidative damage in cerebral cortex of young rats probably by induction of reactive oxygen species**

Ângela Zanatta<sup>1</sup>, Alana Pimentel Moura<sup>1</sup>, Anelise Miotti Tonin<sup>1</sup>, Lisiane Aurélio Knebel<sup>1</sup>, Mateus Grings<sup>1</sup>, Vannessa Araújo Lobato<sup>1</sup>, Carlos Severo Dutra-Filho<sup>1</sup>, Guilhian Leipnitz<sup>1</sup>, Moacir Wajner<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

**Pages: 25**

**Figures: 3**

**Tables: 2**

\* Corresponding Author: Moacir Wajner

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos N° 2600 – Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS – Brasil. Phone: +55 51 3308-5571, fax: +55 51 3308-5535, e-mail: mwajner@ufrgs.br

**List of abbreviations:** 2-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), DTNB; 3-hydroxyisovaleric acid, 3HIVA; 3-methylcrotonylglycine, 3MCG; 3-methylcrotonyl acid, 3MCA; 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency, 3MCCD; Catalase, CAT; Dinitrophenylhydrazine, DNPH; Glutathione peroxidase, GPx; Glutathione reductase, GR; Melatonin, MEL; Oxidized glutathione, GSSG ; Reduced glutathione, GSH; Superoxide dismutase, SOD; Thiobarbituric acid-reactive substances, TBA-RS; Trolox, TRO

## Abstract

Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency (3MCCD) is an autosomal recessive disorder of leucine metabolism biochemically characterized by accumulation of 3-methylcrotonylglycine (3MCG), 3-hydroxyisovaleric acid and 3-methylcrotonic acid (3MCA). A considerable number of affected individuals present neurological symptoms and abnormalities whose pathogenesis is poorly known. In the present study, we investigated the *in vitro* effects of 3MCG and 3MCA on important parameters of oxidative stress in cerebral cortex of young rats. Our results show that 3MCG and 3MCA increased thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) and carbonyl formation, indicating that these compounds provoke lipid and protein oxidation, respectively. Furthermore, 3MCG-induced elevation of TBA-RS was prevented by melatonin and trolox (soluble  $\alpha$ -tocopherol), indicating that these effects were due to reactive species. Considering that the nitric oxide inhibitor N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester did not alter protein and lipid oxidation and that nitric oxide production was not affected by 3MCG, it is presumed that reactive oxygen species were involved in these effects. In contrast, GSH levels and sulfhydryl oxidation were not changed by 3MCG and 3MCA. Similarly, the activity of the antioxidants enzymes glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase and glutathione reductase were not altered by 3MCG. The present data demonstrate that metabolites accumulating in 3MCCD induce lipid and protein oxidative damage that may be involved, at least in part, in the pathophysiology of the brain abnormalities found in this disorder.

**Keywords** 3-Methylcrotonylglycine; 3-Methylcrotonic acid; Oxidative stress; Cerebral cortex.

## 1. Introduction

Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency (3MCCD) is an autosomal recessive disorder of the leucine catabolic pathway. It appears to be one of the most common inborn errors of metabolism detectable in neonatal screening programs (1:36,000 births) (Baumgartner et al., 2001; Frazier et al., 2006; Arnold et al., 2008; Dirik et al., 2008). Patients with this disorder present elevated urinary excretion of 3-methylcrotonylglycine (3MCG) and also of 3-hydroxyisovaleric acid (3-HIVA) but to lesser amounts. 3MCG is a conjugate of glycine with 3-methylcrotonic acid (3MCA), which also accumulates in this disorder (Wendel and de Baulny, 2006). Affected individuals may also have secondary L-carnitine deficiency due to the consume of this compound that binds to the accumulating metabolites to increase renal clearance (de Kremer et al., 2002; Darin et al., 2007).

The clinical presentation is highly variable, ranging from severe neurological abnormalities (seizures and psychomotor/mental retardation), developmental delay, cardiomyopathy and death in infants to asymptomatic adults (Visser et al., 2000; Darin et al., 2007). Many patients also present Reye-like syndrome (severe metabolic acidosis, hypoglycaemia and hyperammonaemia) after infections or introduction of an enriched protein diet (Visser et al., 2000). Brain imaging usually shows cerebral edema, ventricular dilatation, leukodystrophy and cerebral atrophy particularly in subcortical areas of frontal, temporal and parietal lobes (Murayama et al., 1997; de

Kremer et al., 2002; Baykal et al., 2005; Dirik et al., 2008). The therapy consists basically of protein restriction, allied to glycine and L-carnitine supplementation (Rutledge et al., 1995; de Kremer et al., 2002).

Although brain dysfunction and abnormalities occur in 3MCCD, the pathogenesis of the cerebral damage in patients affected by this disorder is virtually unknown. In this context, to the best of our knowledge there is no previous study reporting the effects of 3MCG and 3MCA on cellular redox status. Therefore, in the present study we investigated the role of 3MCG and 3MCA on important biochemical parameters of oxidative stress, namely thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) (lipid peroxidation), carbonyl formation (protein oxidative damage), nitric oxide production, reduced glutathione (GSH) levels, sulfhydryl content and the antioxidant enzyme activities glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR) (tissue antioxidant defenses).

## **2. Experimental procedures**

### *2.1 Animal and reagents*

We used in the assays 30-day-old Wistar rats obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS. The animals had free access to water and to a standard commercial chow and were maintained on a 12:12 h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) colony room. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication no. 80-23, revised 1996) were followed in all experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do

Sul, Porto Alegre, Brazil. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, except 3-methylcrotonylglycine (3MCG, 99% purity), which was synthesized by Dr. Ernesto Brunet, from Universidad Autonoma Madrid. 3MCG and 3MCA were dissolved on the day of the experiments in the buffer used for each assay and the pH adjusted to 7.4.

## *2.2 Cerebral cortex supernatant preparation and incubation*

Rats were sacrificed by decapitation without anaesthesia, and the brain was rapidly excised on a Petri dish placed on ice. The olfactory bulbs, pons, medulla, cerebellum, hippocampus and striatum were discarded, and the cerebral cortex was dissected, weighed and homogenized in 10 volumes (w/v) of ice-cold 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, a suspension of mixed and preserved organelles, including mitochondria, was separated and pre-incubated at 37° C for 1 hour with 3MCG or 3MCA at concentrations of 0.1, 1.0 or 5.0 mM. Controls did not contain these metabolites in the incubation medium. Immediately after pre-incubation, aliquots were taken to measure TBA-RS, carbonyl formation, sulfhydryl content, GSH levels, nitric oxide production and the activities of the antioxidant enzymes GPx, CAT, SOD, GR. In some experiments, antioxidants were co-incubated with supernatants at the following final concentrations: 5 µM Trolox (TRO, soluble  $\alpha$ -tocoferol), 500 µM melatonin (MEL), 500 µM N<sup>ω</sup>-

nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and the combination of SOD plus CAT (100 mU). The chosen concentrations of the antioxidants were those capable to scavenge free radicals (Halliwell and Gutteridge, 2007).

We always performed the experiments using various blanks. Some blanks did not contain the compounds (3MCG and 3MCA) to be tested and served as controls. Furthermore, some assays were devoid of brain supernatant preparations in the incubation medium and served to detect interferences (artifacts) of the tested metabolites on the techniques utilized to measure the oxidative stress parameters (results not shown). All methods used in the present investigation have been previously described and were those in accordance with the references cited below.

### *2.3 Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)*

TBA-RS was determined according to the method of Esterbauer and Cheeseman (1990). Briefly, 300  $\mu$ L of cold 10% trichloroacetic acid were added to 150  $\mu$ L of pre-incubated cerebral cortex supernatants and centrifuged at 3000 *g* for 10 min. Three hundred  $\mu$ L of the pre-incubated supernatants (containing approximately 0.3 mg of protein) were transferred to a pyrex tube and incubated with 300  $\mu$ L of 0.67 % TBA in 7.1 % sodium sulphate on a boiling water bath for 25 min. The tubes containing the mixture were allowed to cool on running tap water for 5 min. The resulting pink-stained TBA-RS was determined in a spectrophotometer at 532 nm. A calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane, and each curve point was subjected to the same treatment as supernatants. TBA-

RS values were calculated as nmol / mg protein and expressed as percentage of control.

#### *2.4 Protein carbonyl content*

Protein carbonyl formation, a marker of protein oxidative damage, was measured spectrophotometrically according to Reznick and Packer (1994). Two hundred microliters of the aliquots from the pre-treated supernatants (containing approximately 0.3 mg of protein) were treated with 400  $\mu$ L of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) dissolved in 2.5 N HCl or with 2.5 N HCl (blank) and left in the dark for 1 hour. Samples were then precipitated with 600  $\mu$ L 20 % trichloroacetic acid and centrifuged for 5 min at 9000 g. The pellet was then washed with 1 mL ethanol: ethyl acetate (1:1, V/V) and dissolved in 550  $\mu$ L 6 M guanidine prepared in 2.5 N HCl at 37 ° C for 5 min. The difference between the DNPH-treated and HCl-treated samples (blank) was used to calculate the carbonyl content determined at 365 nm. The results were calculated as nmol of carbonyl groups / mg of protein, using the extinction coefficient of  $22000 \times 10^6$  nmol / mL for aliphatic hydrazones and expressed as percentage of control.

#### *2.5 Nitric oxide production*

Nitric oxide production was determined by measuring its derivatives nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) according to Miranda and colleagues (2001). 200  $\mu$ L of vanadium chloride was added to the tube containing 200  $\mu$ L of 3MCG pre-treated cerebral cortex supernatants (containing approximately 0.3 mg of



protein) for complete reduction of nitrate to nitrite. Then, 200  $\mu$ L of Griess reagent (a mixture of N-1-naphtylethylenediamine dihydrochloride and sulfanilamide) were added and the tube was incubated for 30 min at 37°C in a water bath in a dark room. The resulting pink-stained pigment was determined in a spectrophotometer at 540 nm. A calibration curve was performed using sodium nitrate (2.5, 5, 10, 15, 25, 50 and 100  $\mu$ M), and each curve point was subjected to the same treatment as supernatants. Nitric oxide production values were calculated as nmol / mg protein and expressed as percentage of control.

#### *2.6 Reduced glutathione (GSH) content*

GSH concentrations were measured according to Browne and Armstrong (1998). Protein was precipitated with a solution of 1.8% metaphosphoric acid (1:1, v/v) and centrifuged for 10 min at 7000 g. The supernatants (containing approximately 0.3 mg of protein) were diluted in 20 volumes of (1:20, v/v) 100 mM sodium phosphate buffer pH 8.0, containing 5 mM EDTA. One hundred  $\mu$ L of this preparation were incubated with an equal volume of o-phthaldialdehyde (1 mg / mL methanol) at room temperature during 15 minutes. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 nm and 420 nm, respectively. Calibration curve was prepared with standard GSH (0.001 - 1 mM) and the levels were calculated as nmol / mg protein and expressed as percentage of control.

#### *2.7 Sulfhydryl content*

This assay is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm (Aksenov and Markesbery, 2001). Briefly, 160  $\mu$ L of pre-treated supernatant (containing approximately 0.3 mg of protein) were incubated at 37° C for 1 hour with 3-MCG. Then 30  $\mu$ L of 10 mM DTNB, prepared in 0.2 M potassium phosphate solution, pH 8.0, was added. This was followed by 30 min incubation at room temperature in a dark room. Absorption was measured at 412 nm. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were calculated as nmol / mg protein and expressed as percentage of control.

### *2.8 Glutathione peroxidase (GPx) activity*

GPx activity was measured according to Wendel (1981) using tert-butylhydroperoxide as substrate. The enzyme activity was determined by monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium containing 100 mM potassium phosphate buffer / 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 7.7, 2 mM GSH, 0.1 U / mL glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl-hydroperoxide, 0.1 mM NADPH and approximately 3  $\mu$ g of protein. One GPx unit (U) is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute. The specific activity was calculated as U / mg protein and expressed as percentage of control.

### *2.9 Catalase (CAT) activity*

CAT activity was assayed according to Aebi (1984) by measuring the absorbance decrease at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 % Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and approximately 1 µg of protein. One unit (U) of the enzyme is defined as 1 µmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed per minute. The specific activity was calculated as U / mg protein and expressed as percentage of control.

#### *2.10 Superoxide dismutase (SOD) activity*

SOD activity was assayed according to Marklund (1985) and is based on the capacity of pyrogallol to autooxidize, a process highly dependent on O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, which is a substrate for SOD. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be then indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm. The reaction medium contained 50 mM Tris buffer / 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8.2, 80 U / mL catalase, 0.38 mM pyrogallol and approximately 1 µg of protein. A calibration curve was performed with purified SOD as standard to calculate the activity of SOD present in the samples. The results were calculated as U / mg protein and expressed as percentage of control.

#### *2.11 Glutathione reductase (GR) activity*

GR activity was measured according to Calberg and Manervik (1985) using oxidized glutathione (GSSG) and NADPH as substrates. The enzyme activity was determined by monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium with 200 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, containing 6.3 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM GSSG, 0.1 mM NADPH and approximately 3 µg of protein. One GR unit (U) is defined as 1 µmol of GSSG

reduced per minute. The specific activity was calculated as U / mg protein and expressed as percentage of control.

### *2.12 Protein determination*

Protein content was determined in cerebral cortex supernatants by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as a standard.

### *2.13 Statistical analysis*

Unless otherwise stated, results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Assays were performed in duplicate or triplicate and the mean or median was used for statistical analysis. Data was analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post-hoc Duncan multiple range test when F was significant. Only significant F values are shown in the text. Differences between groups were rated significant at  $P < 0.05$ . All analyses were carried out in an IBM-compatible PC computer using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software.

## **3. Results**

### *3.1 3MCG and 3MCA induce lipid peroxidation*

First, we investigated the *in vitro* effects of 3MCG and 3MCA on TBA-RS levels in cerebral cortex supernatants of 30-day-old rats. Figure 1 shows that 3MCG [ $F_{(3,16)} = 9.820$ ;  $P < 0.001$ ] and 3MCA [ $F_{(3,18)} = 9.524$ ;  $P < 0.001$ ] significantly increased TBA-RS levels in brain supernatants. We then evaluated the role of antioxidants on 3MCG-induced lipid peroxidation.

Cortical supernatants were co-incubated with the antioxidants MEL (500  $\mu$ M), TRO (5  $\mu$ M), L-NAME (500  $\mu$ M) or SOD/CAT (100 mU each) and 5.0 mM 3MCG. Our results show that MEL and TRO were able to fully prevent 3MCG-induced TBA-RS levels increase (MEL: [ $F_{(5,30)} = 6.930$ ;  $P < 0.01$ ]; TRO: [ $F_{(4,20)} = 14.658$ ;  $P < 0.001$ ]), whereas SOD plus CAT and L-NAME did not alter this effect (Figure 2).

### *3.2 3MCG and 3MCA provoke protein oxidative damage*

The next set of experiments was carried out to evaluate the *in vitro* effects of 3MCG and 3MCA on carbonyl formation. We observed that both metabolites significantly increased this parameter (3MCG: [ $F_{(3,20)} = 4.412$ ;  $P < 0.05$ ]; 3MCA: [ $F_{(3,19)} = 3.359$ ;  $P < 0.05$ ]) (Figure 3), implying that they provoke protein oxidative damage.

### *3.3 3MCG and 3MCA do not induce nitric oxide production or alter the antioxidant defenses*

We also assessed the effect of 3MCG and 3MCA on nitrate and nitrite production. Table 1 shows that these metabolites did not induce nitrogen reactive species generation in cortical supernatants, suggesting that the pro-oxidant effects of 3MCG and 3MCA were mainly due to reactive oxygen species. The non enzymatic antioxidant defenses were also examined by assessing GSH levels and sulfhydryl oxidation. Table 1 displays that neither 3MCG nor 3MCA significantly altered these parameters.

### 3.4 3MCG does not change the enzymatic antioxidant defenses

Finally, we measured the activity of the antioxidants enzymes GPx, CAT, SOD and GR in the presence of 3MCG. Table 2 shows that the activities of these enzymes were not altered by 3MCG.

## 4. Discussion

In the present investigation we first observed that 3MCG and 3MCA, significantly increased TBA-RS levels, reflecting an induction of malondialdehyde generation, an end product of membrane fatty acid peroxidation (Halliwell and Gutteridge, 2007). Therefore, it may be presumed that 3MCG and 3MCA caused lipid peroxidation *in vitro*. We also observed that 3MCG-induced lipid oxidative damage was totally prevented by the free radical scavengers MEL and TRO, but not by SOD plus CAT and L-NAME suggesting that 3MCG provokes a prooxidant effect on membrane lipids from cerebral cortex mediated by reactive species generation, possibly hydroxyl and peroxy radicals, which are scavenged by these antioxidants. The findings showing that nitric oxide production, as determined by nitrates and nitrites quantification, was not altered by 3MCG and 3MCA reinforce the hypothesis that reactive oxygen species were probably involved in the induction of lipid peroxidation.

Next, we observed that markedly carbonyl content was increased by 3MCG and 3MCA, implying that protein oxidation was elicited by these compounds. Carbonyl groups (aldehydes and ketones) are mainly produced by oxidation of amino acid side chains (especially Pro, Arg, Lys, and Thr) of proteins or from the reaction of reducing sugars or their oxidation products

with lysine protein residues (Dalle-Donne et al. 2003). Generally, detection of elevated levels of protein carbonyl is a sign not only of protein oxidative damage but also of protein dysfunction (Dalle-Donne et al., 2009). Although protein carbonyls are usually caused by ROS-mediated protein damage, we cannot exclude the possibility that aldehydes resulting from lipid peroxidation also induced carbonyl generation (Dalle-Donne et al. 2003).

With regard to the antioxidant defense system, 3MCG and 3MCA did not alter the concentrations of GSH, the main naturally occurring antioxidant in brain, as well as the sulfhydryl content. These data therefore reveal that the major accumulating metabolites in 3MCCD induce lipid and protein oxidative damage, but are not able to reduce the nonenzymatic antioxidant defenses probably because the rate of reactive oxygen species formation by 3MCG and 3MCA was lower than the brain capacity to regenerate GSH from its oxidized form. Similar findings have been previously reported by others (Latini et al., 2007; Pederzoli et al., 2010; Seminotti et al., 2011). Furthermore, 3MCG did not affect the activities of the antioxidant enzymes GPx, SOD, CAT and GR. Taken together, it is concluded that the presence of 3MCG and 3MCA in the incubation medium did not affect the antioxidant defenses in the brain.

We used supernatants from cerebral cortex in the experiments because this brain structure is mainly damaged in the affected patients and supernatants are considered as a appropriate model system to evaluate important pro-oxidant and antioxidant parameters of oxidative stress. In fact, tissue supernatants contain the whole cell machinery including preserved organelles such as mitochondria (the major source of free radical generation) and enzymes that are necessary for free radical production and scavenge

(Stocks et al., 1974; Cadenas et al., 1981; Gonzalez-Flecha et al., 1991; Lores Arnaiz and Llesuy et al., 1993; Llesuy et al., 1994; Evelson et al., 2001; Halliwell and Gutteridge, 2007; Dresch et al., 2009).

Recent results from our group demonstrated that 3MCG inhibits complexes II-III of the electron transport chain and the activities of mitochondrial creatine kinase and synaptic membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. It was also found that antioxidants were able to attenuate or fully prevent the inhibitory effect of 3MCG on creatine kinase and synaptic membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activities, implying the participation of reactive species on 3MCG-induced effects (Moura et al., 2011). Considering that a blockage of the respiratory chain may give rise to increased production of reactive oxygen species, which in turn may inhibit some complexes of the electron transport chain in a vicious circle, as well as the enzymes creatine kinase and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Kowaltowski et al., 2009; Keane et al., 2011), we cannot exclude the possibility that a disturbance in mitochondrial homeostasis reflected by oxidative stress, as shown in the present investigation and inhibitory effects on bioenergetics may underlie brain toxicity (Adam Vizi, 2005; Moura et al., 2011).

At present it is difficult to establish the pathophysiological significance of our data since there is no information in the literature on the brain or cerebral spinal fluids concentrations of 3MCG in 3MCCD. However, our present data indicate that oxidative stress is induced by 3MCG and 3MCA at high doses and may possibly represent a pathomechanism causing brain damage in this disorder.



We should also stress that clinical heterogeneity occurs in 3MCCD, with some patients presenting severe neurological symptoms, whereas others have mild clinical phenotype or are even asymptomatic (Visser et al., 2000; Darin et al., 2007) Although the reasons for this variability are still unknown, it is possible that environmental (e.g.: fever, metabolic stress) and genetic (modifier genes) factors may contribute to a certain extent to explain the brain damage in a considerable number of 3MCCD patients, particularly during episodes of metabolic decompensation characterized by huge increases of 3MCG and 3MCA probably making the brain more susceptible to the deleterious effects of 3MCG (Moura et al., 2011). Thus, more research is necessary to explore other pathophysiological effects of 3MCG and 3MCA.

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first report showing that 3MCG and 3MCA that accumulate in 3MCCD provoke lipid and protein oxidative damage in the cerebral cortex. However, additional studies performed in intact neural cell cultures and in peripheral tissues of patients are required to confirm the role of oxidative stress in the pathogenesis of this disease. In case the *in vitro* effects detected in the present study are confirmed *in vivo*, it is tempting to speculate that reactive species may contribute, at least in part, to the neurological damage found in this disorder. Finally, it may be proposed that the administration of antioxidants should be considered as an adjuvant therapy for these patients, especially during metabolic crises.

## **Acknowledgments**

This work was supported by grants from CNPq, PRONEX II, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS and FINEP research grant Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00, and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCT-EN).

## References

- Adam-Vizi, V., 2005. Production of Reactive Oxygen Species in Brain Mitochondria: contribution by Electron Transport Chains and Non-Electron Transport Chain Sources. *Antioxid. Redox. Signal.* 7, 1140-1149.
- Aebi, H., 1984. Catalase, in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121–126.
- Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R., 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.
- Arnold, G.L., Koeberl, D.D., Matern, D., Barshop, B., Braverman, N., Burton, B., Cederbaum, S., Fiegenbaum, A., Garganta, C., Gibson, J., Goodman, S.I., Harding, C., Kahler, S., Kronn, D., Longo, N., 2008. A Delphi-based consensus clinical practice protocol for the diagnosis and management of 3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 93, 363-370.
- Baumgartner, M.R., Almashanu, S., Suormala, T., Obie, C., Cole, R.N., Packman, S., Baumgartner, E.R., Valle, D., 2001. The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J. Clin. Invest.* 107, 495-504.

Baykal, T., Gokcay, G.H., Ince, Z., Dantas, M.F., Fowler, B., Baumgartner, M.R., Demir, F., Can, G., Demirkol, M., 2005. Consanguineous 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: early-onset necrotizing encephalopathy with lethal outcome. *J. Inherit. Metab. Dis.* 28 (2), 229-233.

Browne, R.W., Armstrong, D., 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Meth. Mol. Biol.* 108, 347–352.

Cadenas, E., Varsavsky, A.I., Boveris, A., Chance, B., 1981. Oxygen- or organic hydroperoxide-induced chemiluminescence of brain and liver homogenates. *Biochem. J.* 198, 645–654.

Calberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods. Enzymol.* 113, 484–490.

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

Dalle-Donne, I, Carini, M, Orioli, M, Vistoli, G, Regazzoni, L, Colombo, G, Rossi, R, Milzani, A, Aldini, G., 2009. Protein carbonylation: 2,4 dinitrophenylhydrazine reacts with both aldehydes/ketones and sulfenic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1411–1419.

Darin, N., Andersen, O., Lars-Martin, W., Holmgren, D., Holme, E., 2007. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency and severe multiple sclerosis. *Pediatr. Neurol.* 36, 132-134.

de Kremer, R.D., Latini, A., Suormala, T., Baumgartner, E.R., Larovere, L., Civallero, G., Guelbert, N., Paschini-Capra, A., Depetris-Boldini, C., Mayor, C.Q., 2002. Leukodystrophy and CSF purine abnormalities associated with

isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Metab. Brain. Dis.* 17 (1), 13-18.

Dirik, E., Yis, U., Pasaoglu, G., Chambaz, C., Baumgartner, M.R., 2008. Recurrent attacks of status epilepticus as predominant symptom in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Brain. Dev.* 30, 218-220.

Dresch, M.T., Rossato, S.B., Kappel, V.D., Biegelmeyer, R., Hoff, M.L., Mayorga, P., Zuanazzi, J.A., Henriques, A.T., Moreira, J.C., 2009. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Anal. Biochem.* 385, 107–114.

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

Evelson, P., Travacio, M., Repetto, M., Escobar, J., Llesuy, S., Lissi, E.A., 2001. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosol. *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 261–266.

Frazier, D.M., Millington, D.S., McCandless, S.E., Koeberl, D.D., Weavil, S.D., Chaing, S.H., Muenzer, J., 2006. The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997–2005. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29, 76–85.

Gonzalez Flecha, B., Llesuy, S., Boveris, A., 1991. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free. Radic. Biol. Med.* 10, 93–100.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell, B.,

Gutteridge, J.M.C. (Eds.) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, pp. 187–267.

Keane, P.C., Kurzawa, M., Blain, P.G., Morris, C.M., 2011. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsons. Dis.* 2011:716871.

Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free. Radical. Biol. Med.* 47, 333-343.

Latini, A., Ferreira, G.C., Scussiato, K., Schuck, P.F., Solano, A.F., Dutra-Filho, C.S., Vargas, C.R., Wajner, M., 2007. Induction of oxidative stress by chronic and acute glutaric acid administration to rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27(4), 423-438.

Llesuy, S., Evelson, P., Gonzalez-Flecha, B., Peralta, J., Carreras, M.C., Poderoso, J.J., Boveris, A., 1994. Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome. *Free. Radic. Biol. Med.* 16, 445–451.

Lores Arnaiz, S., Llesuy, S., 1993. Oxidative stress in mouse heart by antitumoral drugs: a comparative study of doxorubicin and mitoxantrone. *Toxicology* 77, 31–38.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

Marklund, S.L., 1985. Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald, R.A. (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, pp 243–247.

Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62–71.

Moura, A.P., Ribeiro, C.A., Zanatta, A., Busanello, E.N., Tonin, A.M., Wajner, M., 2011. 3-Methylcrotonylglycine Disrupts Mitochondrial Energy Homeostasis and Inhibits Synaptic Na(+),K (+)-ATPase Activity in Brain of Young Rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* (Epub ahead of print)

Murayama, K., Kimura, M., Yamaguchi, S., Shinka, T., Kodama, K., 1997. Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in a 15-year-old girl. *Brain. Dev.* 19 (4), 303-305.

Pederzoli, C.D., Mescka, C.P., Zandoná, B.R., Coelho, D.M., Sgaravatti, A.M., Sgarbi, M.B., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Vargas, C.R., Dutra-Filho, C.S., 2010. Acute administration of 5-oxoproline induces oxidative damage to lipids and proteins and impairs antioxidant defenses in cerebral cortex and cerebellum of young rats. *Metab. Brain. Dis.* 25(2), 145-54.

Reznick, A.Z., Packer, L., 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth. Enzymol.* 233, 357–363.

Rutledge, S.L., Berry, G.T., Stanley, C.A., van Hove, J.L.K., Millington, D., 1995. Glycine and L-carnitine therapy in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 18, 299-305.

Seminotti, B., Knebel, L.A., Fernandes, C.G., Amaral, A.U., da Rosa, M.S., Eichler, P., Leipnitz, G., Wajner, M., 2011. Glycine intrastriatal administration

induces lipid and protein oxidative damage and alters the enzymatic antioxidant defenses in rat brain. *Life Sci.* 89(7-8), 276-281.

Stocks, J., Gutteridge, J.M., Sharp, R.J., Dormandy, T.L., 1974. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin. Sci. Mol. Med.* 47, 215–222.

Visser, G., Suormala, T., Smit, G.P.A., Rejingoud, D.J., Bink-Boelkens, M.T.E., Niezen-Koning, K.E., Baumgartner, E.R., 2000. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in an infant with cardiomyopathy, in her brother with developmental delay and in their asymptomatic father. *Eur. J. Pediatr.* 159, 901-904.

Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* 77:325–332

Wendel, U., de Baulny, H.O., 2006. Branched-Chain Organic Acidurias/Acidemias. In: Fernandes, J., Saudubray, J.M., van den Berghe, G., Walter, J.H. (eds) *Inborn Metabolic Diseases*, 4<sup>th</sup> edn Springer, Hidelberg, pp 247-260.

## Legend to figures

**Figure 1.** *In vitro* effects of 3-methylcrotonylglycine (3MCG) (A) and 3-methylcrotonic acid (3MCA) (B) on thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) in rat cerebral cortex. Values are means  $\pm$  standard deviation for six independent experiments performed in triplicate and expressed as percentage of controls (Controls [nmol / mg protein] A:  $2.43 \pm 0.35$ ; B:  $5.52 \pm 0.57$ ) \*\*\* $P < 0.001$ , compared to controls (Duncan multiple range test).

**Figure 2.** *In vitro* effect of antioxidants on 3-MCG (3-methylcrotonylglycine)-induced increase of lipid peroxidation (TBA-RS increase) in rat cerebral cortex. Cortical supernatants were co-incubated with 500  $\mu$ M melatonin (MEL) (A), 5  $\mu$ M Trolox (TRO, soluble  $\alpha$ -tocopherol) (B), 500  $\mu$ M N <sup>$\omega$</sup> -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (C) or 100 mU superoxide dismutase plus 100 mU catalase (SOD plus CAT) (D) and 5 mM 3-MCG during 1 h. Values are means  $\pm$  standard deviation for six independent (animals) experiments performed in triplicate and are expressed as percentage of control (Control [nmol / mg protein] A:  $1.83 \pm 0.39$ ; B:  $1.54 \pm 0.28$ ; C:  $1.83 \pm 0.39$ ; D:  $1.83 \pm 0.39$ ). \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared to control; ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ , compared to 5 mM 3-MCG (Duncan multiple range test).

**Figure 3.** *In vitro* effect of 3-methylcrotonylglycine (3MCG) (A) and 3-methylcrotonic acid (3MCA) (B) on carbonyl formation in rat cerebral cortex. Values are means  $\pm$  standard deviation for five to six independent (animals) experiments performed in triplicate and are expressed as percentage of



controls (Controls [nmol / mg protein] A:  $0.91 \pm 0.25$ ; B:  $1.24 \pm 0.37$ ). \* $P < 0.05$ , compared to controls (Duncan multiple range test).

Figure 1

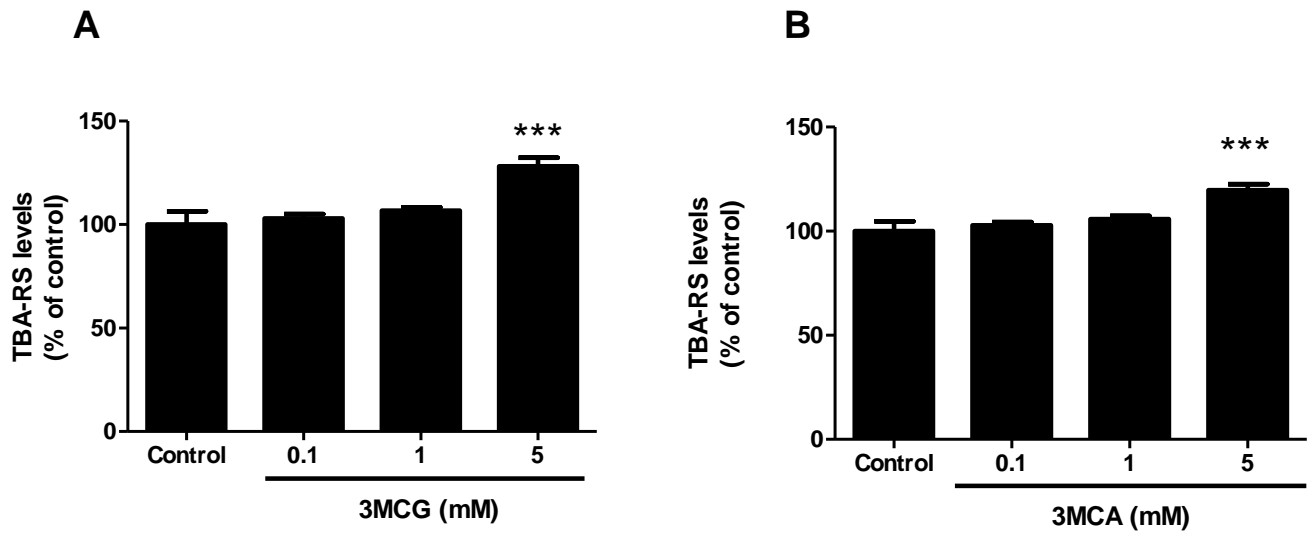


Figure 2

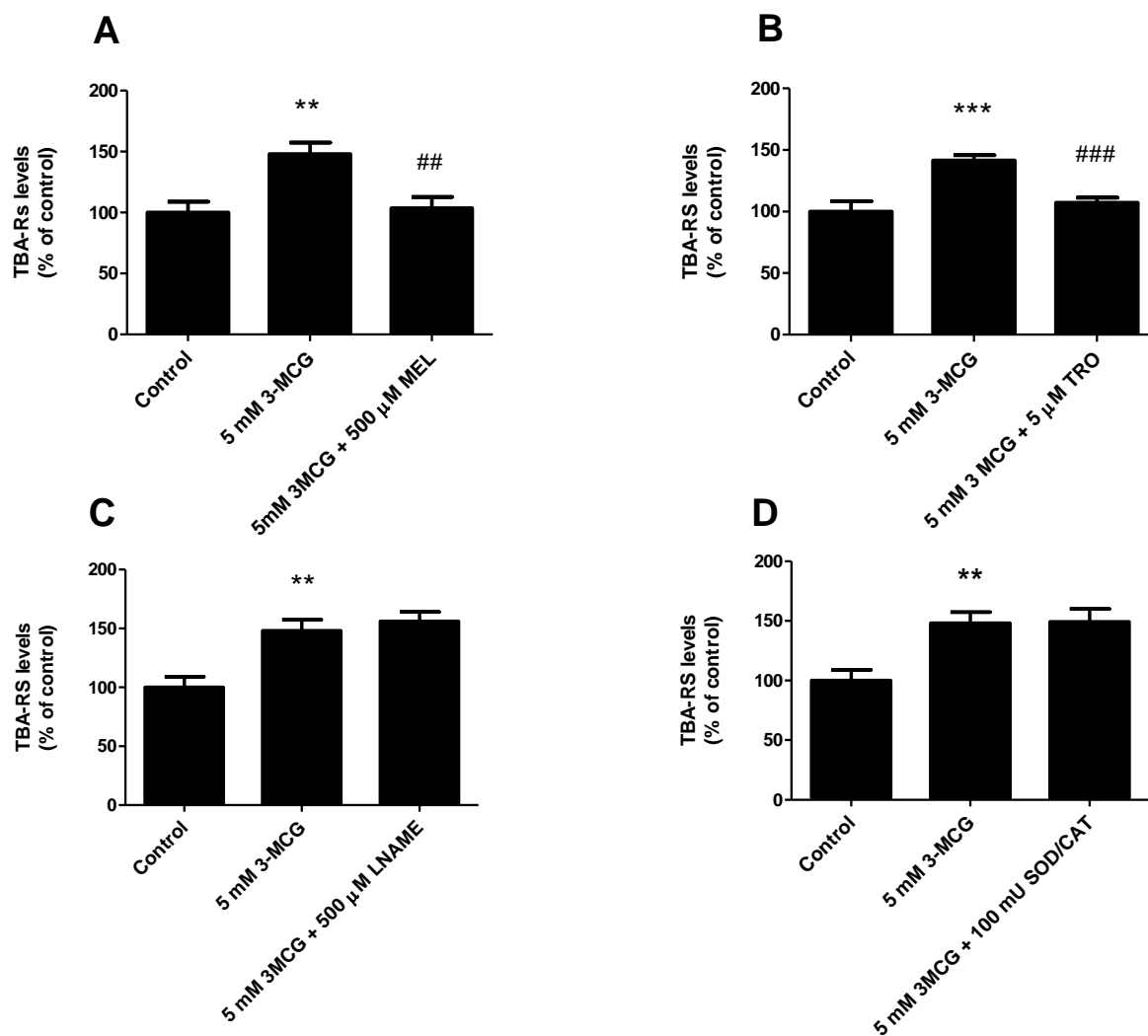


Figure 3

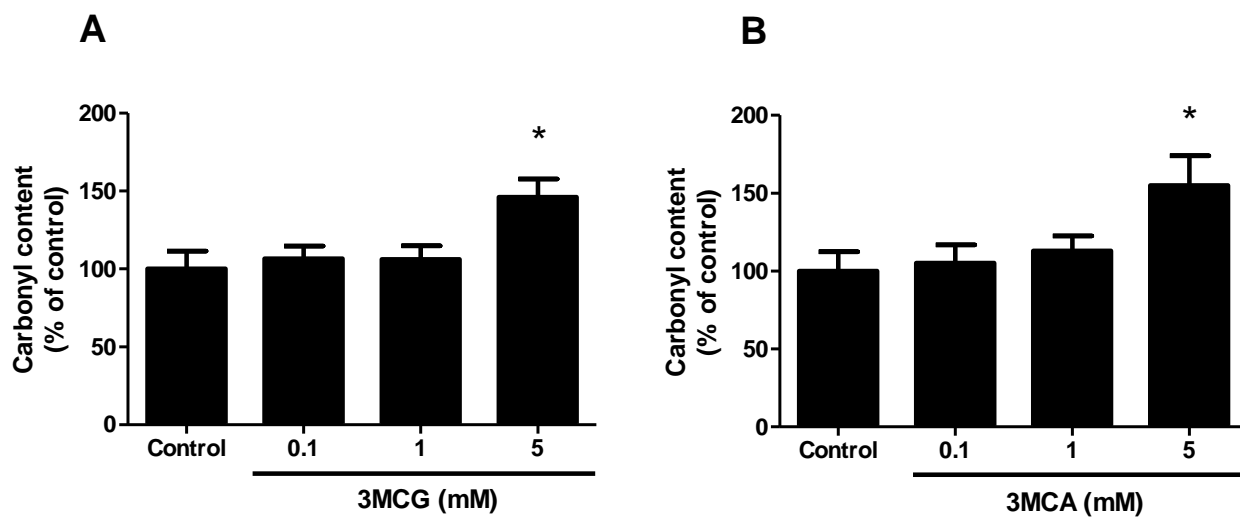


Table 1. Effect of 3-methylcrotonylglycine (3MCG) and 3-methylcrotonic acid (3MCA) on nitric oxide concentrations, glutathione (GSH) levels and sulfhydryl content in cerebral cortex of developing rats

Nitrites and nitrates concentrations				
	Control	0.1 mM	1.0 mM	5.0 mM
3MCG	100 ± 32.4	95.5 ± 19.7	88.5 ± 15.1	72.1 ± 12
3MCA	100 ± 23.5	112 ± 15.2	90.4 ± 18.4	93 ± 21.4
GSH values				
	Control	0.1 mM	1.0 mM	5.0 mM
3MCG	100 ± 18.3	97.1 ± 14.7	92.4 ± 11.6	89.8 ± 11.6
3MCA	100 ± 17.8	103 ± 30.7	116 ± 24.7	110 ± 34.6
Sulfhydryl content				
	Control	0.1 mM	1.0 mM	5.0 mM
3MCG	100 ± 11.7	102 ± 9.81	96.5 ± 11.4	95 ± 6.09
3MCA	100 ± 13.8	97.5 ± 7.75	93.5 ± 9.53	87.7 ± 6.55

Values are mean ± standard deviation for five to six independent (animals) experiments per group. Nitrate and nitrite concentrations, GSH levels and sulfhydryl content are expressed as percentage of controls (Control levels [nmol/mg protein]: nitrate and nitrite concentrations: 3MCG: 2.87 ± 0.93; 3MCA: 6.31 ± 1.44; GSH levels: 3MCG: 7.55 ± 1.38; 3MCA: 1.76 ± 0.31; sulfhydryl content: 3MCG: 82.7 ± 9.75; 3MCA: 85.8 ± 11.8). No significant differences between groups were detected (one-way ANOVA).

Table 2. Effect of 3-methylcrotonylglycine (3MCG) on the activity of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR)

	GPx	CAT	SOD	GR
Control	100 ± 9.09	100 ± 6.87	100 ± 13.1	100 ± 20.6
0.1 mM 3MCG	97.8 ± 5.38	77.1 ± 25.3	99 ± 15.3	106 ± 23
1.0 mM 3MCG	99 ± 6.6	86.1 ± 23.4	89.8 ± 9.98	106 ± 23.4
5.0 mM 3MCG	99 ± 6.6	100.3 ± 9.71	84.3 ± 9.98	102 ± 14.4

Values are mean ± standard deviation of five to six independent (animals) experiments per group. The activities of glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR) are expressed as percentage of controls (Controls [U / mg protein] GPx: 10.3 ± 0.98; CAT: 2.41 ± 0.16; SOD: 3.41 ± 0.44; GR: 7.29 ± 1.5). No significant differences between groups were detected (one-way ANOVA).

## **PARTE III**

### ***Discussão e Conclusões***

### III.1. DISCUSSÃO

O fenótipo clínico dos pacientes acometidos pela 3MCCD é heterogêneo, variando desde indivíduos assintomáticos até manifestações severas no período neonatal, com convulsões recorrentes, hipotonia, atraso no desenvolvimento, microcefalia e cardiomiopatia (Wendel e de Baulny, 2006; Ficicioglu e Payan, 2010). Além dos sintomas citados acima, pode-se observar nos pacientes afetados em exames de imagem atrofia cortical, principalmente nas áreas frontal, temporal e nos lobos parietais (de Kremer et al., 2002). Outra característica apresentada pelos pacientes, principalmente após uma infecção ou a administração de dieta rica em proteínas, quando os mesmos passam por uma crise metabólica, é uma condição semelhante a síndrome de Reye, onde observa-se hipoglicemia, acidose metabólica e hiperamonemia (Visser et al., 2000; Dirik et al., 2008).

O mecanismo envolvido na grande variabilidade clínica ainda é desconhecido e parece não haver uma correlação entre o genótipo e o fenótipo apresentado pelos pacientes (Darin et al., 2007). Considerando que existem evidências demonstrando que o estresse oxidativo e a geração de ERO estão relacionadas com a etiologia e/ou progressão de diversas doenças neurodegenerativas (Perez-Severiano et al., 2000; Bogdanov et al., 2001; Behl and Moosmann, 2002; Stoy et al., 2005; Berg e Youdim, 2006; Mancuso et al., 2006) e em algumas doenças do metabolismo intermediário (Sgaravatti et al., 2007; Schuck et al., 2007, 2009; Leipnitz et al., 2011), esse trabalho teve como objetivo verificar se a 3MCG e o 3MCA eram capazes de



alterar o estado redox em córtex cerebral de ratos jovens, através da medida de vários parâmetros de estresse oxidativo.

Primeiramente observou-se que tanto a 3MCG quanto o 3MCA foram capazes de aumentar os níveis de TBA-RS, refletindo a indução na formação de malondialdeído, um dos produtos finais da lipoperoxidação (Halliwell e Gutteridge, 2007b). Sendo assim, podemos sugerir que ambos metabólitos causaram lipoperoxidação *in vitro*. Para verificar se espécies ativas estavam envolvidos na lipoperoxidação induzida pela 3MCG, o metabólito foi co-incubado com alguns antioxidantes para posterior medida dos níveis de TBA-RS. Demonstrou-se que MEL e TRO foram capazes de prevenir o efeito da 3MCG, porém o mesmo não ocorreu quando utilizamos L-NAME ou a mistura de SOD e CAT. Considerando que o TRO (análogo hidrofílico da vitamina E) atua como sequestrador principalmente de radicais peroxil (Halliwell and Gutteridge, 2007b) e que a MEL é um sequestrador de radicais hidroxil (Reiter, 1998), os resultados apresentados sugerem que provavelmente radicais hidroxil e peroxil estão envolvidos na lipoperoxidação provocada pela 3MCG.

Além disso, quando se utilizou L-NAME, um inibidor seletivo da atividade da enzima óxido nítrico sintase, não se observou prevenção da lipoperoxidação provocada pela 3MCG. Aliado a isso, a produção de óxido nítrico, determinada pela quantificação de nitratos e nitritos, não foi alterada por 3MCG e 3MCA, indicando que espécies ativas de nitrogênio não foram responsáveis por esse efeito induzido pela 3MCG e reforçando a hipótese de que há um envolvimento de espécies reativas a oxigênio nesta indução da lipoperoxidação. Além disso, levando-se em consideração que a combinação

de SOD mais CAT não preveniu a lipoperoxidação induzida pela 3MCG, pode-se também deduzir que superóxido e o peróxido de hidrogênio não estão envolvidos no dano oxidativo observado.

Posteriormente, constatou-se um aumento na formação de grupamentos carbonila quando incubamos separadamente o córtex cerebral com 3MCG e 3MCA, indicando que os metabólitos induziram oxidação proteica. Grupamentos carbonila (aldeídos e cetonas) são principalmente produzidos por oxidação da cadeia lateral das proteínas (especialmente Pro, Arg, Lys e Thr), por uma clivagem oxidativa de proteínas ou pela reação da redução de açúcares ou pela oxidação de seus produtos com resíduos de lisina (Dalle-Donne et al., 2003). Geralmente, a detecção de elevados níveis de grupamentos carbonila (dano oxidativo) leva a perda de função protéica (Dalle-Donne et al., 2009). Embora a formação de grupamentos carbonila é principalmente causada por um dano protéico mediado por ERO, não se pode excluir a possibilidade de que aldeídos resultantes da lipoperoxidação podem induzir a geração desses grupamentos (Dalle-Donne et al., 2003).

As defesas antioxidantes também foram determinadas no córtex cerebral dos animais. Observou-se que a 3MCG e o 3MCA não alteraram os níveis de GSH, uma importante defesa antioxidante no cérebro. Da mesma forma, o conteúdo de grupamentos sulfidrilica também não se modificou na presença dos metabólitos. Finalmente verificamos que a atividade das enzimas antioxidantes GPx, SOD, CAT e GR não foi alterada pela 3MCG. Tomados em seu conjunto, esses resultados demonstram que as defesas antioxidantes no córtex cerebral não foram afetadas pelos dois metabólitos acumulados na 3MCCD, embora houvesse o dano oxidativo lipídico e

proteico causado por espécies ativas de oxigênio. Portanto, concluímos que a produção aumentada de radicais livres devido a 3MCG e 3MCA foi suficiente para produzir dano oxidativo, mas incapaz de alterar as defesas antioxidantes.

No presente estudo, utilizou-se córtex cerebral, uma vez que essa estrutura está comprometida nos pacientes com 3MCCD, através da detecção de atrofia cortical nos pacientes afetados pela doença (de Kremer et al., 2002). Enfatize-se que sobrenadantes teciduais são frequentemente utilizados como modelo para avaliar parâmetros de estresse oxidativo, visto que contêm toda maquinaria celular, incluindo mitocôndrias (a maior fonte de radicais livres) e enzimas necessárias para a produção e detoxificação de radicais livres (Stocks et al., 1974; Cadenas et al., 1981; Gonzalez e Flecha et al., 1991; Lorez-Arnaiz e Llesuy, 1993; Llesuy et al., 1994; Evelson et al., 2001; Halliwell e Gutteridge, 2007b; Dresch et al., 2009).

Resultados recentes de nosso laboratório demonstraram que a 3MCG inibe a atividade do complexo II-III na cadeia transportadora de elétrons, bem como a atividade de enzimas como a creatina cinase mitocondrial e a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Além disso, observou-se que a utilização de antioxidantes foi capaz de prevenir os efeitos provocados pela 3MCG, sugerindo o envolvimento de espécies reativas (Moura et al., 2011). Considerando que um bloqueio na cadeia transportadora de elétrons pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais podem inibir alguns complexos da cadeia respiratória, assim como enzimas como creatina cinase e  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Kowaltowski et al., 2009; Keane et al., 2011), não se pode excluir a possibilidade que um desequilíbrio na homeostase mitocondrial, refletido pelo estresse oxidativo, conforme demonstrado nesse trabalho, bem como um

comprometimento da bioenergética cerebral podem agir sinergicamente, sendo potencialmente deletérios ao cérebro (Adam-Vizi, 2005; Moura et al., 2011).

No momento é difícil estabelecer a importância fisiopatológica dos resultados observados nesse trabalho, uma vez que não existe informação a respeito das concentrações em líquidos corporais, bem como tecidos, de 3MCG e 3MCA. Entretanto, se os efeitos *in vitro* encontrados na presente investigação forem confirmados *in vivo* em animais e em tecidos de seres humanos com a doença, é possível que o dano oxidativo lipídico e protéico induzido por 3MCG e 3MCA possa representar um importante mecanismo causador do dano cerebral apresentado pelos pacientes acometidos pela 3MCCD, principalmente durante episódios de crise metabólica, quando ocorre um aumento nas concentrações dos metabólitos acumulados.

## III.2. CONCLUSÕES

- A 3-metilcrotonil glicina (3MCG) e o ácido 3-metilcrotônico (3MCA) induziram lipoperoxidação (dano oxidativo lipídico determinado através do aumento da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) em córtex cerebral de ratos jovens.

- A lipoperoxidação induzida pela 3MCG foi prevenida pelos antioxidantes melatonina (MEL) e trolox (TRO), indicando o envolvimento dos radicais hidroxila e peroxila no efeito observado. Por outro lado, a combinação de antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e a N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) não foram capazes de prevenir o efeito causado pela 3MCG.

- O 3MCG e o 3MCA não alteraram produção de nitratos e nitritos, indicando que espécies ativas de nitrogênio não são induzidas por esses compostos.

- A 3MCG e o 3MCA provocaram dano oxidativo proteico, evidenciado pelo aumento da formação de carbonilas em córtex cerebral de ratos jovens.

- A 3MCG e o 3MCA não foram capazes de alterar os níveis de GSH e a oxidação de grupamentos sulfidríla.

- A 3MCG não alterou as atividades das enzimas antioxidantes GPx, CAT, SOD e GR em córtex cerebral de ratos jovens.

- O dano oxidativo lipídico e protéico provocado pela 3MCG e pelo 3MCA, compostos acumulados na 3MCCD, no córtex cerebral poderia

explicar, ao menos em parte, as manifestações neurológicas e anormalidades estruturais corticais apresentadas por pacientes afetados pela 3MCCD.

### III.3. PERSPECTIVAS

- Avaliar os efeitos *in vitro* da 3MCG e do 3MCA sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em coração de ratos jovens.
- Avaliar os efeitos *in vitro* da 3MCG e do 3MCA sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em culturas de células neurais.
- Avaliar os efeitos *ex vivo* da 3MCG e do 3MCA sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e coração de ratos jovens.

## REFERÊNCIAS

Adam-Vizi V. Production of Reactive Oxygen Species in Brain Mitochondria: contribution by Electron Transport Chains and Non-Electron Transport Chain Sources. *Antioxid Redox Signal* 7:1140-1149, 2005

Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, Hughes PE. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol*, 409 - 470, 2000

Arnold GL, Koeberl DD, Matern D, Barshop B, Braverman N, Burton B, Cederbaum S, Fiegenbaum A, Garganta C, Gibson J, Goodman SI, Harding C, Kahler S, Kronn D, Longo N. A Delphi-based consensus clinical practice protocol for the diagnosis and management of 3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 93:363 - 370, 2008

Baric I, Furnic K, Hoffmann GF. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. *Croat Med J* 42:379 - 383, 2001

Barschak AG, Marchesan C, Sitta A, Deon M, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Maple syrup urine disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles. *Clin Biochem* 41: 317 - 324, 2008a

Barschak AG, Sitta A, Deon M, Barden AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas, CR. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab Brain Dis* 23: 71 - 80, 2008b



Baumgartner MR, Almashanu S, Suormala T, Obie C, Cole RN, Packman S, Baumgartner ER, Valle D. The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Clin Invest.* 107:495 - 504, 2001

Baumgartner, MR, Dantas, MF, Suormala, T, Almashanu, S, Giunta, C, Friebe, D, Gebhardt, B, Fowler, B, Hoffmann, GF, Baumgartner, ER, Valle, D. Isolated 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Deficiency: Evidence for an Allele-Specific Dominant Negative Effect and Responsiveness to Biotin Therapy. *Am J Hum Genet* 75:790 – 800, 2004

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

Berg, D, Youdim, MB. Role of iron in neurodegenerative disorders. *Top Magn Reson Imaging* 17: 5 - 17, 2006

Bickel, H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme* 38:14 - 26, 1987

Bogdanov, MB, Andreassen, OA, Dedeoglu, A, Ferrante, RJ, Beal, MF. Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse of Huntington's disease. *J Neurochem* 79: 1246 - 1249, 2001

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

Cadenas E, Varsavsky AI, Boveris A, Chance B. Oxygen- or organic hydroperoxide-induced chemiluminescence of brain and liver homogenates. *Biochem. J* 198:645 – 654, 1981

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

Dalle-Donne, I, Carini, M, Orioli, M, Vistoli, G, Regazzoni, L, Colombo, G, Rossi, R, Milzani, A, Aldini, G. Protein carbonylation: 2,4 dinitrophenylhydrazine reacts with both aldehydes/ketones and sulfenic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1411 – 1419, 2009

Darin N, Andersen O, Lars-Martin W, Holmgren D, Holme E. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency and severe multiple sclerosis. *Pediatr Neurol* 36:132 - 134, 2007

de Kremer RD, Latini A, Suormala T, Baumgartner ER, Larovere L, Civallero G, Guelbert N, Paschini-Capra A, Depetris-Boldini C, Mayor CQ. Leukodystrophy and CSF purine abnormalities associated with isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Metab Brain Dis* 17:13 - 18, 2002

Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Pigatto M, Schmitt GO, Jardim LB, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int J Dev Neurosci* 25: 441 - 444, 2007

Deon M, Garcia MP, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Schimit GO, Pigatto M, Jardim LB, Wajner M, Giugliani R, Vargas CR. Hexacosanoic and docosanoic acids plasma levels in patients with cerebral childhood and asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy: Lorenzo's oil effect. *Metab Brain Dis* 23: 43 - 49, 2008

Dirik E, Yis U, Pasaoglu G, Chambaz C, Baumgartner MR. Recurrent attacks of status epilepticus as predominant symptom in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Brain Dev* 30:218 - 220, 2008

Dresch MT, Rossato SB, Kappel VD, Biegelmeyer R, Hoff ML, Mayorga P, Zuanazzi JA, Henriques AT, Moreira JC. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Anal Biochem* 385:107 – 114, 2009

Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosol. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 388:261 – 266, 2001

Feksa LR, Latini A, Rech VC, Feksa PB, Koch GD, Amaral MF, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CM. Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats. *Metab Brain Dis* 23: 221 - 233, 2008

Ficicioglu C, Payan I. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: metabolic decompensation in a noncompliant child detected through newborn screening. *Pediatrics* 118:2555 – 2556, 2006

Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 10:93 –100, 1991

Gu M, Owen AD, Toffa SE, Cooper JM, Dexter DT, Jenner P, Marsden CD, Schapira AH. Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases. *J Neurol Sci* 158: 24 - 29, 1998

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

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* 142: 231 - 255, 2004

Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141:312 - 322, 2006

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

Halliwell B, Gutteridge JMC. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., editores. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press, p. 187 – 267, 2007b

Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidant defences. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., editores. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press, p. 79 – 185, 2007c

Janetzky B, Hauck S, Youdim MB, Riederer P, Jellinger K, Pantucek F, Zöchling R, Boissl KW, Reichmann, H. Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 169: 126 - 128, 1994

Keane PC, Kurzawa M, Blain PG, Morris CM. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 2011:716871, 2011

Kessler A, Biasibetti M, da Silva Melo DA, Wajner M, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wannmacher CMD. Antioxidant effect of cysteamine in brain cortex of young rats. *Neurochem Res* 33: 737 - 744, 2008

Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biol Med* 2009 47:333 - 343, 2009

Latini A, Scussiato K, Leipnitz G, Gibson KM, Wajner M. Evidence for oxidative stress in tissues derived from succinate semialdehyde dehydrogenase-deficient mice. *J Inherit Metab Dis* 30: 800 - 810, 2007

Leipnitz G, Amaral AU, Fernandes CG, Seminotti B, Zanatta A, Knebel LA, Vargas CR, Wajner M. Pristanic acid promotes oxidative stress in brain cortex

of young rats: A possible pathophysiological mechanism for brain damage in peroxisomal disorders. *Brain Research* 1382:259 – 265, 2011

Llesuy S, Evelson P, Gonzalez-Flecha B, Peralta J, Carreras MC, Poderoso JJ, Boveris A. Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome. *Free Radic Biol Med* 16:445 – 451, 1994

Lovell MA, Xie C, Markesbery WR. Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 855: 116-123, 2000

Lores Arnaiz S, Llesuy S. Oxidative stress in mouse heart by antitumoral drugs: a comparative study of doxorubicin and mitoxantrone. *Toxicology* 77:31 – 38, 1993

Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 10: 59-73, 2006

Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 9: 133 - 146, 1999

Méndez-Álvarez E, Soto-Otero R, Hermida-Aeijeiras A, López-Real AM, Labandeira-García JL. Effects of aluminium and zinc on the oxidative stress caused by 6-hydroxydopamine autoxidation: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1586: 155 - 168, 2001

Moura AP, Ribeiro CA, Zanatta A, Busanello EN, Tonin AM, Wajner M. 3-Methylcrotonylglycine Disrupts Mitochondrial Energy Homeostasis and

Inhibits Synaptic Na(+),K (+)-ATPase Activity in Brain of Young Rats. *Cell Mol Neurobiol.* (Epub ahead of print)

Nguyen KV, Naviaux RK, Patra S, Barshop BA, Nyhan WL. Novel mutations in the human MCCA and MCCB gene causing methylcrotonylglycinuria. *Mol Genet Metab* 102:218 - 221, 2011

Nourooz-Zadeh J, Liu EH, Yhlen B, Anggard EE, Halliwell B. F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72: 734 - 740, 1999

Perez-Severiano F, Rios C, Segovia J. Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Res* 862: 234 - 237, 2000

Reiter RJ. Melatonin, active oxygen species and neurological damage. *Drug News Perspect.* 11, 291 – 296, 1998

Ribeiro CAJ, Balestro F, Grando V, Wajner M. Isovaleric acid reduces Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats. *Cell and Mol Neurobiol* 27 (4), 529 - 540, 2007

Rose CD, Henneberry RC. Etiology of the neurodegenerative disorders: a critical analysis. *Neurobiol Aging* 15:233 - 234, 1994

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1: 1269, 1989

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD  
Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54:  
823 - 827, 1990a

Schapira AH, Mann VM, Cooper JM, Dexter D, Daniel SE, Jenner P, Clark JB,  
Marsden CD. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase  
(complex I) deficiency in Parkinson's disease, *J Neurochem* 55: 2142 - 2145,  
1990b

Schuck PF, Ceolato PC, Ferreira GC, Tonin A, Leipnitz G, Dutra-Filho CS,  
Latini A, Wajner M. Oxidative stress induction by cis-4-decenoic acid:  
relevance for MCAD deficiency. *Free Radic. Res.* 41, 1261 – 1272, 2007

Schuck PF, Ferreira GC, Moura AP, Busanello EN, Tonin AM, Dutra-Filho CS,  
Wajner M. Medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency elicit  
lipid and protein oxidative damage and decrease non-enzymatic antioxidant  
defenses in rat brain. *Neurochem. Int.* 54, 519 – 525, 2009

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (editores). *The Metabolic and  
Molecular Bases of Inherited Disease*. 8<sup>a</sup> edition. New York, McGraw-Hill. 3-  
45, 2001

Sgaravatti AM, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Pederzoli CD, Prestes CG,  
Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS. g-Hydroxybutyric acid  
induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Neurochem. Int.* 50,  
564 – 570, 2007



Sitta A, Barschak AG, Deon M, Terroso T, Pires R, Giugliani R, Dutra-Filho CS, Wajner, M., Vargas, C.R. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab Brain Dis* 21: 287 - 296, 2006

Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10540-10543, 1991

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

Stocks J, Gutteridge JM, Sharp RJ, Dormandy TL. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin Sci Mol Med* 47:215 – 222, 1974

Stoy N, Mackay GM, Forrest CM, Christofides J, Egerton M, Stone TW, Darlington LG. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurochem* 93: 611 - 623, 2005

Veal D, Day A. Hydrogene peroxide as a signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 15:147 – 151, 2011

Visser G, Suormala T, Smit GPA, Rejingoud DJ, Bink-Boelkens MTE, Niezen-Koning KE, Baumgartner ER. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficinecy in an infant with cardiomyopathy, in her brother with developmental delay and in their asymptomatic father. *Eur J Pediatr* 159:901 - 904, 2000

Wajner M, Latini A, Wyse ATS, Dutra-Filho CS. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 27:427 – 448, 2004

Wendel U, de Baulny HO. Branched-Chain Organic Acidurias/Acidemias. In: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH (editores) *Inborn Metabolic Diseases*, 4<sup>th</sup> edn Springer, Hildelberg, pp 247 - 260, 2006

Zugno, A.I., Stefanello, F.M., Scherer, E.B., Mattos, C., Pederzolli, C.D., Andrade, V.M., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T. Guanidinoacetate decreases antioxidant defenses and total protein sulfhydryl content in striatum of rats. *Neurochem Res* 33: 1804 - 1810, 2008

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Rota do catabolismo da leucina.....	11
--	----