

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

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS *IN VITRO* DO ÁCIDO 2-
METILBUTÍRICO E DA 2-METILBUTIRILGLICINA SOBRE
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO DE
RATOS JOVENS**

Lisiane Aurélio Knebel

ORIENTADOR: Prof. Dr. Guilhian Leipnitz

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

Porto Alegre, 2012

*Aos meus pais, Guido e Wanda,
e ao Bruno, pela paciência e
pelo carinho.*

“Meus senhores, a ciência é coisa séria, e merece ser tratada com seriedade. Não dou razão dos meus atos de alienista a ninguém, salvo aos mestres e a Deus. Se quereis emendar a administração da Casa Verde, estou pronto para ouvir-vos; mas se exigis que me negue a mim mesmo, não ganhareis nada. Poderia convidar alguns de vós, em comissão dos outros, a vir viver comigo os loucos reclusos; mas não o faço, porque seria dar-vos razão do meu sistema, o que não farei a leigos nem a rebeldes.”

O Alienista – Machado de Assis, cit. p. 44.

AGRADECIMENTOS

Bom... Essa parte da minha dissertação é bastante especial para mim e faço questão de fazê-la. Digo isso primeiro porque tenho convicção de que não realizei este trabalho sozinha; segundo, porque este é um local propício para homenagear e agradecer às pessoas que estiveram comigo nesse momento tão peculiar.

Vou começar por onde faz mais sentido para mim: começarei pelo começo! E tudo inicia com a abertura das portas do laboratório 38 pelo Prof. Moacir. Este camarada foi quem me deu a oportunidade de iniciar a minha carreira acadêmica. Em meados do ano de 2008 ele, muito gentilmente, me aceitou como sua aluna de iniciação científica. Desde então ele vem, diariamente, me ensinando a ser uma pesquisadora. És, sem dúvida, um grande exemplo a seguir, e trabalhar com alguém assim não tem preço. Obrigada, professor, por me receber tão bem e por me ensinar todos os dias alguma coisa!

Em seguida, preciso agradecer ao meu querido orientador e grande amigo Guilhian. Esse outro camarada foi desde o início um super amigo. Ele me ensinou a sacrificar ratos no primeiro dia em que pisei no laboratório 38! Uma grande recepção! Obrigada, Gui, se não fosse assim de supetão, eu nunca teria coragem de matá-los!! E durante todos esses anos ele foi me ensinando desde as coisas mais básicas, como preparar uma amostra, até as coisas nem tão básicas assim, como elaborar um dia inteiro de experimentos. Mas tudo isso com muito bom humor e preocupação comigo. Gui, eu gostaria de agradecer todos os momentos de ensinamentos, todos os momentos de bobagens ditas, todos os conselhos dados, e principalmente, todos os chimarrões tomados na tua companhia! Sem dúvida, eram nesses momentos de chimarrão que conversávamos coisas importantíssimas e muito científicas! Estamos só no começo de um grande trabalho em conjunto! Obrigada pela confiança!

Na sequência, eu gostaria de agradecer a todos os meus colegas de laboratório. Uns estiveram mais presentes no meu trabalho, outros nem tanto. Mas todos os colegas do lab. 38 merecem o meu agradecimento. Ângela (irmãzinha científica), obrigada por estar comigo em praticamente 90% dos meus experimentos, obrigada pela companhia e pela amizade. Anelise e Mateus Grings (a dupla imbatível!), obrigada por todas as mãos que vocês me deram nos experimentos, obrigada pelo companheirismo de vocês. César, não sei bem se me desculpo pelas 400 perguntas diárias que te fazia a respeito de bioquímica ou se agradeço pelas 400 respostas diárias sobre bioquímica que tu me deu. Valeu pela ajuda e obrigada por compartilhar o teu conhecimento! Bianca, Carol Fernades, Alexandre, Alana e Estela, vocês sempre foram ótimas companhias e sempre me ajudaram quando precisei. Obrigada por poder contar com vocês. Carol Viegas, minha primeiríssima chefinha, obrigada pelos ensinamentos, pela super paciência (digo super paciência porque só ela sabe quantos experimentos dela que eu estraguei! Foi mal!) e pelo companheirismo nos primeiros meses de laboratório. Também gostaria de agradecer aos

meus bolsistas amados, Léo Alvorcem e Belisa por estarem comigo durante todo o meu mestrado, por me ajudarem sempre que podiam nos meus experimentos, pela ótima companhia e pelos momentos divertidos. Por fim, agradeço de coração aos bolsistas Cristiane, Mateus Streacker, Vanessa, Clarissa, Léo Fritch, Fernanda e Luciana por toda a ajuda que vocês sempre dão, não só a mim mas a todos os pós-graduandos. Obrigada pelo coleguismo e pelos momentos divertidos.

Passando para o momento familiar, eu gostaria de agradecer imensamente aos meus pais Guido e Wanda por me ensinarem desde o início que estudar é a coisa mais importante que existe. Obrigada por terem me ensinado a dar valor aos estudos, obrigada por terem me mantido todos esses anos em bons colégios, por terem me dado a oportunidade de ter feito uma faculdade, por terem me incentivando desde pequena a aprender inglês, obrigada por terem sido pais tão atenciosos e presentes, obrigada pelo amor, pelo dia-a-dia, pela vida! Amo vocês imensamente!

Rafa, meu irmão, obrigada por me incomodar tanto! Sem você a minha vida seria tão pacata! Obrigada por tudo!

Bruno, meu Lindão: Quero dizer que tu és a pessoa que eu sempre idealizei pra mim. Obrigada por estes 6 anos de amor, de compreensão, de ensinamentos e de companhia! A minha vida do teu lado é simplesmente perfeita!

Cléo e Darceg, meus sogros queridos: Obrigada pelo incentivo que sempre veio da parte de vocês, obrigada por serem meus segundos pais, obrigada pela ótima companhia e por todas as coisas que vocês me ensinam sempre. Também agradeço à Carla, minha cunhada, pelos momentos divertidos, por me ajudar com as minhas dúvidas de computador, pelo carinho.

Grandes amigas e irmãs Tina, Fafá, Maína, Maíra, Paula, Nati, Pri, Rena e Paty: Vocês são as irmãzinhas que eu escolhi! Obrigada por estarem comigo há tanto tempo, obrigada por crescerem e amadurecerem comigo e pelas trocas de experiências que tivemos desde o colégio. Estaremos juntas trocando experiências e amadurecendo por mais 100 anos! Obrigada!

E por fim, mas não menos importante, agradeço às minhas cachorras Nala e Vicky pela companhia (elas são realmente muito companheiras!) e por hidratarem muito bem os meu pés com as suas lambidas. E agradeço aos meus gatos Thales e Tininha pela troca de carinho e por esquentarem minha cama nas noites de inverno!

Acho que era isso... Todas essas pessoas fizeram parte do meu trabalho e fazem parte da minha vida e eu sempre aprendi e continuo aprendendo alguma coisa com cada uma delas! Valeu!!

Com carinho...

Lisiane Aurélio Knebel.

SUMÁRIO

PARTE 1	1
I.1. INTRODUÇÃO.....	6
I.1.1. Erros Inatos do Metabolismo (EIM).....	6
<i>I.1.1.1. Conceito e classificação</i>	6
<i>I.1.1.2. Sintomatologia</i>	8
I.1.2. Acidúrias Orgânicas	12
<i>I.1.2.1. Acidúrias orgânicas de cadeia ramificada</i>	12
<i>I.1.2.2. Deficiência da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta/ramificada (SBCAD)</i>	12
I.1.3. Radicais livres.....	15
<i>I.1.3.1. Mecanismos de dano celular induzido por radicais livres</i>	16
I.1.4. Defesas antioxidantes	19
<i>I.1.4.1. Defesas antioxidantes não-enzimáticas</i>	19
<i>I.1.4.2. Defesas antioxidantes enzimáticas</i>	20
I.1.5. Estresse oxidativo	20
I.1.6. Suscetibilidade cerebral ao dano oxidativo	22
I.1.7. Estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas	23
I.2. OBJETIVOS.....	25
I.2.1. Objetivo geral	25
I.2.2. Objetivos específicos.....	25
PARTE II	26
Capítulo I	27

PARTE III	58
III.1. DISCUSSÃO	59
III.2. CONCLUSÕES	63
III.3. PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

PARTE 1

Introdução e objetivos

RESUMO

A deficiência da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta / ramificada (SBCAD), também conhecida como deficiência da 2-metilbutiril-CoA desidrogenase, é uma doença de herança autossômica recessiva que afeta o catabolismo da isoleucina. Este distúrbio é bioquimicamente caracterizado pelo acúmulo tecidual e elevada excreção urinária do ácido 2-metilbutírico (2MB) e da 2-metilbutirilglicina (2MBG), além da 2-metilbutirilcarnitina. Apesar de a doença apresentar predominantemente sintomas neurológicos, tais como retardo mental, convulsões e letargia, e imagens de ressonância magnética evidenciarem dano cortical, a fisiopatologia desse distúrbio ainda não foi estudada. Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos *in vitro* do 2MB e da 2MBG sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens. Para tanto, foram preparados sobrenadantes de córtex cerebral, os quais foram incubados na ausência ou na presença dos metabólitos em concentrações que variaram de 0,1 a 5 mM por 1 h a 37° C. Após a incubação, alíquotas foram retiradas para a avaliação dos parâmetros bioquímicos. Nossos resultados mostram que a 2MBG, mas não o 2MB, aumentou as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), sugerindo indução de peroxidação lipídica. A 2MBG também causou oxidação de grupamentos sulfidrilas e reduziu as concentrações de glutatona (GSH), refletindo uma diminuição das defesas antioxidantes, enquanto o 2MB não alterou esses parâmetros. Por outro lado, o 2MB e a 2MBG não alteraram a formação de carbonilas. Além disso, foi verificado que o aumento nos níveis de TBA-RS e a redução nas concentrações de GSH causados por 2MBG foram prevenidos por antioxidantes, indicando que espécies reativas estavam envolvidas nesses efeitos. Ainda foi demonstrado que a redução dos níveis de GSH provocada pela 2MBG não foi devido a uma ação oxidativa direta do metabólito, pois este não alterou o conteúdo de grupamentos tióis de uma solução comercial de GSH na ausência de tecido cerebral. Finalmente, visto que a produção de óxido nítrico não foi alterada por estes metabólitos, presume-se que espécies reativas de oxigênio estejam principalmente envolvidas nos efeitos mediados pela 2MBG. Os resultados sugerem que a 2MBG induz dano oxidativo lipídico e reduz as defesas antioxidantes não-enzimáticas em cérebro de ratos pelo aumento na geração de espécies reativas de oxigênio. Portanto, o estresse oxidativo induzido pela 2MBG pode estar envolvido, pelo menos em parte, na fisiopatologia da disfunção neurológica encontrada nos pacientes afetados pela deficiência da SBCAD.

ABSTRACT

Short/branched-chain acyl-CoA dehydrogenase (SBCAD) deficiency, also known as 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency, is an autosomal recessive disorder of isoleucine metabolism. This disorder is biochemically characterized by high tissue accumulation and urinary excretion of 2-methylbutyrylglycine (2MBG) and 2-methylbutyric acid (2MB), as well as 2-methylbutyrylcarnitine. Although patients present predominantly neurological symptoms, such as mental retardation, seizures and lethargy, and magnetic resonance imaging reveals cortical damage, the pathophysiology of this disorder has not been studied. Therefore, this study aimed to investigate the *in vitro* effects of 2MB and 2MBG on important parameters of oxidative stress in cerebral cortex of young rats. Cortical supernatants were incubated in the absence or in the presence of the metabolites at concentrations ranging from 0.1 to 5 mM for 1 h at 37° C. Our results show that 2MBG, but not 2MB, increased thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), suggesting induction of lipid peroxidation. 2MBG also induced oxidation of sulfhydryl groups and reduced the concentrations of glutathione (GSH), reflecting a decrease of non enzymatic antioxidant defenses, whereas 2MB did not alter these parameters. In contrast, 2MB and 2MBG did not alter carbonyl formation. In addition, increased levels of TBA-RS and reduction of GSH levels induced by 2MBG were prevented by antioxidants, indicating that reactive species were involved in these effects. Furthermore, the reduction of GSH levels induced by 2MBG were not due to a direct oxidative action, since this metabolite did not alter the sulfhydryl content from a commercial solution of GSH in the absence of cerebral tissue. Finally, since nitric oxide production was not altered by these metabolites, it is presumed that reactive oxygen species possibly underlay 2MBG effects. The results suggest that 2MBG induces lipid oxidative damage and reduces non enzymatic antioxidant defenses in rat brain mediated by generation of reactive oxygen species. We can therefore assume that oxidative stress induced by 2MBG is involved, at least in part, in the pathophysiology of neurological dysfunction found in patients affected by SBCAD deficiency.

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$ – oxigênio singlete;

2MB – ácido 2-metilbutírico;

2MBG – 2-metilbutirilglicina;

8-OHdGA – 8-hidróxi-2'-deoxiguanosina;

ATP – adenosina-5'-trifosfato;

CAT – catalase;

CoA – Coenzima A;

DNA – ácido desoxiribonucleico;

EIM – erros inatos do metabolismo;

ERN – espécies reativas de nitrogênio;

ERO – espécies reativas de oxigênio;

GPx – glutathione peroxidase;

GRd – glutathione reductase;

GSH – glutathione reduzida;

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio;

HNE – 4-hidroxinonenal;

LCR – líquido cefaloraquidiano;

LOOH – lipoperóxido;

MDA – malondialdeído;

MEL – melatonina;

MnSOD – superóxido dismutase manganês;

NO[•] – óxido nítrico;

O₂ – oxigênio molecular;

O₂^{•-} – ânion superóxido;

OH[•] – radical hidroxila;

ONOO⁻ – peroxinitrito;

PUFA – ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada;

RNA – ácido ribonucleico;

ROO[•] - peroxila;

SBCAD – desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta/ramificada;

SOD – superóxido dismutase;

TBA-RS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;

TRO – trolox.

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. Erros Inatos do Metabolismo (EIM)

I.1.1.1. Conceito e classificação

O termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi utilizado pela primeira vez por Archibald Garrod em 1908 em estudos realizados em pacientes com alcaptonúria, doença em que os afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. O pesquisador observou que, frequentemente, um ou mais indivíduos da mesma família eram afetados sem que seus pais ou demais parentes apresentassem a doença. Baseado também na observação da maior incidência de consanguinidade entre os pais dos pacientes portadores de alcaptonúria e nas leis de Mendel, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio. Através da determinação do ácido homogentísico na urina dos pacientes e da observação de que esta substância era um metabólito normal da degradação da tirosina, ele relacionou este acúmulo a um bloqueio na conversão do ácido homogentísico até fumarato e acetoacetato. Verificou-se mais tarde que tais alterações resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína enzimática (SCRIVER *et al.*, 2001).

A maioria dos EIM deve-se à deficiência na atividade de uma enzima. A ausência ou deficiência severa da atividade enzimática leva a um bloqueio metabólico com acúmulo dos substratos e seus derivados, com repercussão clínica variável no indivíduo, dependendo da importância da rota afetada. No entanto, geralmente provocam sintomatologia grave e, algumas vezes, letal. Os EIM já foram descritos em todas as áreas do metabolismo humano normal (MITCHELL e FUKAO, 2001).

Sinclair (1982) classificou os EIM em quatro grandes grupos conforme o tipo de função exercida pela proteína deficiente e o tecido envolvido, considerando ainda aspectos clínicos, bioquímicos, patológicos e terapêuticos:

- a) *Desordens de transporte*: envolvem proteínas transportadoras de moléculas orgânicas ou inorgânicas. Exemplos: deficiência de dissacaridasas e defeito no transporte de magnésio.
- b) *Desordens de armazenamento, degradação e secreção*: envolvem proteínas relacionadas com o aparelho de Golgi ou lisossomos, na sua grande maioria, provocando acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos. Exemplos: doenças lisossômicas de depósito, glicogenoses e cistinose.
- c) *Desordens de síntese*: envolvem a síntese de proteínas com funções hormonais, de defesa imunológica, estrutural, etc. Exemplo: hiperplasia adrenal congênita por deficiência na atividade da enzima 21-hidroxilase, hipogamaglobulinemia.
- d) *Desordens do metabolismo intermediário*: caracterizam-se por deficiências enzimáticas das rotas do metabolismo intermediário de moléculas pequenas, comprometendo importantes rotas, como o ciclo do ácido tricarboxílico, o ciclo da uréia ou outras rotas. Assim, o substrato da enzima deficiente se acumula e, a menos que haja uma rota alternativa para metabolizá-lo, o produto final da reação não será formado. Os mecanismos de dano podem ocorrer pela ação do substrato acumulado ou por seus derivados que podem ser tóxicos, levando a alterações bioquímicas e danos em determinados tecidos por serem liberados na circulação e transportados para todo o organismo, ou pela falta de substâncias essenciais ao desenvolvimento do organismo. Considerados os mais frequentes EIM, essas desordens têm como exemplo as acidúrias

orgânicas, as aminoacidopatias, as desordens do metabolismo das purinas e pentoses, entre outros.

A identificação de um EIM permite, muitas vezes, a introdução de um tratamento eficaz. Quando isso é possível, a ocorrência de outros afetados no mesmo grupo familiar pode ser evitada pela identificação de casais em risco, aos quais pode ser oferecido o aconselhamento genético e, em muitos casos, o diagnóstico pré-natal (SCRIVER *et al.*, 2001).

1.1.1.2. Sintomatologia

Os pacientes portadores de EIM apresentam sintomas muito variados e inespecíficos, inclusive aqueles que possuem o mesmo distúrbio. Essa variação fenotípica deve-se a diferentes graus de deficiência enzimática, área do metabolismo envolvida e tecidos afetados. No entanto, algumas manifestações clínicas aparecem com maior frequência no período neonatal, tais como retardo no crescimento, vômitos, diarreia, convulsões, letargia ou coma, odor peculiar na pele ou urina e dificuldade alimentar, enquanto outras (atraso no desenvolvimento psicomotor, neurodegeneração progressiva) podem aparecer mais tarde (BURTON, 1987).

A forma de aparecimento dos sintomas é um fator importante na distinção entre os EIM devido a alterações do metabolismo intermediário e EIM devido ao depósito intracelular de macromoléculas. Os defeitos do metabolismo intermediário que levam ao acúmulo de moléculas pequenas (aminoácidos e ácidos orgânicos) geralmente têm uma apresentação clínica súbita e a evolução se caracteriza por episódios agudos recorrentes geralmente precedidos por infecções, ingestão alimentar exagerada de alimentos específicos, cirurgia, jejum ou outras condições de catabolismo elevado, já que nestas situações ocorre degradação de proteínas ou lipídios que vão originar os metabólitos potencialmente tóxicos (ex.: defeitos do ciclo da uréia e acidemias

orgânicas). São consideradas doenças de intoxicação e/ou de comprometimento do metabolismo energético, pois várias dessas entidades patológicas caracterizam-se por prejuízo deste sistema.

Nos intervalos entre as crises os pacientes podem estar clinicamente normais. Para muitas destas doenças do metabolismo intermediário de apresentação clínica súbita é, portanto, essencial que as amostras para análise laboratorial sejam coletadas nos momentos de crise metabólica. O exame físico geralmente é inespecífico assim como os exames histopatológicos dos órgãos mais afetados. O tratamento agudo com restrição alimentar específica (proteínas, lipídios ou glicídios) associada ou não à suplementação de vitaminas (que são cofatores de reações enzimáticas) mostra resultados extraordinários, retirando o paciente da crise em poucas horas. Outro grupo dessas doenças mostra uma evolução crônica desde o nascimento ou nos primeiros meses ou anos de vida. Nesses casos, a intoxicação é crônica (ex.: fenilcetonúria) e os afetados apresentam um atraso na aquisição das habilidades motoras, não adquirindo em muitos casos as habilidades cognitivas normais.

A Tabela I mostra os principais achados clínico-laboratoriais que devem levar à suspeita de um EIM de intoxicação ou de deficiência energética (erros inatos devidos à alteração do metabolismo de moléculas pequenas). Pode-se observar que os sintomas predominantes são neurológicos, sugerindo que este tecido é mais suscetível aos metabólitos acumulados nestas doenças.

Tabela I

Principais manifestações clínicas dos EIM de moléculas pequenas:

Neonato
Vômitos
Recusa alimentar
Hipotonia/hipertonia
Letargia, coma intermitente
Convulsões de causa desconhecida
Mioclonias
Miopatia/cardiomiopatia
Taquipnéia/apnéia
Dismorfismo
Odor peculiar na urina ou no paciente
Macrocefalia
Criança com até 10 anos de idade
Intolerância alimentar
Atraso no desenvolvimento físico e psicomotor
Ataxia, hipotonia, coreoatetose, paraparesia espástica, marcha anormal
Microcefalia/macrocefalia, distúrbio de comportamento
Hepatomegalia/hepatopatia, pancreatite, urolitíase, disfunção tubular renal
Deslocamento de cristalino e atrofia óptica
Alterações esqueléticas
Alopecia, alterações pigmentares na pele e cabelos

Odor peculiar na urina ou no paciente
Doença aguda precipitada por estresse (infecção, cirurgia ou indiscrição alimentar)
Adolescente até a fase juvenil
Retardo mental, estupor ou ataxia episódica, sintomas neuropsiquiátricos, letargia, coma
Oclusão vascular prematura
Hepatomegalia, urolitíase
Deslocamento do cristalino, retinite pigmentar
Alterações esqueléticas
Odor peculiar
Doença aguda precipitada por estresse (infecção, cirurgia ou indiscrição alimentar)

Fonte: baseada em SCRIVER *et al.*, 2001

Por outro lado, os EIM de moléculas complexas ou de organelas (doenças lisossômicas de depósito e peroxissomais) manifestam-se na sua quase totalidade de uma forma crônica e progressiva, atingindo tecidos e órgãos (fígado, baço, medula óssea e encéfalo) em que os substratos (glicogênio, lipídios complexos e mucopolissacarídeos) que não podem ser degradados ali se depositam. É comum encontrar nesses pacientes dismorfias e sinais clínicos específicos (hepatomegalia, esplenomegalia, leucodistrofia, etc.). A doença geralmente se manifesta após os primeiros meses ou anos de vida e é comum o afetado perder as habilidades motoras e cognitivas que já tinham sido adquiridas. Os exames histopatológicos nos afetados por várias dessas doenças são bastante informativos (presença de glicogênio no fígado nas glicogenoses, de lipídios específicos em vários tecidos nas lipidoses, etc.). O tratamento dessas

doenças, no entanto, é ainda experimental, sendo que a reposição enzimática tem tido sucesso em várias delas recentemente (SCRIVER *et al.*, 2001; HUGHES *et al.*, 2007; CHOI *et al.*, 2008; GRABOWSKI, 2008; ORTIZ *et al.*, 2008; SIMON *et al.*, 2008; VEDDER *et al.*, 2008).

I.1.2. Acidúrias Orgânicas

Acidúrias orgânicas são doenças metabólicas hereditárias caracterizadas pelo acúmulo tecidual e excreção urinária aumentada de ácidos orgânicos produzidos no metabolismo intermediário (SCRIVER *et al.*, 2001).

I.1.2.1. Acidúrias orgânicas de cadeia ramificada

As acidúrias orgânicas de cadeia ramificada são um grupo de distúrbios resultantes de uma anormalidade hereditária de enzimas específicas que envolvem o catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada, ácidos graxos de cadeia ímpar, entre outros compostos. Dentre elas está a deficiência da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta/ramificada (SBCAD) (SCRIVER *et al.*, 2001).

I.1.2.2. Deficiência da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta/ramificada (SBCAD)

A deficiência da desidrogenase de acilas-CoA de cadeia curta/ramificada (SBCAD) (OMIM 600301/610006) é uma acidúria orgânica de herança autossômica recessiva recentemente relatada que afeta o catabolismo da isoleucina. A SBCAD é uma enzima mitocondrial homotetramérica que catalisa a desidrogenação do 2-metilbutiril-CoA formando tigilil-CoA (Figura 1). O gene da SBCAD consiste de 11 éxons e está localizado no cromossomo 10q25-26, codificando um precursor contendo 431 aminoácidos, o qual gera uma proteína madura de 399 aminoácidos (ROZEN *et al.*, 1994; ANDRESEN *et al.*, 2000).

Devido ao defeito enzimático, os pacientes apresentam o acúmulo de ácido 2-metilbutírico (2MB) e da 2-metilbutirilglicina (2MBG), além de 2-metilbutirilcarnitina, nos tecidos e líquidos biológicos. A formação de 2MBG ocorre a partir da transesterificação do 2MB com glicina pela enzima acil-CoA glicina *N*-aciltransferase e esse metabólito pode alcançar níveis de até 100 µg / mg de creatinina na urina de pacientes (MATERN *et al.*, 2003). Em situações onde há proteólise acentuada, como jejum e situações de estresse metabólico (infecções, cirurgia, etc.) (EATON *et al.*, 1996), é importante salientar que ocorre um aumento dramático dos níveis plasmáticos de 2MB e 2MBG.

1.1.2.2.1. Sintomas e achados neuropatológicos

Os sintomas dessa doença incluem retardo mental, convulsões, letargia, hipotonia e retardo no desenvolvimento motor com atrofia muscular. Por outro lado, alguns pacientes permanecem assintomáticos durante toda a vida. Dentre os achados laboratoriais ocorrem hipoglicemia e acidose metabólica (SASS *et al.*, 2008; ALFARDAN *et al.*, 2010). Já em ressonância magnética é evidenciado dano cortical, anormalidades na substância branca e cinzenta (GIBSON *et al.*, 2000; MADSEN *et al.*, 2006; SASS *et al.*, 2008).

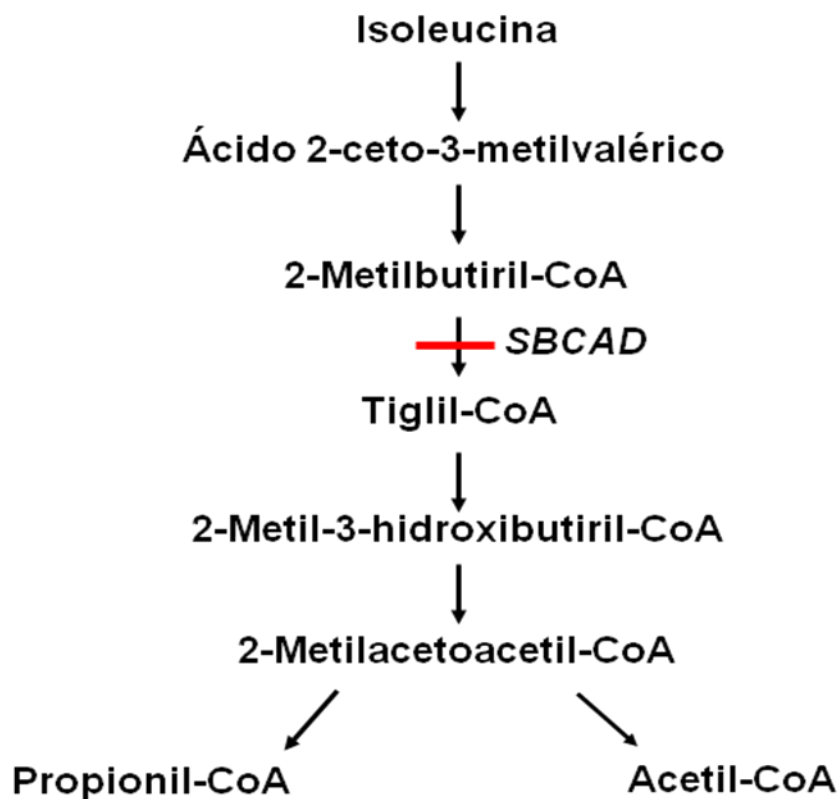


Figura 1. Rota do catabolismo da L-isoleucina com bloqueio da enzima desidrogenase de acilas-CoA de cadeia curta/ramificada (SBCAD).

1.1.2.2.2. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da deficiência da SBCAD é realizado a partir da análise de ácidos orgânicos e acil-glicinas na urina e das acil-carnitinas no plasma. A análise mutacional também é feita para a confirmação do diagnóstico. Com relação ao tratamento, os pacientes devem evitar situações de jejum e seguir uma dieta com restrição proteica e suplementada com carnitina (KORMAN *et al.*, 2006; KANAVIN *et al.*, 2007; ALFARDAN *et al.*, 2010).

1.1.2.2.3. Fisiopatologia

Apesar de esse distúrbio ser caracterizado por sintomas neurológicos severos, a patogênese do dano cerebral dessa doença é praticamente desconhecida. Também tem sido

sugerido que os metabólitos acumulados nos tecidos e líquidos biológicos de pacientes acometidos pela deficiência da SBCAD são potencialmente neurotóxicos, especialmente durante as crises de descompensação metabólica, onde as concentrações desses compostos aumentam dramaticamente. Contudo, os mecanismos pelos quais esses compostos poderiam levar aos sintomas característicos dessas desordens ainda não foram desvendados.

I.1.3. Radicais livres

Radicaís livres são moléculas ou átomos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e têm a capacidade de existir de forma independente (SOUTHORN e POWIS, 1988; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O desemparelhamento de elétrons, situação energeticamente instável, é o que confere alta reatividade a essas espécies. Os radicaís livres podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical. Radicaís podem também ser formados em um processo de fissão homolítica, no qual uma ligação covalente é quebrada e cada elétron do par compartilhado permanece com cada um dos átomos envolvidos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Quando um radical livre reage com um composto não-radical, outro radical livre pode ser formado; assim, a presença de um único radical pode iniciar uma sequência de reações em cadeia de transferência de elétrons (redox) (MAXWELL, 1995). Nas reações em cadeia induzidas pelos radicaís livres, um radical reativo leva à formação de um produto que também é um radical livre e que, por sua vez, reage produzindo um terceiro radical.

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, 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 hidroxila (OH^{\bullet}), e também o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (BOVERIS e CHANGE, 1973).

O termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do O_2 ($O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet}), mas também alguns não-radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio *singlet* (1O_2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) as principais representantes.

1.1.3.1. Mecanismos de dano celular induzido por radicais livres

As ERO e ERN ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos do organismo. Fisiologicamente essas espécies reativas apresentam diversas funções (BERGENDI *et al.*, 1999). Assim, um aumento da liberação local de radicais livres pode ser benéfico, como é o caso da liberação de espécies tóxicas oxidantes pelos neutrófilos, que podem atuar na defesa do hospedeiro contra uma infecção (DELANTY e DICHTER, 1998). Participam ainda de processos de sinalização celular e também estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas (WARD e PETERS, 1995; VEAL e DAY, 2011).

Por outro lado, quando formadas em excesso, essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídios e DNA (MAXWELL, 1995). Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, os radicais livres podem promover lipoperoxidação, alterando membranas celulares e ainda gerando produtos tóxicos durante esse processo, tais como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal

(HNE); causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade; reagir com proteínas, levando à sua inativação e consequente alteração de sua função; e também reagir com o DNA e RNA, levando a mutações somáticas e a distúrbios de transcrição (DELANTY e DICHTER, 1998), entre outros efeitos.

1.1.3.1.1. Lipoperoxidação

Antes de ser vista como um mecanismo de dano oxidativo, a lipoperoxidação deve ser considerada como um processo fisiológico contínuo que ocorre normalmente nas membranas celulares. Além de ser um fator de renovação da membrana, este processo é essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose. No entanto, por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo. Assim, quando a produção de espécies reativas aumentar além da capacidade de detoxificação, esse processo será exacerbado, e com isso, a lipoperoxidação poderá acarretar profundas alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Isso irá causar perda de seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos como o MDA e o HNE, entre outros eventos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Sob pH fisiológico, o MDA ataca proteínas e bases do DNA, causando lesões mutagênicas (DRAPER e HADLEY, 1990). O HNE pode provocar dano mitocondrial, inibição de síntese protéica e de DNA e induz atividade quimiotóxica ou lise celular e morte (ESTERBAUER *et al.*, 1991). O HNE parece ser particularmente citotóxico a células neurais (KARLHUBER *et al.*, 1997; MARK *et al.*, 1997; KELLER *et al.*, 1999). Nesse contexto, a formação de HNE precede a morte neuronal (ONG *et al.*, 2000) e concentrações desse produto

lipídico aumentadas são encontradas em tecido cerebral de pacientes afetados por diversas doenças neurodegenerativas (JENNER, 2003). Por lesar proteínas de membranas, esses produtos de lipoperoxidação podem também inibir a atividade de importantes enzimas de membranas, como Ca^{2+} -ATPase, glicerol-3-fosfato aciltransferase, glicose-6-fosfatase e Na^+, K^+ -ATPase, e também canais de potássio (DUPRAT *et al.*, 1995; McCONNELL *et al.*, 1999).

A lipoperoxidação é representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A iniciação é causada pelo ataque a um lipídio de membrana por parte de qualquer espécie que tenha reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$). Nesse contexto, radicais hidroxila podem prontamente iniciar a lipoperoxidação. Já que o átomo de hidrogênio tem apenas um elétron, a abstração de H^\bullet de um grupo metileno deixa um elétron desemparelhado no carbono ($-\bullet\text{CH}-$). Esse radical formado é geralmente estabilizado por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. O destino mais provável desse radical é reagir com o O_2 , formando um radical peroxila (ROO^\bullet). Os radicais peroxila, por sua vez, são capazes de abstrair um próton de outra molécula lipídica, sendo esta fase conhecida como a fase de propagação. O radical de carbono formado pode reagir com o O_2 para formar outro radical peroxila, e assim sucessivamente. A abstração de um hidrogênio de outro lipídio por parte do radical peroxila gerará um hidroperóxido lipídico (LOOH). O término da reação poderá ocorrer quando dois radicais produzidos nas etapas anteriores reagirem entre si, formando um produto estável (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007a).

I.1.4. Defesas antioxidantes

Antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que reduzem a formação de radicais livres ou reagem com os mesmos, neutralizando-os. A célula pode se proteger contra o dano oxidativo através de antioxidantes não-enzimáticos e enzimáticos.

Embora diferindo na composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo e compreendem agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), entre outras; proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo), ao se ligarem aos mesmos como as transferrinas; proteínas que protegem biomoléculas de danos (incluindo dano oxidativo) por outros mecanismos; agentes de baixo peso molecular que aprisionam ERO e ERN, como glutaciona (GSH), α -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina.

I.1.4.1. Defesas antioxidantes não-enzimáticas

As defesas antioxidantes não-enzimáticas podem ser separadas em dois grandes grupos: agentes hidrossolúveis e lipossolúveis. Exemplos do primeiro grupo incluem GSH, ácido ascórbico, ácido úrico, melatonina (MEL), os cofatores selênio e coenzima Q10 e proteínas plasmáticas. O tripeptídeo GSH é um dos mais efetivos e abundantes antioxidantes contra EROs, particularmente no cérebro onde as concentrações alcançam 1-10 mmol/L (BAST, 1993), sendo importante na manutenção do equilíbrio redox na célula.

I.1.4.2. Defesas antioxidantes enzimáticas

A atividade de enzimas antioxidantes também é importante para a detoxificação de radicais livres. Exemplos desses são as izoenzimas da SOD contendo cobre e zinco (Cu, Zn-SOD) ou manganês (Mn-SOD), a CAT, a GPx e a glutathiona redutase (GRd). Qualquer desequilíbrio nesse sistema pode resultar em um aumento de radicais livres derivados do oxigênio. As isoformas Cu, Zn-SOD e Mn-SOD estão presentes no citosol e mitocôndria, e juntamente com a GSH, representam a linha de defesa mais importante contra a toxicidade do $O_2^{\bullet-}$. Isoformas da SOD geram H_2O_2 , o qual é removido pela atividade da GPx combinada com GSH ou GRd, ou pela CAT (CHANCE *et al.*, 1979; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007b), ou adicionalmente por outras peroxidases (CHAE *et al.*, 1999).

I.1.5. Estresse oxidativo

Espécies reativas são necessárias para a função normal da célula, servindo como moléculas de sinalização para importantes respostas fisiológicas. Elas são continuamente produzidas e, após desempenhar suas funções, são neutralizadas por sistemas de defesa antioxidante. No entanto, quando produzidas em altas concentrações ou quando as defesas antioxidantes estão deficientes sob certas condições patológicas, elas podem causar dano celular.

O rompimento entre o equilíbrio pró-oxidante e antioxidante é descrito como estresse oxidativo e pode representar um mecanismo fundamental de doenças humanas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c; SIES, 1985). Assim, o termo “Estresse Oxidativo” é usado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis. Pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes

quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a combinação de quaisquer desses fatores (HALLIWELL, 2001).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular. Quando ocorre adaptação, as células podem geralmente tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em ativação da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço oxidante/antioxidante. Apesar disso, nem sempre o estresse oxidativo precisa envolver defesas antioxidantes aumentadas.

Em caso de dano celular, o estresse oxidativo pode danificar todos os alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c). Pode haver lipoperoxidação, cujos produtos (MDA e HNE, entre outros) são altamente neurotóxicos, e um dano oxidativo tanto às proteínas, inibindo a atividade de diversas enzimas e alterando a função celular, quanto ao DNA, causando alteração de bases púricas e pirimídicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c). Em certas situações, o dano celular pode ser reversível: a célula entra em *steady state* alterado temporário ou prolongado que não leva à morte celular.

A morte celular pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose. Na morte celular por necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. Pode haver a liberação de antioxidantes, como a CAT e a GSH, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e proteínas do grupo heme, agentes esses que podem afetar as células adjacentes, podendo até mesmo impor a elas um estresse oxidativo. Já na apoptose, o mecanismo intrínseco de morte celular é ativado, e não há a liberação do conteúdo celular. A morte celular por apoptose pode ser acelerada em certas doenças, como as desordens neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c).

I.1.6. Suscetibilidade cerebral ao dano oxidativo

O cérebro é altamente dependente de energia para o seu funcionamento normal e a mitocôndria é a principal organela responsável pela produção dessa energia. Para a produção eficiente de energia na forma de ATP, a mitocôndria possui uma alta demanda por oxigênio, já que utiliza uma grande quantidade de O_2 em uma massa de tecido relativamente pequena. Assim, quando ocorre uma disfunção mitocondrial por diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória com um consequente prejuízo no transporte de elétrons, acontece um aumento na geração de radicais livres potencialmente danosos à célula.

A presença de membranas celulares ricas em ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada (PUFA) que são altamente sensíveis ao ataque de radicais livres é outro fator que contribui para a vulnerabilidade cerebral ao estresse oxidativo, pois a oxidação dos PUFA causa peroxidação lipídica (reações em cadeia sobre lipídios) e alterações nas membranas celulares. Além disso, o alto conteúdo de ferro, o qual favorece a lipoperoxidação e autooxidação de neurotransmissores através do OH^\bullet formado na reação de Fenton (ZALESKA e FLOYD, 1985), a considerável quantidade de microglia, macrófagos residentes do sistema nervoso que podem produzir $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , a modesta defesa antioxidante, sendo os níveis de catalase particularmente baixos em muitas regiões cerebrais (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1996; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c), aumentam a suscetibilidade do cérebro ao dano causado por radicais livres.

I.1.7. Estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas

Numerosas evidências sugerem que os radicais livres e o estresse oxidativo estão envolvidos na patogênese dos danos neurológicos de várias doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica. Como medida de parâmetros de estresse oxidativo, existe um considerável número de casos onde se relatou aumento nos níveis de MDA e HNE no cérebro de pacientes, além de produtos da oxidação proteica, como grupos carbonil e 3-nitrotirosina, e também produtos que resultam da oxidação de DNA, bem como concentrações reduzidas dos antioxidantes não-enzimáticos GSH e ácido ascórbico e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx (JENNER e OLANOW 1996; LIU *et al.*, 1999; PERRY *et al.*, 2003).

Estudos demonstraram uma diminuição na atividade do complexo I da cadeia respiratória em cérebros *postmortem* de pacientes portadores de doença de Parkinson. Essa inibição do complexo I pode acarretar 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 as disfunções mitocondriais formem um ciclo vicioso na doença de Parkinson (SCHAPIRA *et al.*, 1989, 1990a,b; JANETSKY *et al.*, 1994; GU *et al.*, 1996).

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 β -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-hidroxil-

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 *et al.*, 1999; NOUROOZ-ZADEH *et al.*, 1999; LOVELL *et al.*, 2000).

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. Objetivo geral

Tendo em vista o envolvimento de radicais livres na patogenia de diversas doenças neurodegenerativas, e considerando que pacientes afetados por esta doença apresentam acúmulo de 2MB e 2MBG nos tecidos e líquidos biológicos, o presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos *in vitro* desses metabólitos sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens, visando uma melhor compreensão dos mecanismos neurotóxicos envolvidos no dano cerebral encontrado na deficiência da SBCAD.

I.2.2. Objetivos específicos

- Investigar os efeitos *in vitro* do 2MB e da 2MBG sobre o dano oxidativo lipídico, medido através dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), em córtex cerebral de ratos jovens.
- Investigar os efeitos *in vitro* do 2MB e da 2MBG sobre o dano oxidativo proteico, medido através da formação de carbonilas, em córtex cerebral de ratos jovens.
- Investigar os efeitos *in vitro* do 2MB e da 2MBG sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas, medidas pelas concentrações de glutathiona reduzida (GSH) e oxidação de grupamentos sulfidrilas, em córtex cerebral de ratos jovens.
- Investigar os efeitos do 2MB e da 2MBG sobre a oxidação direta de grupos tióis de uma solução comercial de GSH na ausência de amostra.

PARTE II

Artigo científico

Capítulo I

2-Methylbutyrylglycine induces lipid oxidative damage and decreases the antioxidant defenses in rat brain

Lisiane Aurélio Knebel¹, Ângela Zanatta¹, Anelise Miotti Tonin¹, Mateus Grings¹, Leonardo de Moura Alvorcem¹, Moacir Wajner^{1,2} and Guilhian Leipnitz¹.

Artigo científico submetido para publicação no periódico

Brain Research

2-Methylbutyrylglycine induces lipid oxidative damage and decreases the antioxidant defenses in rat brain

Lisiane Aurélio Knebel¹, Ângela Zanatta¹, Anelise Miotti Tonin¹, Mateus Grings¹,
Leonardo de Moura Alvorcem¹, Moacir Wajner^{1,2} and Guilhian Leipnitz¹.

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

²Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding Author: Guilhian Leipnitz

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 3308-5560, fax: +55 51 3308-5535, e-mail: guilhian@ufrgs.br

Abstract

Short/branched chain acyl-CoA dehydrogenase (SBCAD) deficiency is an autosomal recessive disorder of isoleucine metabolism biochemically characterized by accumulation of 2-methylbutyrylglycine (2MBG) and 2-methylbutyric acid (2MB). Affected patients present predominantly neurological symptoms, whose pathophysiology is not yet established. In the present study, we investigated the *in vitro* effects of 2MBG and 2MB on important parameters of oxidative stress in cerebral cortex of young rats. Our results show that 2MBG increased thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS), indicating an increase of lipid oxidation. 2MBG also induced sulfhydryl oxidation and decreased glutathione (GSH), indicating a reduction of nonenzymatic brain antioxidant defenses. In contrast, 2MB did not alter any of these parameters and 2MBG and 2MB did not affect carbonyl formation (protein damage). In addition, 2MBG-induced increase of TBA-RS levels and decrease of GSH were prevented by free radical scavengers, implying that reactive species were involved in these effects. Furthermore, the decrease of GSH levels caused by 2MBG was not due to a direct oxidative action, since this metabolite did not alter sulfhydryl content from a commercial solution of GSH. Finally, since nitric oxide production was not altered by 2MBG and 2MB, it is presumed that reactive oxygen species possibly underlay 2MBG effects. The present data show that 2MBG induces lipid oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in rat brain. Therefore, it may be postulated that oxidative stress induced by 2MBG is involved, at least in part, in the pathophysiology of the brain damage found in SBCAD deficiency.

Keywords: 2-methylbutyrylglycine, 2-methylbutyric acid, oxidative stress, cerebral cortex.

Abbreviations: 2,4-Dinitrophenylhydrazine, DNPH; 2-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), DTNB; 2-methylbutyrylglycine, 2MBG; 2-methylbutyric acid, 2MB; Analysis of variance, ANOVA; glutathione, GSH; Melatonin, MEL; N-Ethylmaleimide, NEM; Short/branched chain acyl-CoA dehydrogenase, SBCAD; Thiobarbituric acid-reactive substances, TBA-RS; Trolox, TRO; Statistical Package for the Social Sciences, SPSS.

1. Introduction

Short/branched chain acyl-CoA dehydrogenase (SBCAD; OMIM 600301/610006) deficiency, also known as 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency or 2-methylbutyrylglycinuria, is an autosomal recessive disorder recently reported that affects isoleucine catabolism. SBCAD is a homotetrameric mitochondrial enzyme that catalyzes the dehydrogenation of 2-methylbutyryl-CoA to tiglyl-CoA (Rozen et al. 1994; Andresen et al. 2000). The disorder is biochemically characterized by tissue accumulation and high urinary excretion of 2-methylbutyrylglycine (2MBG) and 2-methylbutyric acid (2MB). 2MBG generation occurs from the transesterification of 2MB with glycine by the enzyme acyl-CoA glycine *N*-acyltransferase, reaching levels of up to 100 µg / mg creatinine in the urine of affected patients (Matern et al. 2003).

Patients affected by SBCAD deficiency present hypoglycemia, metabolic acidosis, mental retardation, seizures, lethargy, hypotonia and delayed motor development with muscular atrophy (Sass et al. 2008; Alfardan et al. 2010). However, many patients may be asymptomatic for long periods, even life long, and only manifest symptoms when under stress caused by intercurrent illness (Andresen et al. 2000; Alfardan et al. 2010). The neuroimaging findings evidence cortical damage, white and gray matter abnormalities, as well as global hypoxia (Gibson et al. 2000; Madsen et al. 2006; Sass et al. 2008).

Although SBCAD deficiency is characterized by neurological symptoms, the pathogenesis of brain damage of this disease is virtually unknown. It has been suggested that the accumulating metabolites (2MBG and 2MB) are potentially neurotoxic, especially during crises of metabolic decompensation, where the

concentrations of these compounds increase dramatically (Andresen et al. 2000; Sweetman and Williams 2001; Sass et al. 2008). However, the mechanisms by which these compounds could lead to the neurological symptoms and abnormalities characteristic of this disorder have not yet been elucidated. Therefore, in the present study we investigated the *in vitro* effects of 2MBG and 2MB on important parameters of oxidative stress, namely thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) levels, carbonyl formation, sulfhydryl oxidation, glutathione (GSH) levels and nitric oxide production in cerebral cortex of young rats.

2. Results

2.1. 2MBG induces lipid peroxidation

First, we investigated the *in vitro* effects of 2MBG and 2MB on TBA-RS levels in cerebral cortex of 30-day-old rats. Figure 1 shows that 2MBG [$F_{(5,24)} = 38.237$; $P < 0.001$], but not 2MB, significantly increased TBA-RS levels in a dose-dependent manner [$\beta = 0.918$; $P < 0.001$] at 0.5 mM and higher concentrations (up to 55 %) in brain supernatants. We then evaluated the role of antioxidants on 2MBG-induced lipid peroxidation. Cortical supernatants were co-incubated with the antioxidants MEL (750 μ M), GSH (750 μ M) or TRO (α -tocopherol; 7.5 μ M) and 5.0 mM 2MBG. Our results show that all antioxidants were able to fully prevent MBG-induced TBA-RS levels increase (MEL: [$F_{(3,20)} = 21.674$; $P < 0.001$]; GSH: [$F_{(3,20)} = 20.632$; $P < 0.001$]; TRO: [$F_{(4,25)} = 31.777$; $P < 0.001$]) (Figure 2).

2.2. 2MBG and 2MB do not cause protein oxidation

We also observed that 2MBG and 2MB did not significantly increase carbonyl formation (Figure 3), implying that protein oxidative damage was not elicited by these compounds.

2.3. 2MBG diminishes nonenzymatic antioxidant defenses

Then, the nonenzymatic antioxidant defenses were examined by assessing GSH levels and sulfhydryl oxidation. Figure 4 shows that 2MBG, but not 2MB, significantly diminished GSH levels in cerebral cortex [$F_{(5,24)} = 15.589$; $P < 0.001$] in a dose-dependent manner [$\beta = -0.832$; $P < 0.001$]. We also investigated whether MEL (750 μM) and TRO (7.5 μM) could prevent 2MBG-induced decrease of GSH content in cerebral cortex and verified that both antioxidants totally prevented 2MBG-induced decrease of GSH (MEL: [$F_{(2,15)} = 6.427$; $P < 0.01$]; TRO: [$F_{(2,15)} = 30.175$; $P < 0.001$]) (Figure 5).

The next set of experiments was carried out to evaluate the *in vitro* effects of 2MB and 2MBG on sulfhydryl oxidation. We verified that 2MBG, but not 2MB, significantly increased sulfhydryl oxidation (up to 19%) [$F_{(5,30)} = 5.358$; $P < 0.001$] (Figure 6).

2.4. 2MBG and 2MB do not behave as direct oxidants

In order to evaluate whether 2MBG and 2MB could directly affect thiol groups in a cell free medium, we exposed a commercial GSH solution (200 μM) to 5.0 mM 2MBG or 2MB for 1 h in the absence of brain supernatants. Figure 7 shows that 2MBG and

2MB did not modify GSH levels, whereas N-ethylmaleimide (NEM, 150 μ M) (positive control) markedly oxidized GSH. The data clearly indicate that 2MBG and 2MB do not behave as direct oxidants.

2.5. 2MBG and 2MB do not induce nitric oxide production

Finally, we assessed the effects of 2MBG and 2MB on nitrate and nitrite production. Table 1 demonstrates that 2MBG and 2MB did not induce nitrogen reactive species generation in cortical supernatants, suggesting that the pro-oxidant effects of 2MBG were mainly due to reactive oxygen species.

3. Discussion

Although patients affected by SBCAD deficiency present neurological dysfunction and cortical abnormalities, the pathogenesis of the brain damage in this disease is poorly known. Therefore, in the present study we investigated the *in vitro* effects of 2MBG and 2MB on important parameters of oxidative stress in rat cerebral cortex in order to clarify the pathophysiology of SBCAD deficiency.

We first observed that 2MBG, but not 2MB, 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 2MBG caused lipid peroxidation *in vitro*. We also observed that 2MBG-induced lipid oxidative damage was totally prevented by the free radical scavengers MEL, GSH and TRO, suggesting that 2MBG 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.

Next, we observed that 2MBG and 2MB did not change carbonyl formation, implying that protein oxidation was not elicited by these compounds. With regard to the antioxidant defense system, 2MBG markedly reduced the concentrations of GSH, the main naturally occurring antioxidant in brain and induced sulfhydryl oxidation. We also found that MEL and TRO totally prevented 2MBG-induced decrease of GSH, probably reflecting a role for the hydroxyl and peroxy radicals in these effects. This assumption is reinforced by the experiments showing that 2MBG was not able to directly oxidize thiol groups from a commercial solution of GSH, indicating that 2MBG reduces GSH levels via reactive species generation. Considering that endogenous GSH, the major naturally occurring tissue brain antioxidant, is used to evaluate the nonenzymatic antioxidant capacity of a tissue to prevent the damage associated to free radical processes, it can be presumed that the rat cortical nonenzymatic antioxidant defenses were compromised by 2MBG, possibly by the excessive production of free radicals elicited by this metabolite (Halliwell and Gutteridge 2007). It cannot be also ruled out that 2MBG-induced lipid oxidative damage may have occurred secondarily to the depleted cell antioxidant capacity (GSH depletion).

On the other hand, 2MBG and 2MB did not induce nitrogen reactive species formation, as determined by nitrates and nitrites generation, corroborating with our data demonstrating that the reactive oxygen species peroxy and hydroxyl were probably most elicited by 2MBG.

Since oxidative stress results from an imbalance between the total antioxidant defenses and the reactive species generated in a tissue, our present data strongly indicate that 2MBG, one of the major metabolites accumulating in SBCAD deficiency, induce oxidative stress in rat cerebral cortex, a deleterious cell condition (Halliwell and Gutteridge 2007). At this point, it should be emphasized that the brain has low cerebral antioxidant defenses compared with other tissues (Halliwell and Gutteridge 2007), a fact that makes this tissue more vulnerable to increased reactive species.

We used cortical supernatants in our present study because cerebral cortex is affected in SBCAD deficiency and because these preparations are frequently used as model systems to evaluate important pro-oxidant and antioxidant parameters of oxidative stress (Cadenas et al. 1981; Gonzalez Flecha et al. 1991; Lores Arnaiz and Llesuy 1993; Llesuy et al. 1994; Evelson et al. 2001; Halliwell and Gutteridge 2007). 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 (Stocks et al. 1974; Cadenas et al. 1981; Llesuy et al. 1994; Evelson et al. 2001; Dresch et al. 2009).

At present it is difficult to assure the pathophysiological significance of our data since there is no information in the literature on the brain or CSF concentrations of 2MBG and 2MB in SBCAD deficiency. However, our present data indicate that oxidative stress is induced by 2MBG and it may represent an important mechanism causing brain damage in SBCAD deficiency. It is also presumed that 2MBG accumulates in the neural cells of the affected individuals, because SBCAD and other enzymes of amino acid

oxidation are expressed in rat and human brain (Willard et al. 1996; Kanavin et al. 2007).

In conclusion, to our knowledge, this is the first report showing that 2MBG that accumulates in SBCAD deficiency provokes lipid oxidative damage and diminishes the antioxidant defenses in the cerebral cortex. However, additional studies performed in intact neural cells and in animal models of SBCAD deficiency are required to confirm the role of oxidative stress in the pathophysiology of this disease. In case the *in vitro* effects detected in the present study are confirmed *in vivo* and also in tissues from affected patients, 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 may be considered as an adjuvant therapy for these patients, especially during metabolic crises.

4. Experimental Procedure

4.1. Animals and Reagents

Wistar male rats of 30 days of life obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, were used. The animals were maintained on a 12:12 h light / dark cycle (lights on 07.00–19.00 h) in air conditioned constant temperature (22 ± 1 °C) colony room, with free access to water and 20 % (w/w) protein commercial chow (SUPRA, Porto Alegre, RS, Brazil). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for animal research of the Federal University of Rio Grande do Sul,

Porto Alegre, Brazil, and followed the EC Directive 86/609/ECC and the Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication 85-23, revised 1996). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), except for 2MBG which was prepared by Dr. Ernesto Brunet (Universidad Autonoma, Madrid, Spain) with 99 % purity. 2MB and 2MBG solutions were prepared on the day of the experiments in the incubation medium used for each technique and pH was adjusted to 7.4. TBA-RS, carbonyl formation, sulfhydryl content and nitric oxide production were measured with a double-beam Hitachi U-2001 spectrophotometer, whereas GSH levels were measured in a Hitachi F-2000 fluorescence spectrophotometer.

4.2. Cerebral cortex preparation

On the day of the experiments the rats were sacrificed by decapitation without anaesthesia and the brain was rapidly excised on a Petri dish placed on ice and the blood and external vessels were carefully removed. The olfactory bulbs, pons, medulla and striatum were discarded, and the cerebral cortex was dissected, weighed and separately homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. The homogenates of the brain structure 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 cortical supernatants, corresponding to a suspension of mixed and preserved organelles, including mitochondria, were separated and incubated at 37 °C for 1 h with 2MBG or 2MB (0.1 - 5 mM). Controls did not contain the metabolites in the incubation medium. In some experiments, antioxidants were used

at the following concentrations: 750 μ M melatonin (MEL), 750 μ M GSH and 5.0 or 7.5 μ M trolox (TRO, soluble analogue of α -tocopherol). Immediately after incubation, aliquots were taken to measure biochemical parameters.

4.3. Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBA-RS)

TBA-RS was determined according to the method of Esterbauer and Cheeseman (1990). Briefly, 300 μ L of 10 % trichloroacetic acid were added to 150 μ L of pre-incubated cerebral cortex supernatants and centrifuged at 3000 *g* for 10 min. Three hundred microliters of the supernatants were transferred to a pyrex tube and incubated with 300 μ L of 0.67% TBA prepared in 7.1% sodium sulphate in 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.

4.4. 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 were treated with 400 μ 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 h. Samples were then precipitated with 600 μ 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 μ L of 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 $22,000 \times 10^6$ nmol / mL for aliphatic hydrazones and expressed as percentage of control.

4.5. Reduced glutathione (GSH) concentrations

GSH concentrations were measured according to Browne and Armstrong (1998). 30 μ L from the pre-treated supernatants were diluted with 70 μ L of 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 5 mM EDTA. This preparation was incubated with o-phthalaldehyde (1 mg / mL methanol) at room temperature during 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. Calibration curve was prepared with standard GSH (0.001–1 mM) and the concentrations were calculated as nmol / mg protein and represented as percentage of control.

4.6. 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 μ L of pre-treated supernatants were incubated at 37 °C for 1 h with MB or MBG. Then 980 μ L of PBS buffer, pH 7.4, and 30 μ L of 10 mM DTNB prepared in 0.2 M potassium

phosphate solution, pH 8.0, were 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 represented as percentage of control.

4.7. Nitric oxide production

Nitric oxide production was determined by measuring its derivatives nitrate (NO_3^-) and nitrite (NO_2^-) according to Miranda and colleagues (2001). Vanadium chloride (200 μL) was added to the tube containing 200 μL of 2MBG or 2MB pre-treated cerebral cortex supernatants for complete reduction of nitrate to nitrite. Then, 200 μL 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 (2.5–100 μM) and each curve point was subjected to the same treatment as supernatants. Nitric oxide production values were calculated as nmol / mg protein and represented as percentage of control.

4.8. Protein determination

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

4.9. Statistical analysis

Results are presented as mean \pm standard deviation. Assays were performed in duplicate or triplicate and the mean was used for statistical calculations. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post-hoc Duncan multiple range test when F was significant. Linear regression analysis was also used to test dose-dependent effects. Only significant F values are shown in the text. Differences between groups were considered 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.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq, PRONEX II, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS and FINEP research grant Rede Instituto Brasileiro de Neurociências (IBN-Net) # 01.06.0842-00, and INT-EN.

References

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.

Alfardan, J., Mohsen, A., Copeland, S., Ellison, J., Keppen-Davis, L., Rohrbach, M., Powell, B.R., Gillis, J., Matern, D., Kant, J., Vockley, J., 2010. Characterization of new ACADSB gene sequence mutations and clinical implications in patients with 2-methylbutyrylglycinuria identified by newborn screening. *Mol. Genet. Metab.* 100, 333-338.

Andresen, B.S., Christensen, E., Corydon, T.J., Bross, P., Pilgaard, B., Wanders, R.J.A., Ruiten, J.P., Simonsen, H., Winter, V., Knudsen, I., Schroeder, L.D., Gregersen, N., Skovby, F., 2000. Isolated 2-methylbutyrylglycinuria caused by short/branched-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of a new enzyme defect, resolution of its molecular basis, and evidence for distinct acil-CoA dehydrogenases in isoleucine and valine metabolism. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1095-1103.

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.

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 cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 261–266.

Gibson, K.M., Burlingame, T.G., Hogema, B., Jakobs, C., Schutgens, R.B.H., Millington, D., Roe, C.R., Roe, D.S., Sweetman, L., Steiner, R.D., Linck, L., Pohowalla, P., Sacks, M., Kiss, D., Rinaldo, P., Vockley, J., 2000. 2-Methylbutyryl-Coenzyme A dehydrogenase deficiency: a new inborn error of L-isoleucine metabolism. *Pediatr. Res.* 47, 830-833.

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. Free radicals in biology and medicine, In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death.* Oxford, Oxford University Press, pp. 187–267.

Kanavin, O.J., Woldseth, B., Jellum, E., Tvedt, B., Andresen, B.S., Stromme, P., 2007. 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency associated with autism and mental retardation: a case report. *J. Med. Case Reports* 1, 98.

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.

Madsen, P.P., Kibaek, M., Roca, R., Sachidanandam, R., Krainer, A.R., Christensen, Steiner, R.D., Gibson, K.M., Corydon, T.J., Knudsen, I., Wanders, R.J., Ruitter, J.P., Gregersen, N., Andresen, B.S., 2006. Short/branched-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency due to an IVS3+3A>G mutation that causes exon skipping. *Hum. Genet.* 118, 680-690.

Matern, D., He, M., Berry, S.A., Rinaldo, P., Whitley, C.B., Madsen, P.P., van Calcar, S.C., Lussky, R.C., Andresen, B.S., Wolff, J.A., Vockley, J., 2003. Prospective diagnosis of 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency in the Hmong population by newborn screening using tandem mass spectrometry. *Pediatrics* 112, 74-78.

Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 1994. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62–71.

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

Rozen, R., Vockley, J., Zhou, L., Milos, R., Willard, J., Fu, K., Vicanek, C., Low-Nang, L., Torban, E., Fournier, B., 1994. Isolation and expression of a cDNA encoding

the precursor for a novel member (ACADSB) of the acyl-CoA dehydrogenase gene family. *Genomics* 24, 280-287.

Sass, J.O., Ensenauer, R., Röschinger, W., Reich, H., Steuerwald, U., Schirmacher, O., Engel, K., Häberle, J., Andresen, B.S., Mégarbané, A., Lehnert, W., Zschocke, J., 2008. 2-Methylbutyryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: Functional and molecular studies on a defect in isoleucine catabolism. *Mol. Genet. Metab.* 93, 30-35.

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.

Sweetman, L., Williams, J.C., 2001. Branched chain organic acidurias, In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, McGraw-Hill, pp. 2144-2156.

Willard, J., Vicanek, C., Battaile, K.P., Veldhoven, P.P.V., Fauq, A.H., Rozen, R., Vockley, J., 1996. Cloning of a cDNA for Short/Branched Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase from Rat and Characterization of Its Tissue Expression and Substrate Specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* 331, 127-133.

Legends to figures

Figure 1. *In vitro* effects of 2-methylbutyrylglycine (2MBG) (A) and 2-methylbutyric acid (2MB) (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⁻¹] A: 1.18 \pm 0.19; B: 1.09 \pm 0.06). ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, compared to controls (Duncan multiple range test).

Figure 2. *In vitro* effects of the antioxidants melatonin (MEL; 750 μ M) (A), reduced glutathione (GSH; 750 μ M) (B) and trolox (TRO; 7.5 μ M) (C) on 5 mM 2-methylbutyrylglycine (2MBG)-induced increase of thiobarbituric-acid reactive substances (TBA-RS) in rat cerebral cortex. Values are means \pm standard deviation for four independent experiments performed in triplicate and expressed as percentage of controls (Controls [nmol.mg protein⁻¹] A: 0.65 \pm 0.11; B: 0.65 \pm 0.11; C: 0.90 \pm 0.20). ****P* < 0.001 compared to controls; ###*P* < 0.001 compared to 2MBG (Duncan multiple range test).

Figure 3. *In vitro* effects of 2-methylbutyrylglycine (2MBG) (A) and 2-methylbutyric acid (2MB) (B) on carbonyl formation 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⁻¹] A: 4.01 \pm 0.72; B: 2.88 \pm 0.59). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, compared to controls (Duncan multiple range test).

Figure 4. *In vitro* effects of 2-methylbutyrylglycine (2MBG) (A) and 2-methylbutyric acid (2MB) (B) on glutathione (GSH) concentrations 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⁻¹] A: 9.41 ± 1.32; B: 8.51 ± 1.33). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, compared to controls (Duncan multiple range test).

Figure 5. *In vitro* effects of the antioxidants melatonin (MEL; 750 μM) (A) and trolox (TRO; 5 μM) (B) on 5 mM 2-methylbutyrylglycine (2MBG)-induced decrease of glutathione (GSH) levels in rat cerebral cortex. Values are means ± standard deviation for four independent experiments performed in triplicate and are expressed as percentage of controls (Controls [nmol . mg protein⁻¹] A: 4.71 ± 0.84; B: 8.51 ± 1.33). ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, compared to controls; ##*P* < 0.01, compared to 2MBG (Duncan multiple range test).

Figure 6. *In vitro* effects of 2-methylbutyrylglycine (2MBG) (A) and 2-methylbutyric acid (2MB) (B) on sulfhydryl oxidation in rat cerebral cortex. Values are means ± standard deviation for six independent experiments performed in triplicate and expressed as percentage of controls (Controls [nmol.mg protein⁻¹] A: 79.4 ± 11.0; B: 50.6 ± 15.0). ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, compared to controls (Duncan multiple range test).

Figure 7. *In vitro* effects of 2-methylbutyrylglycine (2MBG) and 2-methylbutyric acid (2MB) on commercial reduced glutathione (GSH). Values are means ± standard deviation for three independent experiments performed in triplicate and are expressed as percentage of controls. GSH (200 μM) oxidation was measured in the absence of brain tissue. Control: 5805 ± 545 fluorescence units. ****P* < 0.001, compared to control (Duncan multiple range test). NEM – N-ethylmaleimide (positive control).

Figures:

Figure 1

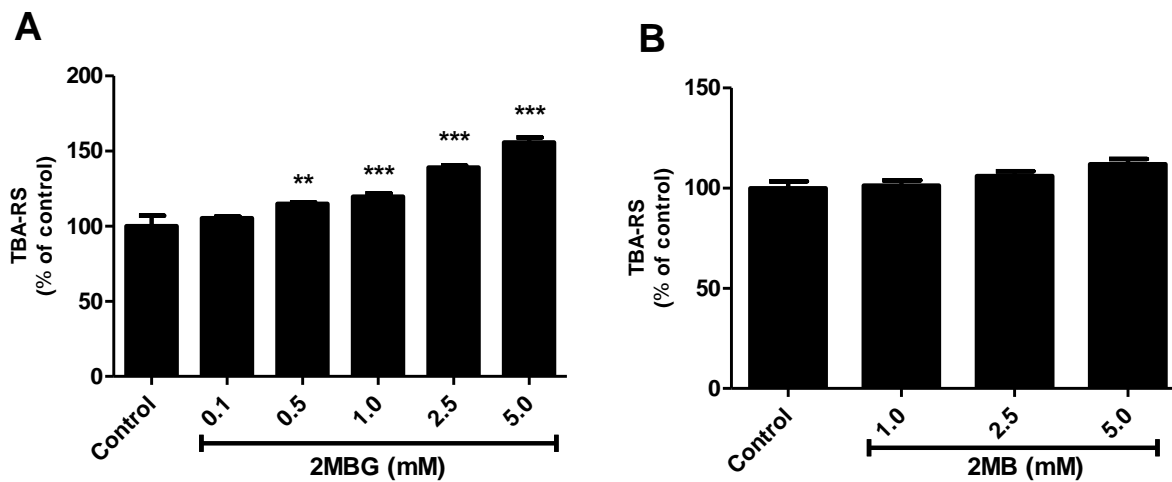


Figure 2

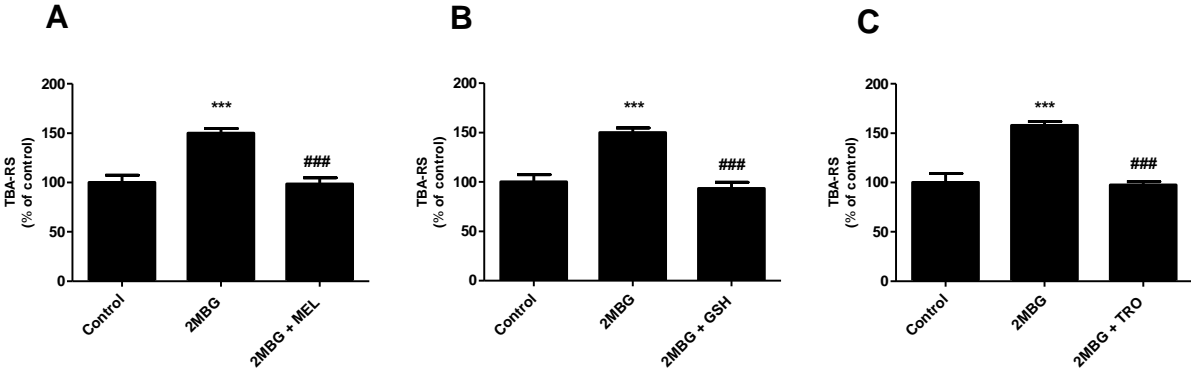


Figure 3

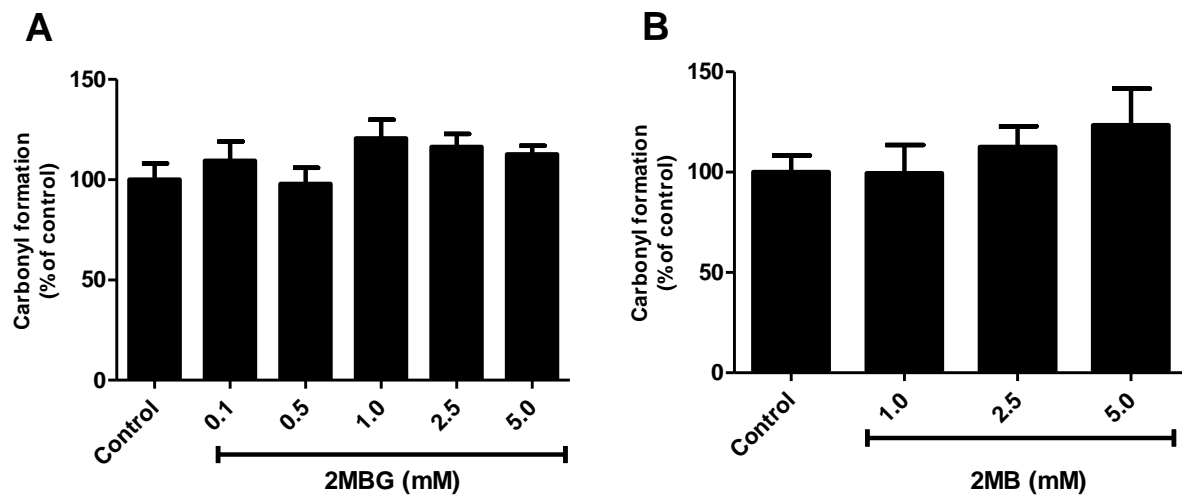


Figure 4

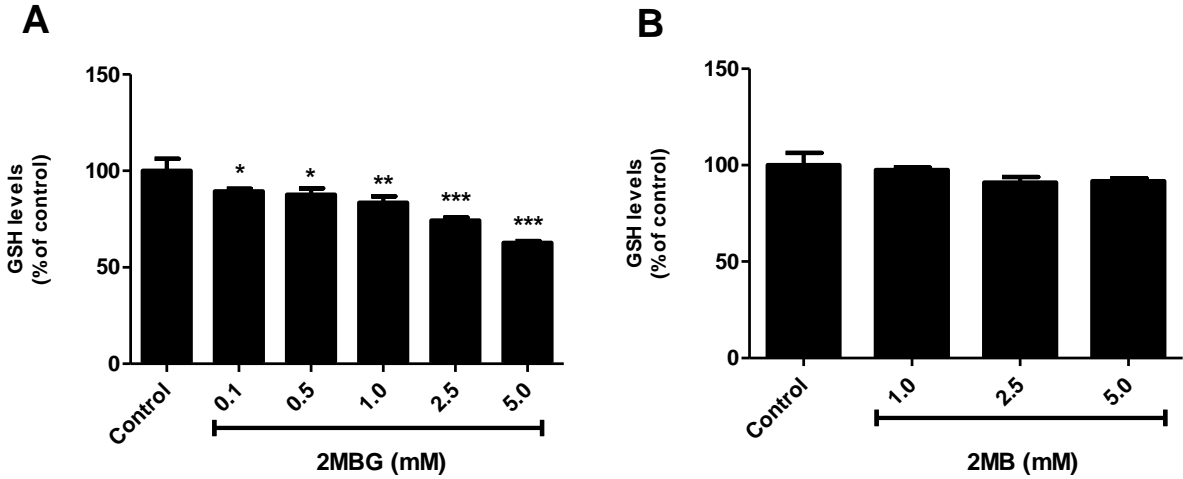


Figure 5

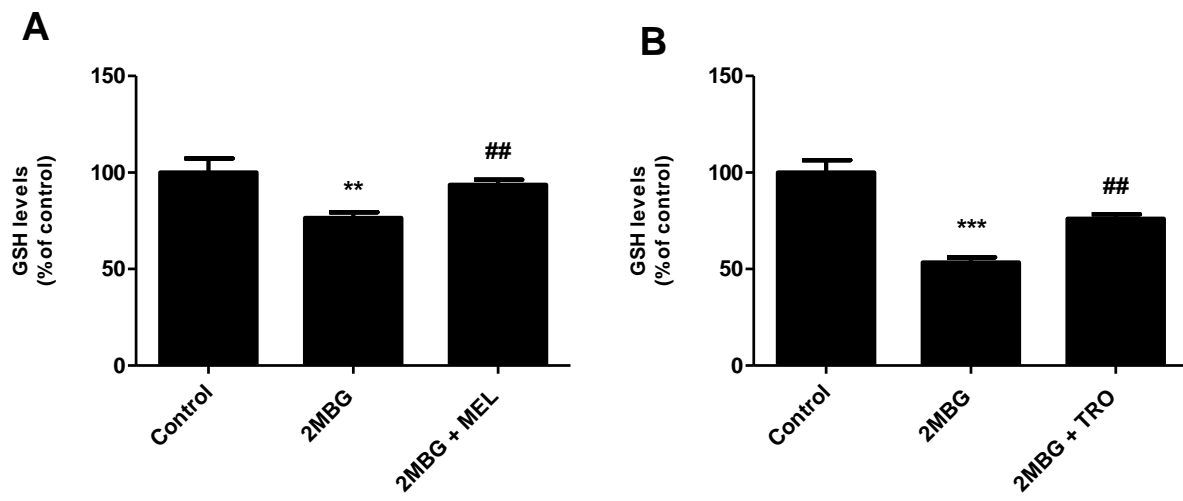


Figure 6

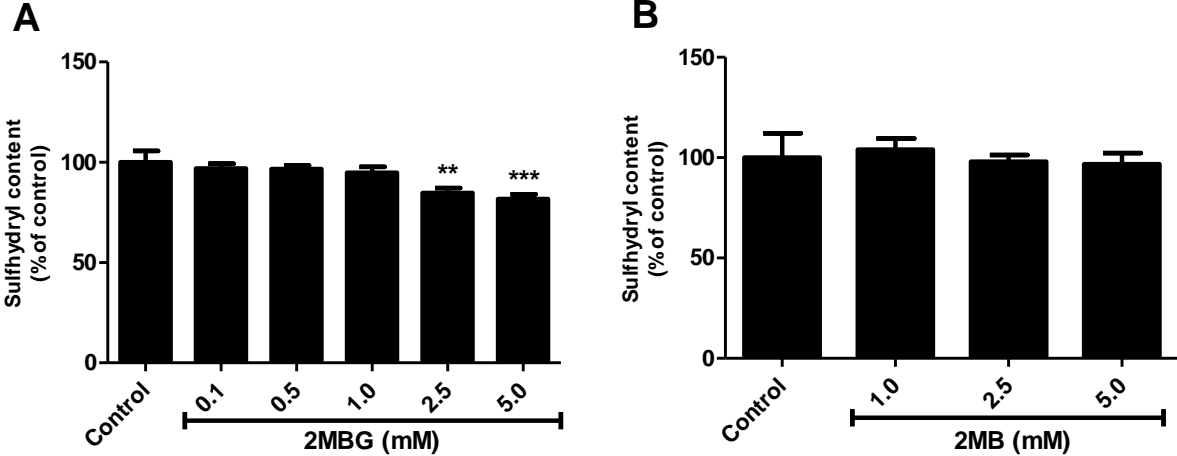


Figure 7

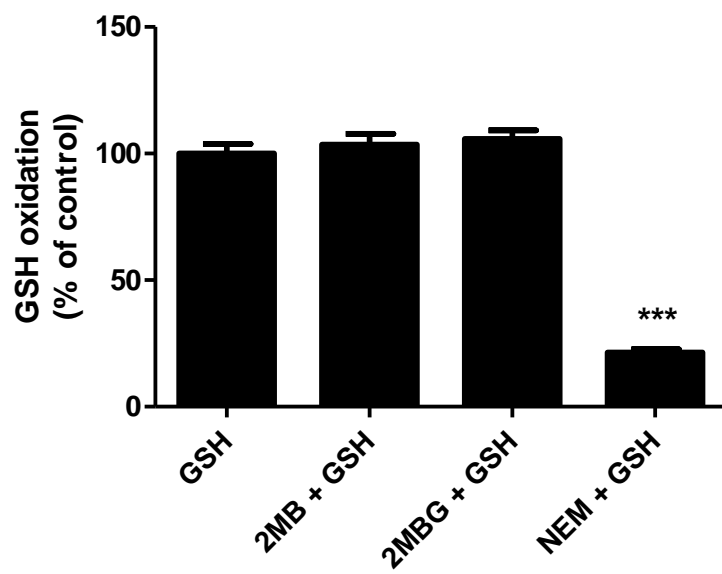


Table 1

Table 1. In vitro effect of 2-methylbutyrylglycine (2MBG) and 2-methylbutyric acid (2MB) on nitric oxide production in rat cerebral cortex supernatants

Nitric oxide production			
	Control	2.5 mM	5.0 mM
2MBG	100 ± 29.9	88.6 ± 26.2	101.6 ± 27.6
2MB	100 ± 0.26	115.6 ± 1.70	92.4 ± 0.30

Values are means ± standard deviation of five to six independent experiments performed in triplicate and expressed as percentage of controls (Controls [nmol / mg protein]: 2MBG: 2.99 ± 0.89; 2MB: 1.65 ± 0.26). No significant differences were detected (one-way ANOVA).

PARTE III

Discussão e conclusões

III.1. DISCUSSÃO

A deficiência da SBCAD é um erro inato do metabolismo de herança autossômica recessiva que afeta o catabolismo da isoleucina. Devido ao defeito enzimático, os pacientes apresentam acúmulo do 2MB e da 2MBG nos tecidos e líquidos biológicos (MATERN *et al.*, 2003).

Apesar de esse distúrbio ser caracterizado por sintomas neurológicos severos, tais como retardo mental, convulsões e letargia (SASS *et al.*, 2008; ALFARDAN *et al.*, 2010), a patogênese do dano cerebral dessa doença é praticamente desconhecida. Tem sido sugerido que os metabólitos acumulados são potencialmente neurotóxicos, especialmente durante as crises de descompensação metabólica, onde as concentrações desses compostos aumentam dramaticamente (KANAVIN *et al.*, 2007). Com o objetivo de esclarecer os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na deficiência da SBCAD que comprometem o sistema nervoso central dos pacientes afetados, o presente estudo avaliou o efeito destes metabólitos sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens.

Inicialmente, verificamos que a 2MBG, mas não o 2MB, aumentou significativamente os níveis de TBA-RS a partir da concentração de 0,5 mM. A medida de TBA-RS reflete a quantidade de MDA formado, um produto da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados de lipídios complexos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007a). O MDA é altamente tóxico, já que reage com proteínas causando alterações em resíduos de aminoácidos e formando ligações cruzadas intra e intermoleculares, bem como com o DNA provocando mutações (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c). Portanto, o aumento na medida desse parâmetro provocado pela 2MBG indica que este metabólito induz peroxidação lipídica *in vitro* em cérebro de ratos. Observamos ainda que a peroxidação lipídica causada pela 2MBG foi totalmente prevenida pelos

antioxidantes MEL, GSH e TRO, indicando o envolvimento dos radicais hidroxila e peroxila neste efeito, já que esses radicais são sequestrados com alta eficiência pelos antioxidantes utilizados.

A seguir, observamos que tanto o 2MB quando a 2MBG não alteraram a formação de grupamentos carbonilas, sugerindo que estes metabólitos não induzem oxidação proteica, já que grupos carbonilas (aldeídos e cetonas) são produzidos principalmente por oxidação de aminoácidos, por clivagem oxidativa ou então por reações com açúcares (DALLE-DONE *et al.*, 2003).

Com relação ao sistema de defesa antioxidante, foi observado que apenas a 2MBG, na concentração de 0,1 mM, reduziu os níveis de GSH, o principal antioxidante não-enzimático intracelular do cérebro, e induziu a oxidação de grupamentos sulfidrilas. Os antioxidantes MEL e TRO preveniram a redução dos níveis de GSH induzidos por 2MBG, refletindo o provável envolvimento dos radicais hidroxila e peroxila também nesse efeito. Ainda, tanto o 2MB quanto a 2MBG não foram capazes de oxidar uma solução comercial purificada de GSH na ausência de tecido cerebral, indicando que a 2MBG reduz as concentrações de GSH pela geração de espécies reativas. Considerando que a GSH endógena é utilizada para avaliar a capacidade antioxidante não-enzimática dos tecidos, pode-se presumir que as defesas antioxidantes do cérebro foram comprometidas pela 2MBG (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007b). Além disso, é concebível que o dano oxidativo a lipídios induzido por 2MBG ocorreu secundariamente à diminuição dos níveis de GSH, já que a adição de GSH nos experimentos de avaliação dos níveis de TBA-RS preveniu totalmente a peroxidação lipídica induzida por 2MBG.

Por outro lado, o 2MB e a 2MBG não induziram a formação de espécies reativas de nitrogênio, determinado pela geração de nitratos e nitritos. Esse resultado sugere que espécies

reativas de nitrogênio não estão envolvidas nos efeitos tóxicos exercidos pela 2MBG e reforça nossos achados que demonstraram que os radicais peroxila e hidroxila estão principalmente envolvidos no dano oxidativo induzido por 2MBG.

Uma vez que o estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes totais e as espécies reativas geradas em um tecido, nossos resultados indicam que a 2MBG induz estresse oxidativo em cérebro de ratos, uma condição deletéria à célula (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007c). Neste particular, deve ser enfatizado que o cérebro possui poucas defesas antioxidantes quando comparado com outros tecidos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1996), o que faz com que este tecido seja mais vulnerável ao aumento da produção de espécies reativas. De fato, o estresse oxidativo tem sido implicado na fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas comuns, tais como as doenças de Parkinson e de Alzheimer, bem como em epilepsia e na desmielinização (BOGDANOV et al., 2001; MÉNDEZ-ÁLVAREZ et al., 2001; KARELSON et al., 2001; BEHL & MOOSMANN, 2002a,b; ANDRESEN JK, 2004; STOY et al., 2005; BERG & YODIM, 2006; MANCUSO et al., 2006; MORAIS VA & DE STROOPER B, 2010).

É difícil estabelecer a importância fisiopatológica dos resultados aqui apresentados, visto que as concentrações cerebrais de 2MB e 2MBG ainda não estão estabelecidas. Contudo, é importante salientar que os efeitos exercidos pela 2MBG ocorreram com concentrações relativamente baixas (0,1 mM e concentrações maiores). Além disso, é possível que níveis mais elevados de 2MB e 2MBG no cérebro sejam alcançados durante crises de descompensação catabólica (jejum ou situações de estresse catabólico), que se caracterizam por intensa proteólise. Concluindo, relatamos pela primeira vez que a 2MBG, metabólito acumulado na deficiência da SBCAD, induz dano oxidativo em córtex cerebral de ratos, sugerindo que o acúmulo de

metabólitos com ações neurotóxicas pode estar envolvido na fisiopatologia do dano neurológico encontrado nos pacientes acometidos por essa doença. Por outro lado, nossos resultados devem ser interpretados com cautela, sendo necessários mais estudos focando na investigação dos efeitos *in vitro* do 2MB e da 2MBG, bem como o estudo de seus efeitos em outros modelos animais (modelos *in vivo*) e em células e/ou plasma de pacientes. A confirmação do possível envolvimento de espécies reativas no dano neurológico característico da deficiência da SBCAD também pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a prevenção e tratamento dos pacientes afetados pela mesma, tais como o uso de antioxidantes.

III.2. CONCLUSÕES

- A 2MBG, mas não o 2MB, induziu peroxidação lipídica em córtex cerebral de ratos, refletida pelo aumento dos níveis de TBA-RS.
- A indução de lipoperoxidação pela 2MBG foi totalmente prevenida por MEL, GSH e TRO, indicando o envolvimento de radicais hidroxila e peroxila neste efeito.
- O 2MB e a 2MBG não induziram dano oxidativo proteico em córtex cerebral de ratos, visto que estes metabólitos não alteraram a formação de grupamentos carbonilas.
- Apenas a 2MBG reduziu as defesas antioxidantes não-enzimáticas em córtex cerebral de ratos, evidenciado pela diminuição das concentrações de GSH e aumento na oxidação de grupamentos sulfidrilas.
- A redução dos níveis de GSH causada por 2MBG foi prevenida por MEL e TRO, indicando o envolvimento de radicais hidroxila e peroxila neste efeito.
- O 2MB e a 2MBG não alteraram a oxidação dos grupamentos tióis em uma solução comercial de GSH na ausência de tecido cerebral, sugerindo estes metabólitos não atacam diretamente esses grupamentos.
- O 2MB e a 2MBG não induziram a formação de espécies reativas de nitrogênio em córtex cerebral de ratos, visto que os níveis de nitratos e nitritos não foram alterados.
- A análise conjunta dos resultados indica que a 2MBG provoca estresse oxidativo *in vitro* em córtex cerebral de ratos jovens.

III.3. PERSPECTIVAS

1) Investigar os efeitos *in vitro* do 2MB e da 2MBG sobre parâmetros de metabolismo energético em córtex cerebral de ratos;

2) Investigar os efeitos *in vitro* do 2MB e da 2MBG sobre parâmetros de metabolismo energético e estresse oxidativo em estriado de ratos;

3) Investigar os efeitos da administração intracerebroventricular do 2MB e da 2MBG sobre parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético em córtex cerebral e estriado de ratos.

4) Estudar os efeitos do ácido 2MB e da 2MBG sobre a viabilidade, proliferação e função mitocondrial de células neuronais e gliais cultivadas de cérebro de ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfardan J, Mohsen A, Copeland S, Ellison J, Keppen-Davis L, Rohrbach M, Powell BR, Gillis J, Matern D, Kant J, Vockley J, 2010. Characterization of new ACADSB gene sequence mutations and clinical implications in patients with 2-methylbutyrylglycinuria identified by newborn screening. *Mol Genet Metab* 100: 333-338.

Andresen BS, Christensen E, Corydon TJ, Bross P, Pilgaard B, Wanders RJA, Ruiten JPN, Simonsen H, Winter V, Knudsen I, Schroeder LD, Gregersen N, Skovby F, 2000. Isolated 2-methylbutyrylglycinuria caused by short/branched-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of a new enzyme defect, resolution of its molecular basis, and evidence for distinct acil-CoA dehydrogenases in isoleucine and valine metabolism. *Am J Hum Genet* 67: 1095-1103.

Andresen JK, 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 5: S18-S25.

Bast A, 1993. Oxidative stress and calcium homeostasis. In: Halliwell B, Aruoma OI, eds. DNA and free radicals. Chichester: Ellis Horwood; 95-108.

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

Behl C e Moosmann B, 2002b. Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *J Biol Chem* 383: 521-536.

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

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

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

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

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

Chae HZ, Kang SW, Rhee SG, 1999. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol* 300: 219-226.

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

Choi JH, Cho YM, Suh KS, Yoon HR, Kim GH, Kim SS, Ko JM, Lee JH, Park YS, Yoo HW, 2008. Short-term efficacy of enzyme replacement therapy in korean patients with fabry disease. *J Korean Med Sci* 23: 243-250.

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A, 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 9: 169-176.

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

Draper HH e Hadley M, 1990. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica* 20: 901-907.

Duprat F, Guillrmare E, Romey G, Fink M, Lesage F, Lazdunski M, Honore E, 1995. Susceptibility of cloned K⁺ channels to reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11796-11800.

Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation, 1996. *Biochem J* 320: 3245-57.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H, 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81-128.

Ferreira ALA e Matsubara LS, 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 43: 61-68.

Gibson KM, Burlingame TG, Hogema B, Jakobs C, Schutgens RBH, Millington D, Roe CR, Diane S, Sweetman L, Steiner RD, Linck L, Pohowalla P, Sacks M, Kiss D, Rinaldo P, Vockley J, 2000. 2-Methylbutyryl-Coenzyme A dehydrogenase deficiency: a new inborn error of L-isoleucine metabolism. *Pediatr Res* 47: 830-833.

Grabowski GA, 2008. Treatment perspectives for the lysosomal storage diseases. *Expert Opin Emerg Drugs* 13: 197-211.

Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH, 1996. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* 39: 385-389.

Halliwell B e Gutteridge JMC, 1996. Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci* 8: 22-26.

Halliwell B e Gutteridge JMC, 2007a. Lipid peroxidation products: bad, good or indifferent? In: Halliwell B, Gutteridge JMC, eds. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press: Oxford; 249-260.

Halliwell B e Gutteridge JMC, 2007b. Antioxidant defenses: endogenous and diet derived. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, eds. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press: Oxford; 79-185.

Halliwell B e Gutteridge JMC, 2007c. Cellular response to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, eds. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press: Oxford; 187-267.

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

Hoffmann GF, Meler-Augenstein W, Stockler S, Surtees R, Rating D, Nyhan WL, 1993. Physiology and pathophysiology of organic acids on cerebrospinal fluid. *J Inherit Metab Dis*, 16: 648-669.

Hughes DA, Milligan A, Mehta A, 2007. Home therapy for lysosomal storage disorders. *Br J Nutr* 16: 1386-1389.

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

Jenner P e Olanow CW, 1996. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 47: 161-170.

Jenner P, 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53: 26-38.

Kanavin OJ, Woldseth B, Jellum E, Tvedt B, Andresen BS, Stromme P, 2007. 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency associated with autism and mental retardation: a case report. *J Med Case Reports* 1: 98.

Karelson E, Bogdanovic N, Garlind A, Winbland B, Zilmer K, Kullisaar T, Vihalemm T, Kairane C, Zilmer M, 2001. The cerebrocortical areas in normal brain aging and Alzheimer's

disease: noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem Res* 26: 353-361.

Karlhuber GM, Bauer HC, Eckl PM, 1997. Cytotoxic and genotoxic effects of 4-hydroxynonenal in cerebral endothelial cells. *Mutat Res* 381: 209-216.

Keller JN, Hanni KB, Markerbery, WR, 1999. 4-Hydroxynonenal increases neuronal susceptibility to oxidative stress. *J Neurosci Res* 58: 823-830.

Korman SH, 2006. Inborn errors of isoleucine degradation: a review. *Mol Genet Metab* 89: 289-299.

Liu D, Wen J, Liu J, Li L, 1999. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *FASEB J* 13: 2318-2328.

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

Madsen PP, Kibaek M, Roca R, Sachidanandam R, Krainer AR, Christensen E, Steiner RD, Gibson KM, Corydon TJ, Knudsen I, Wanders RJ, Ruitter JP, Gregersen N, Andresen BS, 2006. Short/branched-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency due to an IVS3+3A>G mutation that causes exon skipping. *Hum Genet* 118: 680-690.

Mancuso C, Scapagini G, Currò D, Giuffrida Stella AM, de Marco C, Butterfield DA, Calabrese V, 2006. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci* 12: 1107-1123.

Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP, 1997. A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 68: 255-264.

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

Matern D, He M, Berry SA, Rinaldo P, Whitley CB, Madsen PP, van Calcar SC, Lussky RC, Andresen BS, Wolff JA, Vockley J, 2003. Prospective diagnosis of 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency in the Hmong population by newborn screening using tandem mass spectrometry. *Pediatrics* 112: 74-78.

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

McConnell EJ, Bittelmeyer AM, Raess BU, 1999. Irreversible inhibition of plasma membrane (Ca²⁺Mg²⁺)-ATPase and Ca²⁺ transport by 4-OH-2,3-trans-nonenal. *Arch Biochem Biophys* 361: 252-256.

Méndez-Alvarez E, Soto-Otero R, Herminda-Ameijeiras A, López-Martín ME, Labandeira-García JL, 2001. Effect of iron and manganese on hydroxyl radical production by 6-hydroxydopamine: mediation of antioxidants. *Free radic Biol Med* 31986-31998.

Mitchell GA e Fukao TJC, 2001. Inborn Errors of Ketone Body Metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2340-2342.

Morais VA e De Strooper B, 2010. Mitochondria dysfunction and neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis* 20(2): S255-S263.

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

Ong WY, Lu XR, Hu CY, Halliwell B, 2000. Distribution of hydroxynonenal-modified proteins in the kainate-lesioned rat hippocampus: evidence that hydroxynonenal formation precedes neuronal cell death. *Free Radic Biol Med* 28: 1214-1221.

Ortiz A, Oliveira JP, Wanner C, Brenner BM, Waldek S, Warnock DG, 2008. Recommendations and guidelines for the diagnosis and treatment of Fabry nephropathy in adults. *Nat Clin Pract Nephrol* 4: 327-336.

Perry G, Taddeo MA, Petersen RB, Castellani RJ, Harris PL, Siedlak SL, Cash AD, Liu Q, Nunomura A, Atwood CS, Smith MA, 2003. Adventiously-bound redox active iron and copper are at the center of oxidative damage in Alzheimer disease. *Biometals* 16: 77-81.

Rozen R, Vockley J, Zhou L, Milos R, Willard J, Fu K, Vicanek C, Low-Nang L, Torban E, Fournier B, 1994. Isolation and expression of a cDNA encoding the precursor for a novel member (ACADSB) of the acyl-CoA dehydrogenase gene family. *Genomics* 24: 280-287.

Sass JO, Ensenauer R, Röschinger W, Reich H, Steuerwald U, Schirmmacher O, Engel K, Häberle J, Andresen BS, Mégabarné A, Lehnert W, Zschocke J, 2008. 2-Methylbutyryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: Functional and molecular studies on a defect in isoleucine catabolism. *Mol Genet Metab* 93: 30-35.

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

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

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

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, 2001. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8 ed. New York: McGraw-Hill Inc; 3-45.

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

Simon G, Erdos M, Maródi L, Tóth J, 2008. Gaucher disease: The importance of early diagnosis and therapy. *Orv Hetl* 149: 743-750.

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

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

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

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

Veal D, Day A, 2011. Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 15(1): 147-151.

Vedder AC, Breunig F, Donker-Koopman WE, Mills K, Young E, Winchester B, Ten Berge IJ, Groener JE, Aerts JM, Wanner C, Hollak CE, 2008. Treatment of Fabry disease with different dosing regimens of agalsidase: Effects on antibody formation and GL-3. *Mol Genet Metab* 94: 319-325.

Ward RJ e Peters TJ, 1995. Free Radicals. In: Marshall WJ; Bangert SK, Eds. Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects. New York: Churchill Livingstone, 765-777.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota do catabolismo da L-isoleucina com bloqueio da enzima desidrogenase de acilas-CoA de cadeia curta/ramificada (SBCAD).....	14
---	----