

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

**EFEITOS *IN VITRO* DOS ÁCIDOS FITÂNICO E PRISTÂNICO SOBRE A
HOMEOSTASE ENERGÉTICA EM CÓRTEX CEREBRAL E CEREBELO DE
RATOS JOVENS**

ESTELA NATACHA BRANDT BUSANELLO

ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER

**Tese de doutorado 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 Doutor em
Bioquímica.**

Porto Alegre, 2012

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul por me proporcionar ensino gratuito e de qualidade.

Ao meu querido orientador, Moacir Wajner, por todo ensinamento, carinho, paciência e por acreditar e confiar em meu trabalho.

Aos amigos do laboratório 38, por toda amizade e pela colaboração.

Aos pós-doutores César, Carolina e Valeska, por todos o aprendizado bioquímico, por estarem sempre dispostos a ajudar e ensinar e pela amizade.

As minhas grandes amigas Ângela e Anelise, não só pela grande ajuda com o trabalho, mas por serem exatamente como são, por todo o carinho, compreensão, risadas e amizade.

Ao Alexandre, pela ajuda e ensinamentos que foram essenciais para esta tese, mas também por ser uma pessoa incrível que admiro muito.

Aos demais colegas da pós-graduação, que de uma forma ou outra colaboraram com este trabalho e também pela amizade.

Aos queridos bolsistas, por estarem sempre dispostos a ajudar e por toda a amizade.

Ao Caio, pelo amor, companheirismo e também por deixar minha vida mais leve, alegre e colorida.

Aos meus pais, os melhores do mundo, por serem meu grande exemplo e por todo apoio, incentivo e amor incondicional.

SUMÁRIO

PARTE I	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
I.1. INTRODUÇÃO	8
I.1.1. Erros Inatos do Metabolismo	8
I.1.2. Metabolismo dos ácidos fitânico e pristânico.....	9
I.1.3. Peroxissomos	12
I.1.4. Defeitos peroxissomais com alteração em uma proteína envolvida na a ou b-oxidação	12
I.1.4.1. Doença de Refsum clássica ou adulta.....	12
I.1.4.2. Deficiência da a-metil-acil CoA racemase	13
I.1.4.3. Defeito da proteína D-bifuncional	14
I.1.5.1. Síndrome de Zellweger.....	15
I.1.5.2. Adrenoleucodistrofia neonatal	16
I.1.5.3. Condrodisplasia rizomélica punctata tipo I (CRP I)	16
I.1.5.4. Doença de Refsum Infantil.....	17
I.1.6 Diagnóstico das doenças com acúmulo dos ácidos fitânico (Fit) e pristânico (Prist)	17
I.1.7 Tratamento.....	17
I.1.8 Fisiopatologia das doenças com acúmulo dos ácidos fitânico (Fit) e pristânico (Prist)	18
I.1.9 Metabolismo Energético Cerebral.....	21
I.1.10 Metabolismo Energético e Doenças Neurodegenerativas	22
I.2. OBJETIVOS	23
I.2.1 Objetivo geral.....	23
I.2.2 Objetivos específicos	23
PARTE II	25
CAPÍTULO I	26
CAPÍTULO II	35
CAPÍTULO III	44
CAPÍTULO IV	52
PARTE III	62
III.1. DISCUSSÃO	63
III.2. CONCLUSÕES	73
III.2.1 EFEITOS DO ÁCIDO FITÂNICO (FIT) SOBRE A HOMEOSTASE ENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ATIVIDADE DA Na^+, K^+ -ATPASE EM CEREBELO DE RATOS	73
III.2.2 EFEITOS DO ÁCIDO PRISTÂNICO (PRIST) SOBRE A HOMEOSTASE ENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ATIVIDADE DA Na^+, K^+ -ATPASE EM CÉREBRO DE RATOS	73
III.3. PERSPECTIVAS	75
REFERÊNCIAS	76
LISTA DE FIGURAS	83

PARTE I

Introdução e Objetivos

RESUMO

Os ácidos fitânico (Fit) e pristânico (Prist) são ácidos graxos saturados de cadeia lateral ramificada, cujas concentrações estão aumentadas em diversas doenças peroxissomais. Os pacientes afetados por esses distúrbios apresentam predominantemente manifestações clínicas neurológicas. As concentrações elevadas do Fit e Prist, que podem chegar a 5000 μM e 300 μM , respectivamente, no plasma dos indivíduos afetados, indicam que estes ácidos graxos possam ser neurotóxicos. Considerando que a fisiopatologia dos sintomas neurológicos dessas doenças ainda não está bem estabelecida, o presente trabalho se propôs a investigar os efeitos *in vitro* dos ácidos Fit e Prist sobre vários parâmetros do metabolismo energético e sobre a Na^+, K^+ -ATPase em cerebelo e cérebro de ratos jovens. Inicialmente, observamos que o Fit diminuiu a atividade dos complexos da cadeia respiratória I, I-III, II e II-III, sem alterar o IV, indicando que o funcionamento da cadeia respiratória está prejudicado por esse ácido graxo. Além disso, o Fit diminuiu o estado 3 da respiração mitocondrial, achados que refletem uma inibição metabólica. Por outro lado, a atividade da enzima creatina quinase (CK), não foi alterada pelo Fit, enquanto a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase foi diminuída de maneira acentuada, indicando que a neurotransmissão possa estar prejudicada por esse metabólito. Além disso, o Fit aumentou o estado 4 da respiração mitocondrial e diminuiu os valores do índice de controle respiratório (RCR). O Fit também diminuiu o potencial de membrana, que foi atenuado pela adição de NAC, e o conteúdo de equivalentes reduzidos de NAD(P)H na matriz mitocondrial, sugerindo um efeito desacoplador da fosforilação oxidativa. Já o Prist inibiu a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato, sugerindo uma redução da atividade do ciclo do ácido cítrico. O Prist também diminuiu acentuadamente a atividade dos complexos I, II e II-III sem interferir na atividade do complexo IV, o que indica que esse ácido graxo interfere no fluxo dos elétrons pela cadeia respiratória, podendo comprometer a geração de ATP. Além disso, o Prist diminuiu o estado 3 da respiração e a razão ADP/O, achados que indicam uma inibição metabólica e também uma diminuição na eficiência da fosforilação oxidativa provocada por esse ácido graxo. Também determinamos as atividades da enzima CK, que não foi alterada pelo Prist, e da enzima Na^+, K^+ -ATPase que foi significativamente reduzida, o que indica que a manutenção do potencial de membrana necessário para o funcionamento da neurotransmissão possa ser comprometida pelo Prist. Além disso, o Prist aumentou o estado 4 da respiração mitocondrial e diminuiu os valores do índice de RCR. O Prist também diminuiu o potencial de membrana e o conteúdo de equivalentes reduzidos (NAD(P)H) da matriz mitocondrial, achados que sugerem um efeito desacoplador da fosforilação oxidativa. O Prist também provocou inchamento mitocondrial que foi prevenido por ciclosporina e por N-acetilcisteína, sugerindo o envolvimento do PTP nesse efeito, provavelmente através de mecanismos oxidativos. Nossos resultados sugerem que os ácidos graxos Fit e Prist acumulados em algumas doenças peroxissomais comprometem o metabolismo energético, atuando como desacopladores e inibidores da fosforilação oxidativa, bem como a neurotransmissão. É possível que esses mecanismos possam estar envolvidos no dano neurológico apresentado pelos pacientes afetados por essas desordens.

ABSTRACT

Phytanic acid (Phyt) and pristanic acid (Prist) are branched-chain saturated fatty acids whose concentrations are elevated in various peroxisomal disorders. Patients affected by these disorders present predominant neurological involvement. The elevation of plasma Phyt and Prist concentrations that can reach up to 5000 μM and 300 μM , respectively, indicate that these fatty acids may be neurotoxic. Considering that the pathophysiology of the neurological symptoms of these diseases are not well established, the present work proposed to investigate the *in vitro* effects of Phyt and Prist on various parameters of energy metabolism and Na^+, K^+ -ATPase in cerebellum and brain of young rats. Initially, we observed that Phyt diminished the activities of complexes I, I-III, II and II-III but not IV of the respiratory chain, indicating that the respiratory chain function is impaired by this fatty acid. In addition, Phyt decreased state 3 of respiration, reflecting a metabolic inhibition. On the other hand, the activity of creatine kinase was not altered by this metabolite, whereas the activity of Na^+, K^+ -ATPase was drastically reduced, indicating that the neurotransmission is probably compromised by this metabolite. Besides, Phyt markedly increased state 4 respiration and reduced the respiratory control ratio. Phyt also diminished the mitochondrial membrane potential, attenuated by NAC, and the matrix NAD(P)H levels, suggesting an uncoupler effect of oxidative phosphorylation. Regarding on Prist effects, this fatty acid decrease $^{14}\text{CO}_2$ production from labeled acetate suggesting an impairment of CAC functioning. Prist also reduced the activities of the respiratory chain complexes and observed that this fatty acid reduced the activity of complexes I, II and II-III without interfering with complex IV, indicating that this fatty acid compromises ATP generation. In addition, Prist decreased state 3 of respiration and ADP/O ratio, indicating a metabolic inhibition provoked by this fatty acid. We also determined the activities of creatine kinase, that was not altered by Prist, and Na^+, K^+ -ATPase, that was significantly reduced, indicating that the maintenance of membrane potential necessary to a normal neurotransmission may be a compromise by Prist. In addition, Prist increased state 4 respiration and diminished the respiratory control ratio. Prist also diminished the mitochondrial membrane potential, which was not prevented by NAC, and the matrix NAD(P)H levels, suggesting an uncoupler effect of oxidative phosphorylation. Prist also provoked mitochondrial swelling and this effect was prevented by both cyclosporine and NAC, suggesting a PTP involvement on this effect probably through oxidative mechanisms. Taken together, our results suggest that the fatty acids Phyt and Prist accumulated in some peroxisomal diseases compromise energy metabolism, acting as uncouplers and oxidative phosphorylation inhibitors, as well as the neurotransmission. It is feasible that these mechanisms may be involved with the neurological damage presented by patients affected by these disorders.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina difosfato

AMACR - α -metil-acil CoA racemase

ANOVA – análise de variância de uma via

ANT – translocador de nucleotídeos adenina

ATC - atractilosídeo

ATP – adenosina trifosfato

CAC - ciclo do ácido cítrico

CK – creatina quinase

CoA – coenzima A

CRP I - Condrodisplasia rizomélica punctata tipo I

EIM – erros inatos do metabolismo

F – valor utilizado em análise de variância

Fit – ácido fitânico

MFP 2 – proteína multifuncional peroxissomal 2

OMIM – *Online mendelian inheritance in man*

Pi – fosfato inorgânico

PPAR - receptores ativadores da proliferação de peroxissomos

Prist – ácido pristânico

PTP - poro de permeabilidade transitória mitocondrial

r - anisotropia

RXR - receptores nucleares retinóide-X

SCPx – proteína carreadora de esteróis x

SCP-2 - proteína carreadora de esteróis-2

SZ – síndrome de Zellweger

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. Erros Inatos do Metabolismo

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

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

I.1.2. Metabolismo dos ácidos fitânico e pristânico

O ácido fitânico (ácido 3,7,11,15-tetrametilhexadecanóico; Fit) é um ácido graxo saturado de cadeia lateral ramificada derivado da clorofila. O Fit não é produzido no intestino humano, mas microorganismos presentes no sistema gastrointestinal de ruminantes podem metabolizar a clorofila, liberando fitol, que é então convertido nesse ácido (Allen et al., 2008). Esse ácido graxo é proveniente da dieta, principalmente de carne e laticínios e, inicialmente, entra no peroxissomo a partir da proteína carreadora de esteróis 2 (SCP2). O metabolismo peroxissomal do Fit ocorre por α -oxidação principalmente nos rins e no fígado, onde atuam quatro enzimas que transformam o Fit em ácido pristânico (ácido 2,6,10,14-tetramethyl pentadecanóico, Prist) (Figura 1). O Prist é posteriormente degradado através de 3 ciclos da β -oxidação peroxissomal, seguido pela β -oxidação mitocondrial (Figura 2). Esse ácido graxo também pode ser proveniente diretamente da dieta de fontes como gordura bovina e alguns tipos de peixes, entrar no peroxissomo e sofrer a β -oxidação (Wanders et al., 2001; Wanders e Komen 2007; Wierzbicki 2007).

Como apenas o isômero com o grupamento 2-metil na configuração S pode ser degradado via β -oxidação peroxissomal, é necessário que o Prist-2R seja convertido em um isômero 2S pela α -metil-acil CoA racemase (AMACR) antes de sua degradação. Essa enzima cataliza a conversão de vários (2R)-metil-acil-CoAs de cadeia ramificada aos seus Isômeros S correspondentes e não está diretamente envolvida com a β -oxidação peroxissomal, mas é importante para que ela ocorra normalmente, além de também estar envolvida na degradação dos sais biliares (Figura 3).

O primeiro passo da β -oxidação peroxissomal é catalizado pela proteína multifuncional 2 (MFP 2), também chamada de proteína D-bifuncional, que exerce atividades de hidratase e desidrogenase. O último passo dessa via de degradação é catalizada por uma tiolase e o produto final dos três ciclos da β -oxidação é o composto 4,8-dimetilnonanoil-CoA, que é exportado do peroxissomo para a mitocôndria, onde segue a β -oxidação mitocondrial.

(Ferdinandusse et al., 2000; Ferdinandusse et al., 2006; Mclean et al., 2002; Smith et al., 2010; Verhoeven e Jakobs 2001).

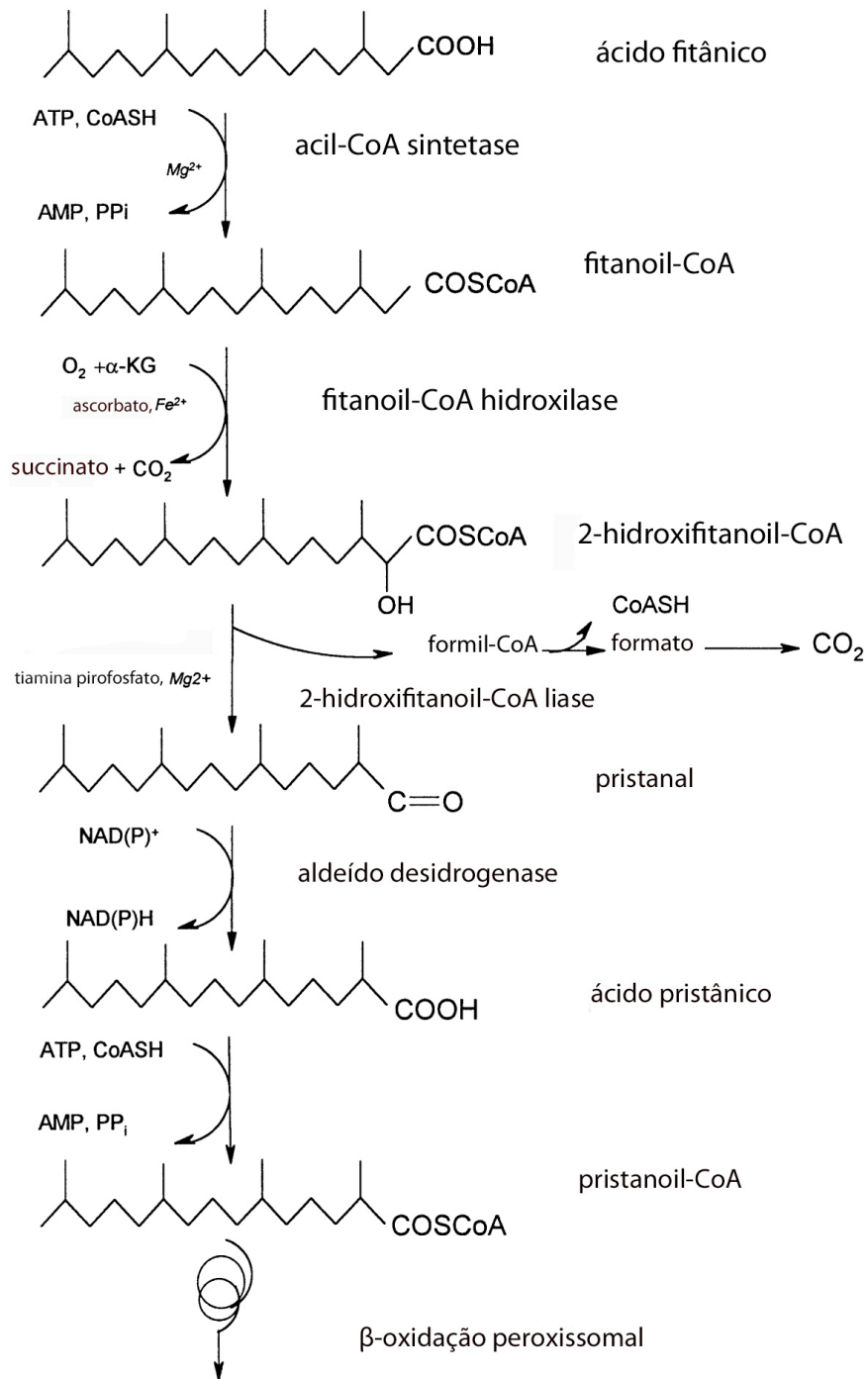


Figura 1. α -Oxidação peroxissomal. Adaptado de (Verhoeven e Jakobs 2001)

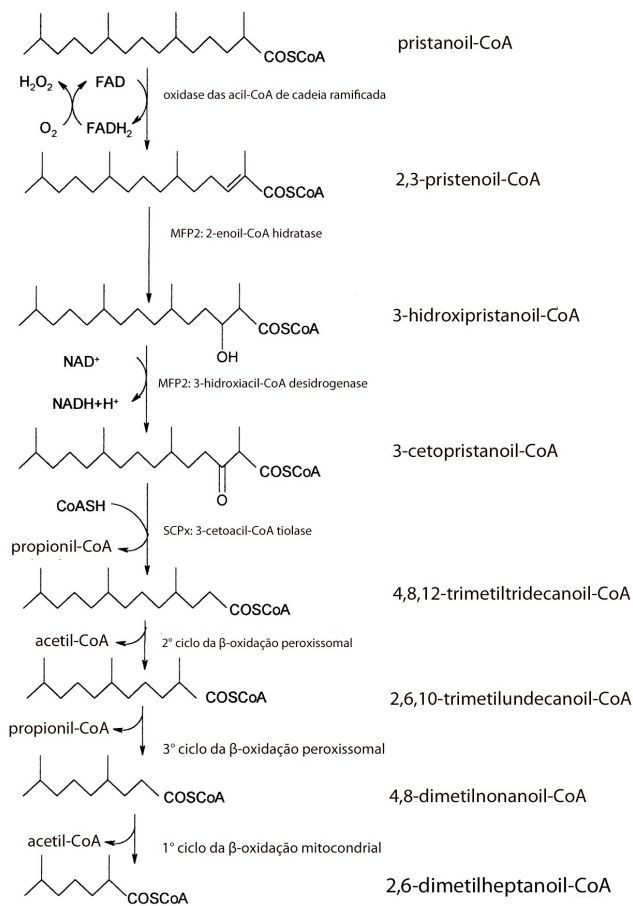


Figura 2. β -Oxidação do ácido pristânico. Adaptado de (Verhoeven e Jakobs 2001)

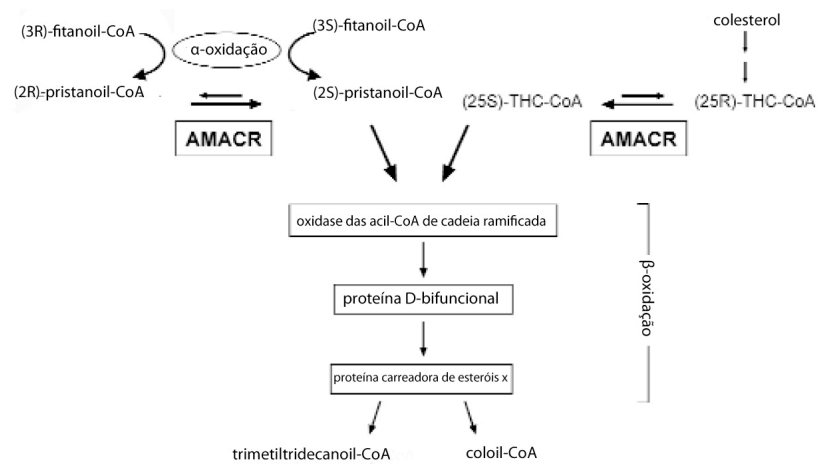


Figura 3. Função da enzima α -metil-acil-CoA racemase. Adaptado de (Ferdinandusse et al., 2000)

I.1.3. Peroxissomos

Os peroxissomos são organelas presentes em praticamente todas as células eucariotas. Na maioria das células humanas, sua presença pode variar de menos de cem a mais de mil peroxissomos por célula. Sua matriz granular contém mais de 50 enzimas que participam de vários processos metabólicos, incluindo a β -oxidação de certos ácidos graxos e também a biossíntese de fosfolípidos, ácidos biliares e compostos isoprenóides (Scriver et al., 2001). Essa organela representa um dos principais sítios na célula onde radicais de oxigênio são gerados e eliminados (Yeldandi et al., 2000).

Há um amplo grupo de erros inatos do metabolismo (EIM) onde há alterações peroxissomais. A incidência estimada dessas desordens é de 1:20.000 a 1:100.000 nascidos vivos. Elas são divididas em dois grupos: a) defeitos com alteração em uma proteína envolvida na α ou β -oxidação e b) doenças hereditárias causadas por defeitos na biogênese peroxissomal. Os ácidos graxos Fit e Prist se acumulam em diversas dessas doenças hereditárias de ambos os grupos (McClean et al., 2002; Scriver et al., 2001).

I.1.4. Defeitos peroxissomais com alteração em uma proteína envolvida na α ou β -oxidação

I.1.4.1. Doença de Refsum clássica ou adulta

A doença de Refsum clássica ou adulta (OMIM 26650) é uma doença neurometabólica rara caracterizada por um defeito no gene estrutural que codifica a enzima fitanoil-CoA hidroxilase, levando ao acúmulo do Fit nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes. Essa enzima cataliza o primeiro passo da α -oxidação peroxissomal, convertendo fitanoil-CoA em 2-hidroxi-fitanoil CoA (Reiser et al., 2005; Wierzbicki e Lloyd 2007). Quando ocorre um bloqueio na atividade da enzima fitanoil-CoA hidroxilase, as concentrações plasmáticas de Fit nos pacientes podem atingir até 5000 μM (níveis em

indivíduos normais: até 30 μM) (Wanders et al., 2003). Os pacientes afetados pela doença de Refsum clássica apresentam múltiplos sintomas clínicos que geralmente começam a aparecer durante a infância. Os principais sinais clínicos incluem retinite pigmentosa, polineuropatia periférica e ataxia cerebelar, todos neurológicos. Outros achados menos comuns incluem arritmias cardíacas, déficits auditivo e olfatório, ictiose, perda de visão, distúrbios psiquiátricos e proteinúria. Todos os pacientes afetados apresentam sinais de retinite pigmentosa (degeneração da retina), sendo considerado o sintoma inicial da doença, precedendo até mesmo os achados bioquímicos característicos. Essa degeneração retinal característica parece ser devida ao acúmulo excessivo de Fit no tecido ocular. Exames patológicos revelam quase uma perda completa dos fotorreceptores, afinamento da camada nuclear interna e redução no número de células ganglionais da retina. Por outro lado, as disfunções cerebelares também são bem estabelecidas, incluindo ataxia e tremores. Contudo, essas disfunções cerebelares se manifestam em um período mais tardio quando comparadas com a retinopatia e a neuropatia características. A autópsia de um paciente com doença de Refsum revelou anormalidades histopatológicas cerebelares, incluindo células de Purkinje proeminentes. A neuropatia periférica afeta a parte motora e sensorial, sendo caracterizada por fraqueza e atrofia muscular e distúrbios sensoriais. Diferentemente da retinite, pode não ser detectada no início da doença. (Chow et al., 1992; Wierzbicki 2007; Wierzbicki e Lloyd 2007).

1.1.4.2. Deficiência da α -metil-acil CoA racemase

A deficiência da atividade da α -metil-acil CoA racemase (AMACR) (OMIM 604489) é uma desordem rara que resulta no acúmulo de R-isômeros do Prist e intermediários de sais biliares e se manifesta principalmente em adultos. Pacientes portadores dessa desordem apresentam neuropatia periférica que afeta a parte motora e sensorial, embora há o relato de pelo menos um caso com coagulopatia e colestase no período neonatal devido a anormalidade nos sais biliares (Setchell et al., 2003). Nos pacientes afetados

observa-se o acúmulo de Fit e Prist (em torno de 25 e 300 μ M no plasma, respectivamente), além de intermediários de sais biliares (Ferdinandusse et al., 2002). A mutação predominante dessa enzima é a c.154T>C que foi encontrada na maioria dos casos descritos da deficiência de AMACR. Essa mutação tem caráter de herança autossômica recessiva e está relacionada tanto com a forma adulta quanto a forma neonatal dessa desordem (Smith et al., 2010).

I.1.4.3. Defeito da proteína D-bifuncional

A deficiência da proteína D-bifuncional (OMIM 261515) pode ser classificada em 3 tipos: tipo I com deficiência das unidades hidratase e desidrogenase, tipo II com deficiência isolada na hidratase e tipo III com deficiência isolada na desidrogenase. Os pacientes portadores dessa desordem normalmente morrem no primeiro ano de vida (Möller et al., 2001). Os achados clínicos são hipotonia, dismorfismo facial, atraso psicomotor, convulsões neonatais, defeitos de migração neonatal ou desmielinização. Os pacientes afetados acumulam ácidos graxos de cadeia muito longa, intermediários dos sais biliares, Prist (até 80 μ M em plasma) e/ou Fit (mais de 190 μ M em plasma) (Ferdinandusse et al., 2002; Khan et al., 2010; Verhoeven e Jakobs 2001).

I.1.5. Distúrbios da biogênese de peroxissomos

Os distúrbios da biogênese de peroxissomos ocorrem devido a mutações nos genes PEX, os quais codificam proteínas chamadas de peroxinas que são responsáveis pela importação de proteínas do citosol para a matriz peroxissomal, bem como de proteínas que serão introduzidas na membrana peroxissomal. As proteínas que deverão ser direcionadas para a matriz peroxissomal possuem dois tipos de seqüências sinalizadoras (PTS1 e PTS2) que são reconhecidas pelas peroxinas. A maioria das proteínas de

matriz peroxissomal possui a seqüência do tipo PTS1. Essas desordens são geralmente classificadas em dois espectros clínicos: o espectro de Zellweger que inclui a doença de Refsum infantil, a síndrome de Zellweger e a adrenoleucodistrofia neonatal e os variantes da condrodissplasia rizomérica punctata tipo I (CRPI). Geralmente, as células de pacientes portadores das doenças do espectro de Zellweger podem apresentar defeito tanto na importação de proteínas com seqüência PTS1 quanto na importação de proteínas com seqüência PTS2. Por outro lado, células de indivíduos afetados pela CRP I apresentam defeito no transporte de proteínas com seqüência PTS2.

I.1.5.1. Síndrome de Zellweger

A síndrome de Zellweger (SZ) (OMIM 214100) constitui-se em um grupo de desordens com diferentes defeitos genéticos que apresentam em comum a ausência de peroxissomos funcionais, levando a várias anormalidades bioquímicas, bem como sintomas clínicos variáveis (Verhoeven e Jakobs 2001). A SZ é a doença peroxissomal que apresenta fenótipo clínico mais severo, sendo caracterizada por malformações que afetam o desenvolvimento do cérebro, fígado, rins e esqueleto. Os pacientes portadores dessa desordem apresentam anormalidades craniofaciais e oculares características, além de hipotonia, fraqueza e convulsões no período neonatal. Normalmente os pacientes morrem no primeiro ano de vida. A SZ é originada a partir de mutações dos genes PEX, que codificam proteínas (peroxinas) necessárias para a formação de importantes proteínas na matriz e membrana peroxissomal (Müller et al., 2010). Por outro lado, alguns defeitos da biogênese peroxissomal podem manifestar sintomas menos severos, como retardo psicomotor, disfunção neurológica leve e expectativa de vida superior a 10 anos. No plasma dos pacientes afetados pela SZ, Fit e Prist estão presentes em concentrações elevadas, podendo atingir níveis plasmáticos superiores a 500 e 90 μM , respectivamente (Ferdinandusse et al., 2002; Scriver et al., 2001; Verhoeven e Jakobs 2001).

I.1.5.2. Adrenoleucodistrofia neonatal

A adrenoleucodistrofia neonatal (OMIM 202370) é uma doença menos severa que a síndrome de Zellweger. Os pacientes afetados apresentam leucodistrofia progressiva, hipotonia, perda de audição, retinopatia, retardo no desenvolvimento psicomotor, convulsões, problemas cardíacos e normalmente morrem durante a infância. A desmielinização é difusa, afetando o cérebro e o cerebelo com envolvimento no núcleo dentado e peridentado. Nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes são encontrados níveis elevados de Fit, ácidos graxos de cadeia muito longa, ácido piperídico e ácidos biliares (Kelley et al., 1986; Poll-The et al., 2004).

I.1.5.3. Condrodisplasia rizomélica punctata tipo I (CRP I)

A CRP I também é classificada como um distúrbio da biogênese de peroxissomos e é causada por um defeito no gene que codifica o receptor Pex7p que é uma importante proteína participante da síntese dessas organelas. Esse receptor reconhece proteínas peroxissomais que possuem a sequência sinalizadora PST2. Dessa forma, todas as proteínas com essa sequência não são direcionadas corretamente para o interior do peroxissomo, já que o receptor se encontra defeituoso. O acúmulo de Fit é explicado pelo fato de que a enzima fitanoil-CoA hidroxilase, enzima participante da α -oxidação do Fit, possui PST2. O acúmulo de Fit é a característica bioquímica marcante da CRP I, pois as concentrações encontradas desse metabólito são maiores que em outras desordens da biogênese de peroxissomos. O fenótipo da CRP I é severo e acompanhado por catarata congênita e anormalidades no desenvolvimento, incluindo atrasos na mielinização e outras anormalidades, além de atrofia cerebelar progressiva. Além disso, grande parte dos pacientes portadores de CRP I não sobrevive ao período neonatal e os demais não ultrapassam os 5 anos de vida, normalmente devido a complicações

respiratórias. (Bams-Mengerink et al., 2006; Braverman et al., 2010; Powers et al., 1999).

I.1.5.4. Doença de Refsum Infantil

A doença de Refsum infantil (OMIM 266510) representa o fenótipo menos severo dentre os distúrbios do espectro de Zellweger. Clinicamente, ela se distingue da doença de Refsum clássica devido ao fato de que os pacientes apresentam retardo no desenvolvimento físico e mental, hepatomegalia e osteopenia, além de retinite pigmentosa e déficit auditivo. Bioquimicamente, os indivíduos afetados apresentam elevados níveis plasmáticos de ácidos graxos de cadeia muito longa, ácidos di- e trihidroxicolestanóico, ácido pipecólico, além do Fit (Cakirer e Savas 2005Tran, 2011).

I.1.6 Diagnóstico das doenças com acúmulo dos ácidos fitânico (Fit) e pristânico (Prist)

O diagnóstico das doenças metabólicas com acúmulo do Fit e Prist deve ser realizado com base na análise das concentrações plasmáticas desses ácidos graxos por cromatografia gasosa, além da medida da atividade da enzima defeituosa em fibroblastos para confirmar o defeito nos processos de α ou β -oxidação. Também a análise mutacional e medida de outros compostos que possam estar acumulados nessas doenças podem auxiliar no diagnóstico. (Ferdinandusse et al., 2002; Johnson et al., 2003; Müller et al., 2010; Smith et al., 2010).

I.1.7 Tratamento

Os tratamentos disponíveis até o momento para as doenças peroxissomais são usualmente de suporte, com o objetivo de tratar as

convulsões, disfunções hepáticas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (Steinberg 1995). Alguns estudos mostraram que a administração oral de ácido biliar melhorou a função hepatobiliar em muitas crianças com SZ (Maeda et al., 2002; Setchell et al., 1992).

Considerando que o Fit é obtido exclusivamente da dieta, principalmente de carne vermelha e laticínios, o tratamento para a doença de Refsum e para a deficiência de AMACR é baseado na restrição dietética desse ácido graxo (Ferdinandusse et al., 2002; Smith et al., 2010). O primeiro paciente portador da doença de Refsum tratado com restrição dietética de Fit obteve a diminuição significativa nos níveis plasmáticos do metabólito, melhora significativa na polineuropatia, além da estabilização da retinite pigmentosa, indicando que o Fit é tóxico para células neurais (Wanders et al., 2001). Muitos outros pacientes que foram submetidos a esse tratamento obtiveram diminuição nas concentrações de Fit (Scriver et al., 2001). Contudo, no início do tratamento os níveis de Fit podem aumentar, sugerindo que reservas teciduais são mobilizadas quando a ingesta é diminuída. Dessa forma, além da restrição de Fit na dieta, é indicado um rigoroso controle na ingesta calórica para evitar a mobilização excessiva de gordura que possa causar um aumento significativo nos níveis de Fit. Entretanto, deve-se destacar que esse tratamento está longe de ser efetivo, provavelmente porque a fisiopatogenia da doença é pouco conhecida.

I.1.8 Fisiopatologia das doenças com acúmulo dos ácidos fitânico (Fit) e pristânico (Prist)

Os mecanismos de dano cerebral dos pacientes portadores de doenças com acúmulo dos ácidos Fit e/ou Prist não estão completamente esclarecidos, embora haja evidências apontando para uma ação tóxica dos mesmos.

Recentemente, um estudo estabeleceu um modelo genético nocaute para a SZ, onde foi observado estresse oxidativo, morte celular neuronal e prejuízo no desenvolvimento cerebelar (Müller et al., 2010). Também foi desenvolvido recentemente um modelo nocaute de ratos para a proteína D-

bifuncional. Os animais apresentaram retardo severo no crescimento na primeira semana após o nascimento e 40% de mortalidade durante esse período (Baes et al., 2000). Por outro lado, Ferdinandusse e colaboradores (2003) demonstraram que houve dano oxidativo lipídico e ao DNA em plasma e urina de pacientes portadores da deficiência da enzima D-bifuncional. Além disso, os pesquisadores mostraram também que houve um desequilíbrio entre a geração de peróxido de hidrogênio e a atividade da enzima catalase, responsável por sua degradação, em fibroblastos de pacientes. Também foi demonstrado que o Prist exerceu uma acentuada atividade citotóxica em células cerebrais, causada por alterações do Ca^{2+} intracelular, despolarização mitocondrial e morte celular. O Prist também induziu marcadamente a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), enquanto o Fit exerceu apenas efeitos moderados sobre esse parâmetro (Rönicke et al., 2009). Nosso grupo mostrou recentemente que o Fit induziu dano oxidativo e reduziu as defesas antioxidantes em ratos jovens (Leipnitz et al., 2010). Além disso, estudos recentes demonstraram que o Fit causa morte celular em astrócitos cultivados de hipocampo de ratos (Kahlert et al., 2005). Essa morte celular astrocitária é precedida por um aumento significativo na produção de ânion superóxido, despolarização do potencial da membrana mitocondrial e liberação do citocromo *c* (Kahlert et al., 2005). O efeito tóxico do Fit também tem sido objeto de intenso estudo em mitocôndrias isoladas de cérebro. Foi demonstrado que o Fit possui atividade protonófora, inibe a translocase ADP / ATP e o fluxo de elétrons em mitocôndrias e sinaptossomas de cérebro de ratos, levando a uma diminuição da produção de ATP mitocondrial (Komen et al., 2007; Schönfeld et al., 2004). Nesse contexto, também foi mostrado que este ácido facilita a abertura do poro de permeabilidade transitória (PTP) em mitocôndrias pré-tratadas com baixas quantidades de Ca^{2+} (Schönfeld et al., 2004).

Por outro lado, Ferdinandusse e colaboradores (2008) demonstraram recentemente alterações patogênicas em um modelo animal da doença de Refsum obtido através do desenvolvimento de uma linhagem de camundongos nocaute para a enzima fitanoil-CoA hidroxilase que foram submetidos a uma dieta suplementada com fitol, precursor do Fit. Este estudo verificou que os camundongos desenvolveram neuropatia periférica e ataxia cerebelar com perda de células de Purkinje. Além disso, o acúmulo de Fit causou astrocitose,

bem como desencadeou mecanismos de adaptação como o aumento nas concentrações de proteínas ligantes de Ca^{2+} . Esse último achado está de acordo com resultados prévios obtidos *in vitro* evidenciando que astrócitos hipocâmpais têm uma alta liberação de Ca^{2+} intracelular quando expostos ao Fit (Kahlert et al., 2005).

Outros estudos mostraram que o Fit age como ativador receptores nucleares retinóide-X (RXR) e de receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPAR). Esses receptores atuam como fatores de transcrição que regulam a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios e glicose, bem como na proliferação dos peroxissomos. Além disso, os efeitos do PPAR também estão relacionados à regulação da apoptose (Roberts et al., 2002). O receptor PPAR possui três isoformas PPAR α , PPAR β e PPAR γ , sendo que o Fit é um ligante natural da PPAR α . O PPAR α está distribuído em tecidos com elevado metabolismo de ácidos graxos, tais como tecido adiposo marrom, fígado, rins e coração. O PPAR α ativado se dimeriza com os RXR e este complexo se liga a fatores de resposta para proliferação de peroxissomos localizados nos promotores de vários genes (Berger e Wagner 2002).

Seedorf (1998) por sua vez demonstrou uma ação do Fit sobre receptores nucleares, modulando a expressão gênica. Utilizando camundongos nocaute para a proteína carreadora de esteróis-2 (SCP-2) tratados com uma dieta rica em fitol, verificou que os camundongos mutantes desenvolveram letargia, ataxia, perda de peso corporal e neuropatia periférica. Outros estudos também evidenciaram uma ação do Fit sobre a expressão gênica demonstrando que uma dieta rica em fitol em camundongos nocaute para a enzima da fitanoil-CoA hidroxilase leva ao acúmulo de Fit, ácido fitênico e Prist e que o Fit causa aumento na expressão de enzimas da β -oxidação mitocondrial e peroxissomal via ativação do PPAR α , causando modificações no metabolismo de ácidos graxos (Gloerich et al., 2005).

Embora várias observações indiquem que defeitos no metabolismo energético mitocondrial, bem como produção aumentada de ERO estão envolvidas na toxicidade do Fit e do Prist em pacientes portadores de doenças com acúmulo desses ácidos graxos, os mecanismos subjacentes que mediam esses efeitos deletérios são pouco conhecidos.

I.1.9 Metabolismo Energético Cerebral

O cérebro é um dos órgãos mais ativos metabolicamente, entretanto possui reservas energéticas extremamente pequenas em relação a sua demanda energética metabólica (Dickinson 1996).

A glicose é o principal metabólito energético no cérebro (Erecińska e Silver 1994). Em condições normais o metabolismo energético nos tecidos neurais é mantido, quase que exclusivamente, pelo metabolismo oxidativo da glicose (Sokoloff 1993). A oxidação da glicose no cérebro ocorre mais rapidamente do que em outros órgãos como fígado, coração ou rins. Em contraste com outros tecidos, o cérebro não necessita de insulina para captar e oxidar a glicose. Entretanto, no jejum, corpos cetônicos podem substituir mais de 50% das necessidades energéticas cerebrais (Dickinson 1996).

A oxidação da glicose através da via glicolítica forma piruvato, que é convertido a CO_2 e H_2O no ciclo do ácido cítrico e na cadeia transportadora de elétrons. O acoplamento entre a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa gera grande parte do ATP necessário ao cérebro (Erecińska e Silver 1994).

É bem conhecido que no cérebro a fosforilação oxidativa fornece em torno de 95% de todo o ATP sintetizado. O mecanismo que auxilia a manutenção dos níveis cerebrais de ATP é o sistema da creatina quinase. A creatina quinase está presente tanto no citosol quanto ligada às membranas mitocondriais e catalisa a transferência reversível de um fosfato entre a fosfocreatina e o ATP. O alto fluxo da reação na direção da síntese de ATP, em situações de consumo de ATP, indica que a reação é crucial para a manutenção de concentrações constantes dos substratos energéticos no citosol. O sistema creatina/fosfocreatina/creatina quinase tem sido associado a algumas funções particularmente importantes para o cérebro: tamponamento energético (através da regeneração do ATP a da manutenção de níveis baixos

de ADP) e transferência de ATP de sítios de produção para outros de consumo (Erecińska e Silver 1994).

I.1.10 Metabolismo Energético e Doenças Neurodegenerativas

Numerosas hipóteses têm sido propostas para explicar a fisiopatologia das doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson, sem, no entanto, obter até o momento uma explicação satisfatória para o dano cerebral dessas doenças. Entretanto acredita-se que possíveis mecanismos envolvam deficiência no metabolismo energético, estresse oxidativo e neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, ou, possivelmente, um somatório desses fatores (Rose e Henneberry 1994). Uma das hipóteses é de que alterações na cadeia transportadora de elétrons seria o evento etiológico primário na maioria dessas doenças (Parker et al., 1990; Swerdlow et al., 1998).

O cérebro é altamente dependente de energia para seu funcionamento normal e a mitocôndria é a estrutura intracelular que mantém os suprimentos de energia para o cérebro. Uma alteração funcional nessa estrutura pode levar, portanto, a alterações patológicas nos neurônios e astrócitos (Beal 1995; Bowling e Beal 1995; Davis et al., 1995). Mutações no DNA mitocondrial e reações envolvendo geração de espécies reativas podem danificar a mitocôndria e diminuir a atividade dos complexos da cadeia respiratória. Uma diminuição no transporte de elétrons, além de causar um prejuízo na produção de ATP, leva a uma dispersão dos elétrons na forma de radicais livres potencialmente danosos a célula.

Numerosas evidências relacionam doenças neurodegenerativas a uma diminuição no metabolismo energético. Estudos demonstraram uma redução na atividade do complexo I da cadeia respiratória em cérebros *postmortem* de pacientes portadores de doença de Parkinson (Janetzky et al., 1994; Schapira et al., 1989). Também há relatos de defeitos nos complexos II e III da cadeia respiratória e na enzima α -cetoglutarato desidrogenase, importante enzima do ciclo do ácido cítrico, nessa doença (Mizuno et al., 1990).

Na doença de Alzheimer, a mais comum dentre as doenças neurodegenerativas, é encontrada principalmente uma redução na atividade do complexo IV da cadeia respiratória (Maurer et al., 2000). Estudos em cérebros *postmortem* demonstraram uma diminuição na atividade do complexo enzimático da piruvato desidrogenase e na atividade da enzima α -cetoglutarato desidrogenase na doença de Alzheimer (Gibson et al., 1988; Mastrogiacomo et al., 1993; Perry et al., 1980).

I.2. OBJETIVOS

I.2.1 Objetivo geral

Investigar a influência *in vitro* dos ácidos fitânico (Fit) e pristânico (Prist) sobre a homeostase energética através da determinação de vários parâmetros do metabolismo energético em cérebro de ratos jovens.

I.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do Fit sobre as atividades dos complexos enzimáticos I, I-III, II, II-III e IV da cadeia respiratória, da creatina quinase (CK) e da Na^+, K^+ -ATPase sináptica cerebelo de ratos jovens;
- Avaliar os efeitos do Fit sobre os parâmetros respiratórios estados 3, 4 e índice de controle respiratório (RCR), medidos através do consumo de oxigênio, além do potencial de membrana mitocondrial, o conteúdo dos equivalentes reduzidos NADH e NAD(P)H e o inchamento mitocondrial em cerebelo de ratos jovens;
- Avaliar os efeitos do Prist sobre as atividades dos complexos enzimáticos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória, da CK e da Na^+, K^+ -ATPase sináptica cérebro de ratos jovens;
- Avaliar os efeitos do Prist sobre os parâmetros respiratórios estados 3, 4, RCR e razão ADP/O, medidos através do consumo de oxigênio, além

do potencial de membrana mitocondrial, o conteúdo dos equivalentes reduzidos NADH e NAD(P)H e o inchamento mitocondrial em cérebro de ratos jovens.

PARTE II

Artigos Científicos

Capítulo I

**Marked inhibition of Na⁺, K⁺ -ATPase activity and the respiratory chain by
phytanic acid in cerebellum from young rats: possible underlying
mechanisms of cerebellar ataxia in Refsum disease**

Estela Natacha Brandt Busanello, Ângela Zanatta, Anelise Miotti Tonin,
Carolina Maso Viegas, Carmen Regla Vargas, Guilhian Leipnitz, César Augusto
João Ribeiro e Moacir Wajner

Artigo científico aceito para publicação no periódico
Journal of Bioenergetics and Biomembranes

INSERIR AQUI O ARTIGO 1

Capítulo II

Disruption of mitochondrial homeostasis by phytanic acid in cerebellum of young rats

Estela Natacha Brandt Busanello, Alexandre Umpierrez Amaral, Anelise Miotti
Tonin, Ângela Zanatta, Carolina Maso Viegas, Carmen Regla Vargas, Moacir
Wajner

Artigo científico aceito para publicação no periódico

Cerebellum

INSERIR AQUI O ARTIGO 2

Capítulo III

**Neurochemical evidence that pristanic acid impairs energy production
and inhibits synaptic Na⁺, K⁺-ATPase activity in brain of young rats**

Estela Natacha Brandt Busanello, Carolina Maso Viegas, Anelise Miotti Tonin,
Mateus Grings, Alana Pimentel Moura, Anderson Búker de Oliveira, Paula
Eichler, Moacir Wajner

Artigo científico publicado no periódico

Neurochemical Research 36: 1101-1107 (2011)

INSERIR AQUI O ARTIGO 3

Capítulo IV

Experimental evidence that pristanic acid disrupts mitochondrial homeostasis in brain of young rats

Estela Natacha Brandt Busanello, Alexandre Umpierrez Amaral, Anelise Miotti
Tonin, Mateus Grings, Alana Pimentel Moura, Paula Eichler, Carmen Regla
Vargas, Moacir Wajner

Artigo científico publicado no periódico
Journal of Neuroscience Research 90: 597-605 (2012)

INSERIR AQUI O ARTIGO 4

PARTE III

Discussão e Conclusões

III.1. DISCUSSÃO

As doenças peroxissomais são distúrbios causados por defeitos na biogênese dos peroxissomos ou pela ausência de uma atividade enzimática peroxissomal específica, resultando no acúmulo tecidual do ácido fitânico (Fit) e/ou do ácido pristânico (Prist) nos pacientes afetados. No seu conjunto, esses distúrbios apresentam uma prevalência estimada de 1:20.000 a 1:100.000 nascidos vivos (Mclean et al., 2002; Scriver et al., 2001). Embora as manifestações clínicas dos afetados por essas doenças sejam variáveis, sintomas neurológicos e anormalidades cerebrais (principalmente no córtex cerebral e cerebelo) são predominantes (Verhoeven e Jakobs 2001). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiopatológicos do dano cerebral que acomete os pacientes portadores dessas doenças. Neste contexto, é possível que o acúmulo do Fit e do Prist possam ser neurotóxicos. Vários estudos experimentais apontam para essa hipótese. Foi verificado que o Fit causa morte celular em astrócitos de hipocampo de ratos precedida por um aumento significativo na produção de ânion superóxido, despolarização do potencial da membrana mitocondrial e liberação do citocromo c, além de reduzir os níveis celulares de ATP e facilitar a abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PTP) (Kahlert et al., 2005). Nosso laboratório observou recentemente que este ácido graxo induz dano oxidativo e reduz as defesas antioxidantes em cérebro de ratos, além de alterar a homeostase energética mitocondrial e a atividade sináptica da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral (Leipnitz et al., 2010). Por outro lado, demonstrou-se que o Prist é citotóxico para células neurais cultivadas, alterando a homeostase intracelular do Ca^{2+} , causando despolarização mitocondrial e morte celular. Foi

também verificado que o Prist induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) predominantemente em neurônios e o que o Fit possui uma ação semelhante, mas de menor grau (Rönicke et al., 2009).

A mitocôndria, além de ser fundamental para a geração de energia envolvida nos processos celulares, participa ativamente na geração de espécies reativas e na homeostase intracelular do Ca^{2+} (Nicholls e Akerman 1982). Alterações nestes processos podem levar à morte celular (Liu et al., 1996).

O objetivo da presente investigação foi avaliar o efeito do Fit e do Prist sobre importantes parâmetros de metabolismo energético e homeostase mitocondrial ainda não estudados em cérebro e cerebelo de ratos jovens. Avaliamos o efeito desses compostos, em concentrações similares às que se encontram nos tecidos de doenças peroxissomais onde eles se acumulam, sobre o transporte de elétrons pela cadeia respiratória (atividades dos complexos I-IV), a transferência intracelular de energia (atividade da creatina quinase) e a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, bem como sobre os parâmetros respiratórios estados 3 e 4, índice de controle respiratório (RCR), além do potencial de membrana, o conteúdo dos equivalentes reduzidos NADH e NAD(P)H e o inchamento mitocondrial.

No capítulo I, verificamos que o Fit inibiu acentuadamente a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em cerebelo de ratos de maneira dose-dependente em todas as concentrações testadas, sugerindo que a neurotransmissão possa estar prejudicada pelo Fit, já que esta enzima é responsável pela manutenção do potencial de membrana celular necessário para a excitabilidade neuronal (Erecinska et al., 2004; Erecińska e Silver 1994). Antioxidantes endógenos

(GSH e α -tocoferol) não foram capazes de prevenir a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pelo Fit, o que sugere que dano oxidativo a grupamentos vulneráveis da enzima provavelmente não está envolvido nesse efeito. Por outro lado, a atividade da enzima creatina quinase (CK) não foi alterada pelo Fit, sugerindo que esse ácido graxo não interfere com a transferência intracelular de energia.

Também observamos que o Fit diminuiu significativamente as atividades dos complexos I, I-III, II e II-III, sem alterar a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em preparações de cerebelo de ratos, sugerindo uma ação seletiva para o Fit. Presumimos, portanto, que o efeito inibidor desse ácido graxo sobre o transporte de elétrons pela cadeia respiratória possa potencialmente diminuir a produção de ATP. Esses resultados, aliados a estudos anteriores de nosso laboratório e de outros grupos realizados em hipocampo e córtex cerebral de ratos, indicam que um déficit da fosforilação oxidativa cerebral causada pelo Fit possa estar implicada no dano neurológico apresentado por pacientes com doenças peroxissomais com acúmulo desse composto (Busanello et al., 2010; Schönfeld et al., 2004; Schönfeld e Reiser 2006).

Considerando que a Na^+, K^+ -ATPase está ancorada em membranas sinápticas e que sua atividade depende da interação com os lipídeos da membrana e que os complexos da cadeia respiratória são componentes da membrana mitocondrial interna, investigamos se essas atividades poderiam estar alteradas pela incorporação do Fit em membranas biológicas e consequente interação com a enzima Na^+, K^+ -ATPase e com os complexos da cadeia respiratória. Nossos experimentos revelaram que o Fit aumentou

significativamente a fluidez de membranas plasmáticas sinápticas refletida pela diminuição da anisotropia (r). Presume-se, portanto que o aumento da fluidez da membrana plasmática sináptica esteja relacionado com a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase provocada pelo Fit provavelmente alterando as interações entre lipídeos e proteínas onde a enzima está inserida (Carfagna e Muhoberac 1993). Além disso, esse ácido graxo provocou um aumento discreto na fluidez de membranas mitocondriais, o que pode ser explicado pela diferença na proporção de lipídeos e proteínas que compõe as membranas mitocondriais (20/80) relativamente à membrana sináptica (45/55). Estudos prévios demonstraram que o Fit pode ser incorporado em membranas biológicas, causando uma distorção na disposição dos fosfolipídeos de membrana, o que corrobora com nossos achados de aumento na fluidez de membranas celulares causado por esse ácido graxo (Yue et al., 1988 Steinberg, 1995).

Nossos resultados de anisotropia moderada nas membranas mitocondriais não explicam totalmente as inibições importantes (até 80 %) dos complexos da cadeia respiratória pelo Fit, indicando que essas inibições possam ser devidas a outros mecanismos.

No capítulo II, investigamos o efeito do Fit sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de cerebelo de ratos. Observamos que o Fit diminuiu o estado 3 da respiração celular utilizando glutamato/malato, glutamato ou α -cetoglutarato como substratos. Acreditamos que a inibição acentuada da cadeia respiratória observada no capítulo I possa estar relacionada com a redução do estado 3 da respiração verificada, limitando o

fluxo de elétrons provenientes do glutamato/malato e reforçando o papel desse ácido graxo como um inibidor metabólico.

Além disso, o Fit aumentou o estado 4 da respiração mitocondrial e diminuiu os valores do RCR, indicando que o mesmo atua como desacoplador da fosforilação oxidativa. Tendo em vista que o translocador de nucleotídeos adenina (ANT) está envolvido no efeito desacoplador de alguns ácidos graxos (Brustovetsky et al., 1990; Samartsev et al., 2000; Skulachev 1998), testamos o efeito do inibidor da ANT atractilosídeo (ATC) sobre o consumo de oxigênio no estado 4 na presença do Fit. Observamos que o efeito desacoplador do Fit não foi prevenido pelo ATC, indicando que o ANT provavelmente não está envolvido neste desacoplamento, atuando, portanto, por um mecanismo distinto de outros ácidos graxos. Uma alternativa para explicar nossos achados seria a de que o Fit altera moderadamente a fluidez da membrana mitocondrial, o que poderia modificar a permeabilidade a íons, conforme achados prévios descritos no capítulo I (Abeywardena et al., 1983; Kimelberg e Papahadjopoulos 1974).

O Fit também diminuiu significativamente o potencial de membrana mitocondrial e esse efeito foi atenuado pela adição de NAC, sugerindo o envolvimento de espécies reativas de oxigênio. Além disso, o conteúdo de equivalentes reduzidos (NAD(P)H) na matriz mitocondrial também foi diminuído pelo Fit, o que reforça o papel desacoplador desse ácido graxo, visto que desacopladores dissipam o potencial de membrana, levando a um aumento do consumo de equivalentes reduzidos para a manutenção do potencial. Por outro lado, o inchamento mitocondrial não foi alterado na presença do Fit, sugerindo

que esse ácido graxo provavelmente não é capaz de facilitar a abertura do PTP.

Tomamos em conjunto, os achados dos capítulos I e II indicam que o Fit atua como um desacoplador e como um inibidor metabólico, prejudicando a fosforilação oxidativa, além de possivelmente alterar a neurotransmissão por sua ação inibitória sobre a enzima Na^+, K^+ -ATPase.

Investigamos também o papel do Prist sobre a homeostase energética e a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase sináptica em córtex cerebral de ratos jovens. Assim, observamos que as atividades dos complexos I, II e II-III da cadeia respiratória foram inibidas de maneira acentuada pelo Prist, o que não ocorreu com a atividade do complexo IV (capítulo III). Esses dados mostram que esse ácido graxo prejudica a função da cadeia respiratória, com provável reflexo negativo para a fosforilação oxidativa. Uma consequência desse bloqueio da transferência de elétrons pela cadeia respiratória poderia secundariamente levar a uma inibição da atividade do CAC. Assim, testamos o efeito do Prist sobre a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato. Verificamos que o Prist diminuiu significativamente esse parâmetro, indicando um efeito inibitório desse ácido graxo sobre o CAC. Esse efeito não ocorreu por falta de CoA devido a uma possível competição entre Prist e acetato pela ligação com essa coenzima, formando acetil-CoA, pois observamos que a adição de excesso de CoA no meio de incubação não preveniu o efeito inibitório do Prist sobre a produção de $^{14}\text{CO}_2$. Esses dados indicam que a inibição do transporte de elétrons pela cadeia respiratória possa ter levado à

inibição deste ciclo, embora não se possa afastar a possibilidade do Prist inibir uma ou mais enzimas do CAC em córtex cerebral.

Por outro lado, o Prist não alterou a atividade da enzima CK em córtex cerebral, sugerindo que a transferência de energia intracelular não foi alterada por esse ácido graxo. Observamos também uma inibição marcada na atividade da enzima sináptica Na^+, K^+ -ATPase causada pelo Prist, indicando que a neurotransmissão possa estar afetada. O efeito inibitório do Prist sobre essa atividade não foi alterado pelo antioxidante GSH, tornando pouco provável um dano oxidativo por espécies reativas causado pelo ácido a grupos suscetíveis da enzima. Não se pode no entanto afastar a possibilidade de que o Prist se insira na membrana plasmática alterando sua fluidez e indiretamente reduzindo a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, como ocorre com outros compostos hidrofóbicos (Abeywardena et al., 1983; Schönfeld e Struy 1999; Steinberg 1995).

Observamos também que o Prist aumentou o estado 4 da respiração mitocondrial e diminuiu os valores do RCR, refletindo uma possível ação desacopladora da fosforilação oxidativa desse ácido graxo (capítulo IV). Observamos também que o ATC não alterou o aumento do consumo de oxigênio no estado 4 da respiração, sugerindo que o Prist provavelmente atue por um mecanismo distinto de outros ácidos graxos, não interferindo no ANT. O conteúdo de equivalentes reduzidos de NAD(P)H na matriz mitocondrial foi reduzido na presença do Prist e esse achado reforça o efeito desacoplador desse ácido graxo, uma vez que desacopladores estimulam a oxidação do NADH. Além disso, a redução do pool de NAD(P)H foi totalmente restabelecido

com a adição de rotenona, indicando que não houve perda desses equivalentes reduzidos pela matriz mitocondrial. O Prist também diminuiu significativamente o potencial de membrana mitocondrial, o que também é explicado por um efeito desacoplador causado por esse ácido graxo, visto que desacopladores dissipam o potencial de membrana. Por outro lado, a redução do potencial de membrana não foi prevenida pela adição de NAC, sugerindo que essa diminuição provavelmente não foi devido à abertura do PTP que é induzido por espécies reativas. Nesse particular, nossos resultados anteriores mostrando que o NAC atenua a redução do potencial de membrana pelo Fit, sugerem uma ação diferenciada dos dois ácidos graxos testados (Fit e Prist) neste parâmetro.

Além disso, o Prist diminuiu o estado 3 da respiração celular, corroborando com as inibições marcadas dos vários complexos da cadeia respiratória com provável redução do fluxo de elétrons através dessa cadeia, atuando como um inibidor metabólico. Também verificamos que a razão ADP/O foi diminuída na presença do Prist, indicando uma redução na eficiência do acoplamento da fosforilação oxidativa, corroborando com os achados anteriores de que o Prist atua como um desacoplador (Brand e Nicholls 2011).

O Prist também provocou inchamento mitocondrial que foi prevenido pela ciclosporina A, um bloqueador clássico do PTP, indicando um envolvimento da abertura do PTP nesse efeito. O inchamento mitocondrial causado pelo Prist também foi prevenido pelo NAC, permeável a membranas celulares, refletindo uma possível oxidação de grupamentos tióis do PTP por esse ácido. Esse achado está de acordo com um estudo anterior de nosso grupo, demonstrando

que o Prist causa dano oxidativo lipídico e proteico, além de reduzir os níveis de GSH (Leipnitz et al., 2011). Entretanto, o inchamento mitocondrial provocado pelo Prist não foi alterado pelo agente redutor ditiotreitol não permeável a membranas celulares, indicando que uma oxidação externa à mitocôndria provocada por esse ácido graxo é improvável sob nossas condições experimentais.

Com base nestes dados, acreditamos que o Prist atue como um forte desacoplador e inibidor metabólico, facilitando a abertura do PTP bem como apoptose e morte celular (Kowaltowski et al., 2001; Rasola e Bernardi 2011).

Devemos enfatizar que os efeitos significantes obtidos com o Fit e o Prist ocorreram em concentrações similares ou mesmo inferiores (10-200 μM) às encontradas nos tecidos dos pacientes afetados por doenças peroxissomais caracterizadas pelo acúmulo desses compostos, o que indica que nossos resultados são de relevância patológica. Por outro lado, os efeitos obtidos pelo Prist foram de maior intensidade relativamente aos causados pelo Fit nas mesmas concentrações, o que poderia indicar uma neurotoxicidade maior para o Prist. No entanto, devemos ainda levar em conta que o Fit acumula-se em concentrações maiores na doença de Refsum (5000 μM), doença de Zellweger (Fit= 500 μM ; Prist= 90 μM) e na deficiência da proteína D-bifuncional (Fit= 190 μM ; Prist= 80 μM). No entanto, o Prist possui concentrações mais elevadas (300 μM) relativamente as do Fit (25 μM) na deficiência da AMACR.

Os resultados da presente investigação indicam que os principais metabólitos acumulados em desordens peroxissomais exercem efeitos deletérios importantes sobre o sistema nervoso central, alterando a

homeostase energética mitocondrial e uma atividade essencial (Na^+ , K^+ -ATPase) para a manutenção do potencial de membrana celular necessária para a neurotransmissão, que podem estar envolvidos na disfunção neurológica e nas anormalidades cerebrais e cerebelares característicos nos pacientes afetados por dessas doenças. É possível que a disfunção mitocondrial atue sinergicamente com outros mecanismos patológicos como o estresse oxidativo (Adam-Vizi e Starkov 2010; Kowaltowski et al., 2009; Kowaltowski e Vercesi 1999), levando ao dano neurológico nessas doenças. Acreditamos, portanto, que os achados deste trabalho possam auxiliar na elucidação na patogenia do dano cerebral dos pacientes com doenças peroxissomais com acúmulo dos ácidos Fit e/ou Prist, servindo como base para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento e na melhora da qualidade de vida dos portadores dessas doenças.

III.2. CONCLUSÕES

III.2.1 Efeitos do ácido fitânico (Fit) sobre a homeostase energética mitocondrial e atividade da Na^+, K^+ -ATPase em cerebelo de ratos

- O Fit funciona como inibidor metabólico, reduzindo atividades de vários complexos da cadeia respiratória e diminuindo o estado 3 da respiração celular. Tais achados indicam um prejuízo da fosforilação oxidativa causada por esse ácido graxo.
- O Fit não altera a atividade da enzima creatina quinase (CK), sugerindo que esse metabólito não compromete a transferência intracelular de energia.
- O Fit diminui a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase, indicando que esse ácido graxo potencialmente prejudica a neurotransmissão.
- O Fit atua como desacoplador da fosforilação oxidativa, aumentando o estado 4 da respiração, diminuindo o índice de controle respiratório (RCR), o potencial de membrana e os equivalentes reduzidos da matriz mitocondrial.

III.2.2 Efeitos do ácido pristânico (Prist) sobre a homeostase energética mitocondrial e atividade da Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos

- O ácido pristânico (Prist) reduz atividades de vários complexos da cadeia respiratória, a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato e o estado 3 da respiração celular, indicando que o mesmo funciona como um inibidor metabólico, prejudicando o funcionamento do ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa.

- O Prist não reduz a atividade da enzima CK em córtex cerebral cerebral, sugerindo que esse ácido graxo não compromete a transferência intracelular de energia.
- O Prist diminuiu a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral, indicando que esse ácido graxo altera o potencial de membrana necessário para a manutenção da excitabilidade neuronal.
- O Prist atua como desacoplador da fosforilação oxidativa, por aumentar o estado 4 e diminuir RCR, a razão ADP/O, o potencial de membrana mitocondrial e o conteúdo de equivalentes reduzidos de NAD(P)H na matriz mitocondrial em cérebro total.
- O Prist provoca inchamento mitocondrial que é prevenido tanto pela adição de ciclosporina quanto pela adição de NAC, demonstrando o envolvimento do PTP nesse efeito, provavelmente através de mecanismos oxidativos em cérebro.

III.3. PERSPECTIVAS

- Investigar o efeito *in vitro* do ácido pristânico (Prist) sobre a homeostase energética mitocondrial e a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em cerebelo de ratos jovens;
- Avaliar o efeito *in vitro* dos ácidos fitânico (Fit) e Prist sobre parâmetros do metabolismo energético em coração de ratos;
- Avaliar o efeito *ex vivo* através de injeção intracerebroventricular (icv) dos ácidos Fit e Prist sobre parâmetros do metabolismo energético e estresse oxidativo em cérebro de ratos;
- Realizar estudos histopatológicos em cérebro de ratos injetados icv com os ácidos Fit e Prist.

REFERÊNCIAS

Abeywardena M. Y., Allen T. M., Charnock J. S. (1983) Lipid-protein interactions of reconstituted membrane-associated adenosinetriphosphatases. Use of a gel-filtration procedure to examine phospholipid-activity relationships. *Biochim Biophys Acta* 729 (1):62-74. doi:0005-2736(83)90456-X [pii]

Adam-Vizi V., Starkov A. A. (2010) Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2:S413-426. doi:NL0241958050WK3P [pii] 10.3233/JAD-2010-100465

Allen N., Grace P., Ginn A., Travis R., Roddam A., Appleby P., Key T. (2008) Phytanic acid: measurement of plasma concentrations by gas-liquid chromatography-mass spectrometry analysis and associations with diet and other plasma fatty acids. *Br J Nutr* 99 (3):653-659. doi:S000711450782407X [pii]10.1017/S000711450782407X

Baes M., Huyghe S., Carmeliet P., Declercq P., Collen D., Mannaerts G., Van Veldhoven P. (2000) Inactivation of the peroxisomal multifunctional protein-2 in mice impedes the degradation of not only 2-methyl-branched fatty acids and bile acid intermediates but also of very long chain fatty acids. *J Biol Chem* 275 (21):16329-16336. doi:M001994200 [pii] 10.1074/jbc.M001994200

Bams-Mengerink A. M., Majoie C. B., Duran M., Wanders R. J., Van Hove J., Scheurer C. D., Barth P. G., Poll-The B. T. (2006) MRI of the brain and cervical spinal cord in rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Neurology* 66 (6):798-803; discussion 789. doi:66/6/798 [pii] 10.1212/01.wnl.0000205594.34647.d0

Barić I., Fumić K., Hoffmann G. (2001) Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. *Croat Med J* 42 (4):379-383

Beal M. (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 38 (3):357-366. doi:10.1002/ana.410380304

Berger J., Wagner J. (2002) Physiological and therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptors. *Diabetes Technol Ther* 4 (2):163-174

Bickel H. (1987) Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme* 38 (1-4):14-26

Bowling A., Beal M. (1995) Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci* 56 (14):1151-1171. doi:002432059500055B [pii]

Brand M. D., Nicholls D. G. (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435 (2):297-312. doi:BJ20110162 [pii] 10.1042/BJ20110162

Braverman N., Zhang R., Chen L., Nimmo G., Scheper S., Tran T., Chaudhury R., Moser A., Steinberg S. (2010) A Pex7 hypomorphic mouse model for

plasmalogen deficiency affecting the lens and skeleton. *Mol Genet Metab* 99 (4):408-416. doi:S1096-7192(09)00526-5 [pii] 10.1016/j.ymgme.2009.12.005

Brustovetsky N. N., Dedukhova V. I., Egorova M. V., Mokhova E. N., Skulachev V. P. (1990) Inhibitors of the ATP/ADP antiporter suppress stimulation of mitochondrial respiration and H⁺ permeability by palmitate and anionic detergents. *FEBS Lett* 272 (1-2):187-189. doi:0014-5793(90)80480-7 [pii]

Busanello E., Viegas C., Moura A., Tonin A., Grings M., Vargas C., Wajner M. (2010) In vitro evidence that phytanic acid compromises Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase activity and the electron flow through the respiratory chain in brain cortex from young rats. *Brain Res* 1352:231-238. doi:S0006-8993(10)01538-6 [pii] 10.1016/j.brainres.2010.07.012

Cakirer S., Savas M. R. (2005) Infantile Refsum disease: serial evaluation with MRI. *Pediatr Radiol* 35 (2):212-215. doi:10.1007/s00247-004-1332-3

Carfagna M. A., Muhoberac B. B. (1993) Interaction of tricyclic drug analogs with synaptic plasma membranes: structure-mechanism relationships in inhibition of neuronal Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase activity. *Mol Pharmacol* 44 (1):129-141

Chow C. W., Poulos A., Fellenberg A. J., Christodoulou J., Danks D. M. (1992) Autopsy findings in two siblings with infantile Refsum disease. *Acta Neuropathol* 83 (2):190-195

Davis J., Hunnicutt E. J., Chisholm J. (1995) A mitochondrial bottleneck hypothesis of Alzheimer's disease. *Mol Med Today* 1 (5):240-247

Dickinson C. (1996) Cerebral oxidative metabolism in hypertension. *Clin Sci (Lond)* 91 (5):539-550

Erecinska M., Cherian S., Silver I. (2004) Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol* 73 (6):397-445. doi:S0301-0082(04)00104-2 [pii] 10.1016/j.pneurobio.2004.06.003

Erecińska M., Silver I. (1994) Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 43 (1):37-71. doi:0301-0082(94)90015-9 [pii]

Ferdinandusse S., Denis S., Clayton P., Graham A., Rees J., Allen J., McLean B., Brown A., Vreken P., Waterham H., Wanders R. (2000) Mutations in the gene encoding peroxisomal alpha-methylacyl-CoA racemase cause adult-onset sensory motor neuropathy. *Nat Genet* 24 (2):188-191. doi:10.1038/72861

Ferdinandusse S., Finckh B., de Hingh Y., Stroomer L., Denis S., Kohlschütter A., Wanders R. (2003) Evidence for increased oxidative stress in peroxisomal D-bifunctional protein deficiency. *Mol Genet Metab* 79 (4):281-287. doi:S1096719203001082 [pii]

Ferdinandusse S., Rusch H., van Lint A., Dacremont G., Wanders R., Vreken P. (2002) Stereochemistry of the peroxisomal branched-chain fatty acid alpha- and beta-oxidation systems in patients suffering from different peroxisomal disorders. *J Lipid Res* 43 (3):438-444

Ferdinandusse S., Ylianttila M., Gloerich J., Koski M., Oostheim W., Waterham H., Hiltunen J., Wanders R., Glumoff T. (2006) Mutational spectrum of D-bifunctional protein deficiency and structure-based genotype-phenotype analysis. *Am J Hum Genet* 78 (1):112-124. doi:S0002-9297(07)60810-6 [pii] 10.1086/498880

Ferdinandusse S., Zomer A., Komen J., van den Brink C., Thanos M., Hamers F., Wanders R., van der Saag P., Poll-The B., Brites P. (2008) Ataxia with loss of Purkinje cells in a mouse model for Refsum disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (46):17712-17717. doi:0806066105 [pii] 10.1073/pnas.0806066105

Gibson G., Sheu K., Blass J., Baker A., Carlson K., Harding B., Perrino P. (1988) Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 45 (8):836-840

Gloerich J., van Vlies N., Jansen G., Denis S., Ruiten J., van Werkhoven M., Duran M., Vaz F., Wanders R., Ferdinandusse S. (2005) A phytol-enriched diet induces changes in fatty acid metabolism in mice both via PPARalpha-dependent and -independent pathways. *J Lipid Res* 46 (4):716-726

Janetzky B., Hauck S., Youdim M., Riederer P., Jellinger K., Pantucek F., Zöchling R., Boissl K., 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 (1-2):126-128

Johnson D., Trinh M., Oe T. (2003) Measurement of plasma pristanic, phytanic and very long chain fatty acids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for the diagnosis of peroxisomal disorders. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 798 (1):159-162. doi:S1570023203007311 [pii]

Kahlert S., Schönfeld P., Reiser G. (2005) The Refsum disease marker phytanic acid, a branched chain fatty acid, affects Ca²⁺ homeostasis and mitochondria, and reduces cell viability in rat hippocampal astrocytes. *Neurobiol Dis* 18 (1):110-118. doi:S0969-9961(04)00197-4 [pii] 10.1016/j.nbd.2004.08.010

Kelley R. I., Datta N. S., Dobyns W. B., Hajra A. K., Moser A. B., Noetzel M. J., Zackai E. H., Moser H. W. (1986) Neonatal adrenoleukodystrophy: new cases, biochemical studies, and differentiation from Zellweger and related peroxisomal polydystrophy syndromes. *Am J Med Genet* 23 (4):869-901. doi:10.1002/ajmg.1320230404

Khan A., Wei X., Snyder F., Mah J., Waterham H., Wanders R. (2010) Neurodegeneration in D-bifunctional protein deficiency: diagnostic clues and

natural history using serial magnetic resonance imaging. *Neuroradiology*. doi:10.1007/s00234-010-0768-4

Kimelberg H. K., Papahadjopoulos D. (1974) Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on (Na⁺ + K⁺)-stimulated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 249 (4):1071-1080

Komen J., Distelmaier F., Koopman W., Wanders R., Smeitink J., Willems P. (2007) Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action. *Cell Mol Life Sci* 64 (24):3271-3281. doi:10.1007/s00018-007-7357-7

Kowaltowski A. J., Castilho R. F., Vercesi A. E. (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495 (1-2):12-15. doi:S0014-5793(01)02316-X [pii]

Kowaltowski A. J., de Souza-Pinto N. C., Castilho R. F., Vercesi A. E. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 47 (4):333-343. doi:S0891-5849(09)00269-X [pii] 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004

Kowaltowski A. J., Vercesi A. E. (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 26 (3-4):463-471. doi:S0891-5849(98)00216-0 [pii]

Leipnitz G., Amaral A., Zanatta A., Seminotti B., Fernandes C., Knebel L., Vargas C., Wajner M. (2010) Neurochemical evidence that phytanic acid induces oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in cerebellum and cerebral cortex of rats. *Life Sci* 87 (9-10):275-280. doi:S0024-3205(10)00267-5 [pii] 10.1016/j.lfs.2010.06.015

Leipnitz G., Amaral A. U., Fernandes C. G., Seminotti B., Zanatta A., Knebel L. A., Vargas C. R., Wajner M. (2011) Pristanic acid promotes oxidative stress in brain cortex of young rats: A possible pathophysiological mechanism for brain damage in peroxisomal disorders. *Brain Res* 1382:259-265. doi:S0006-8993(11)00050-3 [pii] 10.1016/j.brainres.2011.01.014

Liu X., Kim C., Yang J., Jemmerson R., Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86 (1):147-157. doi:S0092-8674(00)80085-9 [pii]

Maeda K., Kimura A., Yamato Y., Nittono H., Takei H., Sato T., Mitsubuchi H., Murai T., Kurosawa T. (2002) Oral bile Acid treatment in two Japanese patients with Zellweger syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35 (2):227-230

Mastrogiacomo F., Bergeron C., Kish S. (1993) Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 61 (6):2007-2014

Maurer I., Zierz S., Möller H. (2000) A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging* 21 (3):455-462. doi:S0197-4580(00)00112-3 [pii]

McLean B., Allen J., Ferdinandusse S., Wanders R. (2002) A new defect of peroxisomal function involving pristanic acid: a case report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72 (3):396-399

Mizuno Y., Suzuki K., Ohta S. (1990) Postmortem changes in mitochondrial respiratory enzymes in brain and a preliminary observation in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 96 (1):49-57

Möller G., van Grunsven E., Wanders R., Adamski J. (2001) Molecular basis of D-bifunctional protein deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 171 (1-2):61-70. doi:S0303-7207(00)00388-9 [pii]

Müller C., Nguyen T., Ahlemeyer B., Meshram M., Santrampurwala N., Cao S., Sharp P., Fietz P., Baumgart-Vogt E., Crane D. (2010) PEX13 deficiency in mouse brain as a model of Zellweger syndrome: abnormal cerebellum formation, reactive gliosis and oxidative stress. *Dis Model Mech*. doi:dmm.004622 [pii] 10.1242/dmm.004622

Nicholls D., Akerman K. (1982) Mitochondrial calcium transport. *Biochim Biophys Acta* 683 (1):57-88

Parker W. J., Boyson S., Luder A., Parks J. (1990) Evidence for a defect in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Huntington's disease. *Neurology* 40 (8):1231-1234

Perry E., Perry R., Tomlinson B., Blessed G., Gibson P. (1980) Coenzyme A-acetylating enzymes in Alzheimer's disease: possible cholinergic 'compartment' of pyruvate dehydrogenase. *Neurosci Lett* 18 (1):105-110. doi:0304-3940(80)90220-7 [pii]

Poll-The B. T., Gootjes J., Duran M., De Klerk J. B., Wenniger-Prick L. J., Admiraal R. J., Waterham H. R., Wanders R. J., Barth P. G. (2004) Peroxisome biogenesis disorders with prolonged survival: phenotypic expression in a cohort of 31 patients. *Am J Med Genet A* 126A (4):333-338. doi:10.1002/ajmg.a.20664

Powers J. M., Kenjarski T. P., Moser A. B., Moser H. W. (1999) Cerebellar atrophy in chronic rhizomelic chondrodysplasia punctata: a potential role for phytanic acid and calcium in the death of its Purkinje cells. *Acta Neuropathol* 98 (2):129-134

Rasola A., Bernardi P. (2011) Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* 50 (3):222-233. doi:S0143-4160(11)00077-7 [pii] 10.1016/j.ceca.2011.04.007

Reiser G., Schönfeld P., Kahlert S. (2005) Mechanism of toxicity of the branched-chain fatty acid phytanic acid, a marker of Refsum disease, in astrocytes involves mitochondrial impairment. *Int J Dev Neurosci* 24 (2-3):113-122

Roberts R., Chevalier S., Hasmall S., James N., Cosulich S., Macdonald N. (2002) PPAR alpha and the regulation of cell division and apoptosis. *Toxicology* 181-182:167-170. doi:S0300483X02002755 [pii]

Rönicke S., Kruska N., Kahlert S., Reiser G. (2009) The influence of the branched-chain fatty acids pristanic acid and Refsum disease-associated phytanic acid on mitochondrial functions and calcium regulation of hippocampal neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Neurobiol Dis* 36 (2):401-410. doi:S0969-9961(09)00224-1 [pii] 10.1016/j.nbd.2009.08.005

Rose C., Henneberry R. (1994) Etiology of the neurodegenerative disorders: a critical analysis. *Neurobiol Aging* 15 (2):233-234

Samartsev V. N., Simonyan R. A., Markova O. V., Mokhova E. N., Skulachev V. P. (2000) Comparative study on uncoupling effects of laurate and lauryl sulfate on rat liver and skeletal muscle mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1459 (1):179-190. doi:S0005-2728(00)00146-8 [pii]

Schapira A., Cooper J., Dexter D., Jenner P., Clark J., Marsden C. (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1 (8649):1269. doi:S0140-6736(89)92366-0 [pii]

Schönfeld P., Kahlert S., Reiser G. (2004) In brain mitochondria the branched-chain fatty acid phytanic acid impairs energy transduction and sensitizes for permeability transition. *Biochem J* 383 (Pt 1):121-128

Schönfeld P., Reiser G. (2006) Rotenone-like action of the branched-chain phytanic acid induces oxidative stress in mitochondria. *J Biol Chem* 281 (11):7136-7142. doi:M513198200 [pii] 10.1074/jbc.M513198200

Schönfeld P., Struy H. (1999) Refsum disease diagnostic marker phytanic acid alters the physical state of membrane proteins of liver mitochondria. *FEBS Lett* 457 (2):179-183. doi:S0014-5793(99)01009-1 [pii]

Scriver C. R., Beaudet A., Sly W., Valle D. (2001) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8 edn. McGraw-Hill, New York

Seedorf U. (1998) Peroxisomes in lipid metabolism. *J Cell Biochem Suppl* 30-31:158-167

Setchell K., Bragetti P., Zimmer-Nechemias L., Daugherty C., Pelli M., Vaccaro R., Gentili G., Distrutti E., Dozzini G., Morelli A. (1992) Oral bile acid treatment and the patient with Zellweger syndrome. *Hepatology* 15 (2):198-207. doi:S0270913992000302 [pii]

Setchell K., Heubi J., Bove K., O'Connell N., Brewsaugh T., Steinberg S., Moser A., Squires R. J. (2003) Liver disease caused by failure to racemize trihydroxycholestanic acid: gene mutation and effect of bile acid therapy. *Gastroenterology* 124 (1):217-232. doi:S0016508503500336 [pii] 10.1053/gast.2003.50017

Skulachev V. P. (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363 (2):100-124. doi:S0005-2728(97)00091-1 [pii]

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

Sokoloff L. (1993) Function-related changes in energy metabolism in the nervous system: localization and mechanisms. *Keio J Med* 42 (3):95-103

Steinberg D. (1995) Refsum Disease. In: McGraw-Hill (ed) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, vol II. New York, pp 2351-2369

Swerdlow R., Parks J., Cassarino D., Trimmer P., Miller S., Maguire D., Sheehan J., Maguire R., Pattee G., Juel V., Phillips L., Tuttle J., Bennett J. J., Davis R., Parker W. J. (1998) Mitochondria in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 153 (1):135-142. doi:S0014-4886(98)96866-2 [pii] 10.1006/exnr.1998.6866

Verhoeven N., Jakobs C. (2001) Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. *Prog Lipid Res* 40 (6):453-466. doi:S016378270100011X [pii]

Wanders R., Jansen G., Lloyd M. (2003) Phytanic acid alpha-oxidation, new insights into an old problem: a review. *Biochim Biophys Acta* 1631 (2):119-135

Wanders R., Jansen G., Skjeldal O. (2001) Refsum disease, peroxisomes and phytanic acid oxidation: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 60 (11):1021-1031

Wanders R., Komen J. (2007) Peroxisomes, Refsum's disease and the alpha- and omega-oxidation of phytanic acid. *Biochem Soc Trans* 35 (Pt 5):865-869

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

Wierzbicki A., Lloyd M. (2007) Dr Brian Gibberd (1931-2006): a pioneering clinician in Refsum's disease. *Biochem Soc Trans* 35 (Pt 5):862-864

Yeldandi A., Rao M., Reddy J. (2000) Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutat Res* 448 (2):159-177. doi:S0027-5107(99)00234-1 [pii]

Yue J., Thewalt J. L., Cushley R. J. (1988) Deuterium nuclear magnetic resonance study of the interaction of branched chain compounds (phytanic acid, phytol) with a phospholipid model membrane. *Chem Phys Lipids* 49 (3):205-213. doi:0009-3084(88)90008-4 [pii]

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. α -Oxidação peroxissomal.....	10
Figura 2. β -Oxidação do ácido pristânico.....	11
Figura 3. Função da enzima α -metil-acil-CoA racemase.....	11