

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS *EX VIVO* DOS ÁCIDOS 3-HIDRÓXI-3-
METIGLUTÁRICO E 3-METILGLUTÁRICO SOBRE PARÂMETROS DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM ESTRIADO EM RATOS JOVENS**

MATEUS STRUECKER DA ROSA

Porto Alegre, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS *EX VIVO* DOS ÁCIDOS 3-HIDRÓXI-3-METILGLUTÁRICO E 3-METILGLUTÁRICO SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ESTRIADO EM RATOS JOVENS

Mateus Struecker da Rosa

Orientador:

Prof. Dr. Guilhian Leipnitz

Co-orientadora:

M.Sc. Bianca Seminotti

Trabalho Experimental do Estágio em Pesquisa e Monografia

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Porto Alegre, 2012

*“As pessoas diferenciadas da sociedade
são aquelas que se diferenciam
no momento de solucionar os seus problemas.”*

(Mateus Struecker da Rosa)

AGRADECIMENTOS

*À Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
pelo ensino público, diferenciado e de muita qualidade.*

*Ao Guilhian,
por ter sido um mestre, um orientador, um amigo,
por estar ao meu lado nesta caminhada.*

*À Bianca,
por toda credibilidade e confiança depositada em mim,
pela paciência, pela dedicação e pela doação.*

*Ao Alexandre e ao César,
pelo companheirismo, pela amizade,
e por estarem sempre dispostos a ajudar.*

*A todos os demais colegas dos laboratórios 38 e 27,
pela companhia de todos os dias,
e por todos os momentos divertidos compartilhados.*

*Aos amigos e colegas,
no início unidos apenas por um objetivo comum,
e que aos poucos fomos nos aproximando,
lutamos, sobrevivemos, crescemos, acima de tudo como seres humanos.
E, por tudo, a saudade há de ficar.*

*À Débora,
por ser esta pessoa incrível, de uma alegria contagiante,
por estar sempre presente com um sorriso amigo,
por todo o amor, companheirismo, paciência,
e pelo apoio nas horas difíceis.*

*À minha família,
pela ajuda incondicional,
por ser um dos meus pilares mais fortes e importantes,
por toda a experiência e por todos ensinamentos compartilhados.*

*Ao meu pai,
que partiu deixando a lembrança da sua presença,
o som da sua voz soprando suave na memória,
por ter mostrado o caminho mais digno a ser seguido.*

*A minha mãe,
por emprestar a sua boca para que pudesse falar,
seus pés para que pudesse andar,
seu amor para que pudesse existir, e como se a existência fosse pouco,
deu parte de sua própria vida para que a minha existência tivesse algum sentido.*

SUMÁRIO

RESUMO	vii
I - INTRODUÇÃO	1
I.1. Erros Inatos do Metabolismo.....	1
I.2. Acidemias orgânicas	2
I.3. Acidemia 3-hidróxi-3-metilglutárica	3
<i>I.3.1. Achados clínicos e neuropatológicos</i>	<i>5</i>
<i>I.3.2. Diagnóstico</i>	<i>6</i>
<i>I.3.3. Tratamento</i>	<i>6</i>
<i>I.3.4. Fisiopatologia da acidúria 3-hidróxi-3-metilglutárica (HMGA)</i>	<i>7</i>
I.4. Radicais livres	8
<i>I.4.1. Definição</i>	<i>8</i>
<i>I.4.2. Mecanismos de dano celular induzido por radicais livres.....</i>	<i>9</i>
I.5. Defesas antioxidantes	10
I.6. Estresse oxidativo	10
I.7. Suscetibilidade cerebral do dano oxidativo	12
I.8. Estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas	12
II - TRABALHO EXPERIMENTAL	15
II.1. Artigo científico	15
III – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	37
IV – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMO

A acidúria 3-hidróxi-3-metilglutárica (HMGA), causada pela deficiência da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA liase (HL; EC 4.1.3.4), é um erro inato do metabolismo de herança autossômica recessiva. A HL catalisa a clivagem do 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA a acetoacetato e acetil-CoA, a qual é a última reação da síntese de corpos cetônicos e do catabolismo da leucina. Os indivíduos afetados pela HMGA apresentam acúmulo e elevada excreção urinária dos ácidos 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG), 3-metilglutárico (MGA), 3-metilglutacônico e 3-hidroxiisovalérico. Os pacientes apresentam predominantemente sintomas neurológicos, bem como hepatomegalia e cardiomiopatia, principalmente em situações de descompensação metabólica, quando ocorrem elevações drásticas nas concentrações dos metabólitos acumulados. Visto que os mecanismos fisiopatogênicos responsáveis pelo dano cerebral são pouco conhecidos, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos *ex vivo* da administração intraestriatal do HMG e do MGA sobre os parâmetros de estresse oxidativo substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), formação de carbonilas, concentrações de glutathione reduzida (GSH) e as atividades das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em estriado de ratos jovens 30 min após a injeção. Nossos resultados demonstraram que a administração de HMG e MGA induziu peroxidação lipídica (aumento nos níveis de TBA-RS) e dano oxidativo proteico (formação de carbonilas) no estriado. Além disso, o HMG e o MGA diminuíram as concentrações de GSH, o mais importante antioxidante cerebral. Finalmente, as injeções de HMG e MGA aumentaram significativamente a atividade da GPx e diminuíram as atividades da SOD e da GR. Por outro lado, apenas o HMG aumentou a atividade da CAT e diminuiu a atividade da G6PDH. Nossos achados sugerem que o estresse oxidativo induzido

in vivo pelo HMG e pelo MGA em estriado pode contribuir, pelo menos em parte, para a disfunção neurológica encontrada nos pacientes afetados pela HMGA.

Palavras-chave: acidúria 3-hidróxi-3-metilglutárica, estresse oxidativo, estriado.

I – INTRODUÇÃO

I.1. Erros Inatos do Metabolismo

Em 1908, Sir Archibald E. Garrod criou 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 dessa doença em indivíduos de uma mesma família e maior incidência de consanguinidade entre os pais dos pacientes. Baseando-se nas leis de Mendel e no fato de que os pais dos indivíduos afetados não apresentavam a doença, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio. Através da observação de que o ácido homogentísico presente em excesso na urina dos pacientes era um metabólito normal da degradação 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 essas 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; Scriver et al., 2001).

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 afetam aproximadamente 1 a cada 500-1000 recém nascidos vivos (Baric et al., 2001).

I.2. Acidemias Orgânicas

As acidemias ou acidúrias orgânicas constituem um grupo de EIM caracterizados pelo acúmulo de um ou mais ácidos orgânicos nos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes afetados devido à deficiência da atividade de enzimas do metabolismo de aminoácidos, lipídeos ou carboidratos (Chalmers e Lawson, 1982). A frequência dessas doenças na população em geral é pouco conhecida, o que pode ser creditado à falta de laboratórios especializados para o seu diagnóstico e ao desconhecimento médico sobre essas enfermidades. Na Holanda, país considerado referência para o diagnóstico de EIM, a incidência dessas doenças é estimada em 1: 2.200 recém-nascidos, enquanto que na Alemanha, Israel e Inglaterra é de aproximadamente 1: 6.000 - 1: 9.000 recém-nascidos (Hoffmann et al., 2004). Na Arábia Saudita, onde a taxa de consanguinidade é elevada, a frequência é de 1: 740 nascidos vivos (Rashed et al., 1994). Chalmers e colaboradores (1980) demonstraram que as acidemias orgânicas eram os EIM mais frequentes em crianças hospitalizadas, motivando diversos estudos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos nos anos seguintes.

Clinicamente os pacientes afetados por acidemias orgânicas apresentam predominantemente disfunção neurológica em suas mais diversas formas de expressão: regressão neurológica, convulsões, coma, ataxia, hipotonia, hipertonia, irritabilidade, tremores, movimentos coreatéticos, tetraparesia espástica, atraso no desenvolvimento psicomotor, retardo mental e outras manifestações. Os achados laboratoriais mais frequentes são cetose, cetonúria, neutropenia, trombocitopenia, acidose metabólica, baixos níveis de bicarbonato, hiperglicinemia, hiperamonemia, hipo / hiperglicemia, acidose láctica, aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres e outros (Scriver et al., 2001). Recentemente, com o uso da tomografia computadorizada, foram encontradas na maioria dos pacientes afetados por essas doenças alterações na substância branca (hipomielização e / ou desmielização), atrofia

cerebral generalizada ou dos gânglios da base (necrose ou calcificação), megaencefalia, atrofia frontotemporal e cerebelar (Mayatepek et al., 1996).

I.3. Acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica

A acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica (HMGA), causada pela deficiência da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase (HL; EC 4.1.3.4), é uma acidúria orgânica de herança autossômica recessiva inicialmente descrita por Faull e colaboradores (1976a; 1976b). A HL catalisa a clivagem do 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) a acetoacetato e acetil-CoA, a qual é a última reação da cetogênese e do catabolismo da leucina (Figura 1). Estudos demonstram a existência de 90-100 casos de HMGA no mundo, sendo que, com exceção da Arábia Saudita e Península Ibérica (Portugal e Espanha), onde a doença é prevalente, a HMGA é rara em países europeus e no Japão (Vargas et al., 2007; Menao et al., 2009). No Brasil, até 2007, 15 casos de pacientes portadores da HMGA haviam sido descritos (Vargas et al., 2007).

Duas isoformas da HL são encontradas, uma localizada na mitocôndria e a outra nos peroxissomos. A HL mitocondrial madura é um homodímero e o gene da enzima está localizado no cromossomo 1 (1p35.1-36.1), sendo composto por 9 éxons e 8 íntrons. A isoforma mitocondrial é composta por 298 resíduos de aminoácidos e contém uma sequência peptídica de 27 resíduos de aminoácidos na extremidade N-terminal, que sinaliza a entrada da enzima na mitocôndria. Dentro da mitocôndria, o peptídeo é removido, formando a enzima madura com 298 resíduos de aminoácidos. Por outro lado, a isoforma peroxissomal possui 325 resíduos de aminoácidos. Existe uma grande diversidade e heterogeneidade de mutações na deficiência da HL, porém, dentro de comunidades específicas o padrão pode ser mais homogêneo. As mutações c.122G>A e c.109G>A são prevalentes na Arábia Saudita e Península Ibérica, respectivamente. Apesar do conhecimento de diferentes mutações, não há

correlação entre o genótipo, a atividade enzimática e o prognóstico dos pacientes (Sweetman e Williams, 2001; Al-Sayed et al., 2006; Pié et al., 2007).

Devido ao defeito da HL, o principal metabólito acumulado na HMGA é o ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMG), derivado da hidrólise do HMG-CoA. Na urina de pacientes controlados, as concentrações de HMG variam entre 200-4.000 mmol / mol de creatinina (indivíduos normais nos primeiros meses de vida: 50-90 mmol / mol de creatinina). Contudo, durante crises de descompensação metabólica, esse metabólito pode alcançar níveis de 1.500-19.000 mmol / mol de creatinina. Com a reversibilidade da reação catalisada pela enzima 3-metilglutaconil-CoA hidratase, o ácido 3-metilglutacônico (MGT) também se encontra acumulado nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes. O MGT ainda pode ser hidrogenado a ácido 3-metilglutárico (MGA). Também devido à reversibilidade da enzima 3-metilcrotonil-CoA carboxilase, altas concentrações de 3-metilcrotonil-CoA são encontradas e este metabólito pode ser hidratado, gerando ácido 3-hidroxiisovalérico (OHIVA) (Figura I.1). Além disso, durante as crises de descompensação metabólica são detectadas altas concentrações dos ácidos glutárico e adípico. Outros metabólitos importantes encontrados acumulados na urina dos pacientes são as acilcarnitinas (Bonafé et al., 2000; Sweetman e Williams, 2001).

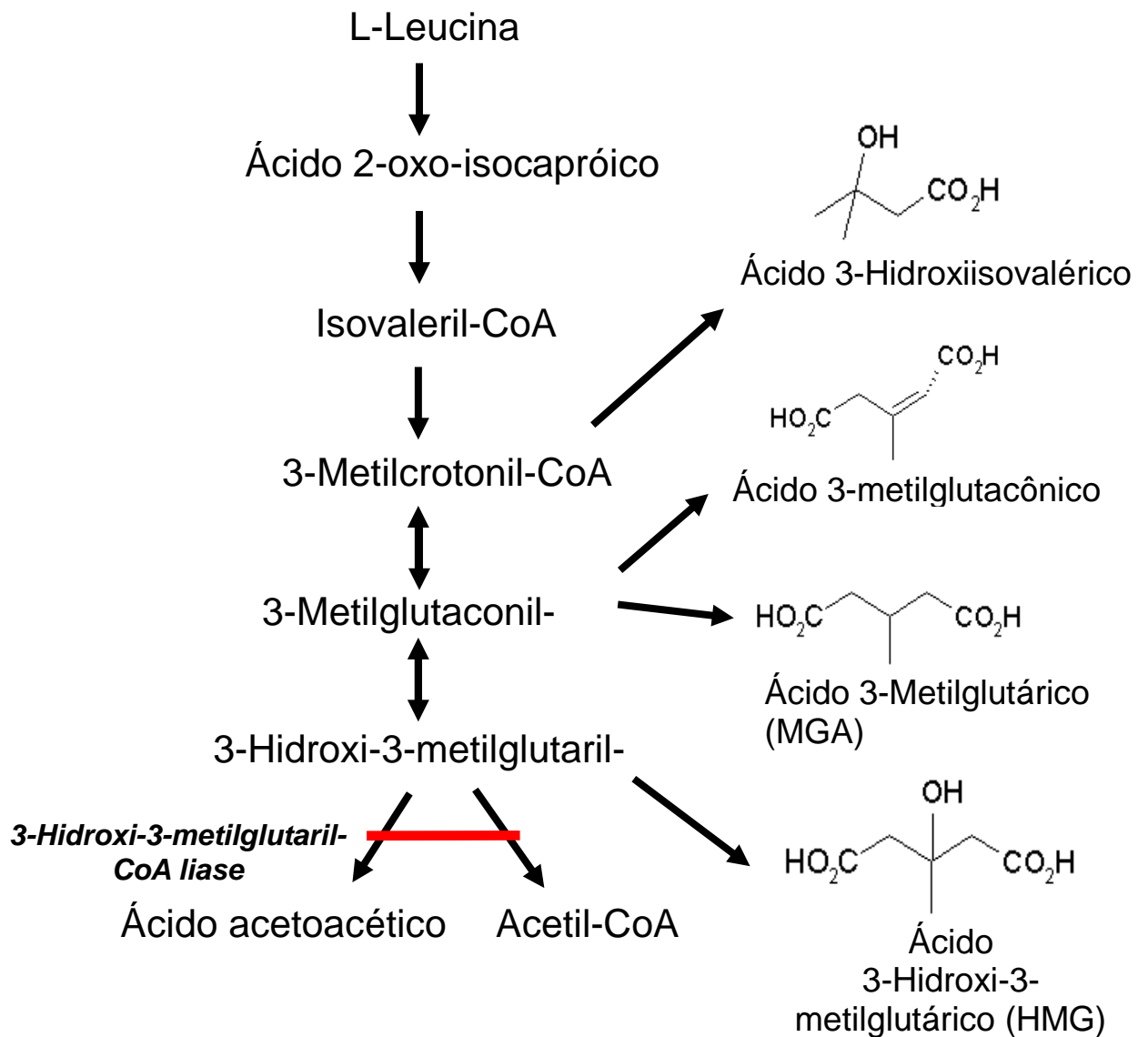


Figura I.1 – Rota do catabolismo da L-Leucina com bloqueio ao nível da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase. (Figura adaptada de: Sweetman, L. e Williams, J.C., 2001.)

1.3.1. Achados clínicos e neuropatológicos

As manifestações clínicas da HMGA geralmente se manifestam no período neonatal (Sweetman e Williams, 2001). Durante episódios agudos de descompensação metabólica (jejum prolongado ou situações hipercatabólicas), os pacientes apresentam vômitos, diarreia, desidratação, hipotonia, hipotermia, letargia e apneia que pode progredir ao coma (Sweetman

e Williams, 2001; Funghini et al., 2001; Pospisilova et al., 2003). Outros sintomas incluem hepatomegalia com hiperamonemia, macrocefalia, microcefalia, pancreatite aguda, retardo no desenvolvimento e cardiomiopatia. Enfatize-se que a deficiência da HL é fatal em aproximadamente 20 % dos casos. Os pacientes também apresentam acidose metabólica com hipoglicemia hipocetótica e elevação de transaminases no plasma. Os achados de ressonância magnética evidenciam lesões na substância branca cerebral que, em alguns casos, podem ser reversíveis com o tratamento baseado na restrição alimentar de leucina (Yalçinkaya et al., 1999; Yilmaz et al., 2006; Zaifeiriou et al., 2007). Além disso, foi verificado o envolvimento dos núcleos caudado, denteado, globo pálido, bem como do trato corticoespinal (Yalçinkaya et al., 1999; Yilmaz et al., 2006).

1.3.2. Diagnóstico

A deficiência da HL deve ser investigada em pacientes que apresentam hipoglicemia hipocetótica e acidose metabólica. Geralmente a HMGA é diagnosticada através do aumento dos metabólitos HMG, MGT e OHIVA nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes (especialmente na urina) medidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Durante as crises agudas, os ácidos glutárico e adípico e a 3-metilcrotonilglicina também podem estar elevados. Além disso, a determinação da atividade da HL é importante para a confirmação do diagnóstico, podendo ser medida espectrofotometricamente em leucócitos, fibroblastos e plaquetas. A análise molecular também é útil para a confirmação do diagnóstico (Sweetman e Williams, 2001).

1.3.3. Tratamento

A HMGA tem tratamento efetivo disponível. Os pacientes devem evitar situações de jejum e ingestão excessiva de gordura. Além disso, a administração de glicose deve ser feita

em vigência de episódios de hipoglicemia que ocorrem geralmente durante as crises. A restrição de leucina em $87 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, bem como a diminuição da ingestão de gordura e a administração de L-carnitina ($100 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) auxilia o desenvolvimento de pacientes com HMGA (Dasouki et al., 1987).

1.3.4. Fisiopatologia da acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica (HMGA)

A patogênese desse distúrbio é desconhecida. No entanto, é possível que os metabólitos acumulados em tecidos e líquidos biológicos dos pacientes afetados por essa doença sejam tóxicos e responsáveis por pelo menos parte dos sintomas apresentados, embora os mecanismos pelos quais esses ácidos orgânicos possam levar aos sintomas característicos dessa desordem ainda não foram desvendados.

Acredita-se que, na HMGA, a hipoglicemia que ocorre principalmente durante as crises de descompensação metabólica possa contribuir para a patogênese do dano cerebral nos afetados por essa doença. A produção insuficiente de glicose, devido à inibição da gliconeogênese por HMG-CoA e do elevado consumo de glicose pela falta de corpos cetônicos circulantes, pode estar implicada nas alterações neurológicas características da doença. A hipoglicemia associada à diminuição na síntese de corpos cetônicos faz com que o cérebro fique sem substratos energéticos. Dessa forma, é possível que as lesões na substância branca e outros danos neurológicos encontrados em pacientes afetados pela HMGA ocorram particularmente devido à falta de energia no cérebro. Também foi demonstrado que a hipoglicemia pode inibir a cadeia transportadora de elétrons, causando depleção de ATP, bem como induzir a geração de espécies reativas através da ativação de receptores glutamatérgicos por aumento no influxo de cálcio (Singh et al., 2004; Suh et al., 2007). No entanto, não se pode excluir um efeito neurotóxico dos ácidos acumulados na HMGA. Assim, é possível que a hipoglicemia e a hipocetonemia atuem sinergicamente com os ácidos orgânicos

potencialmente neurotóxicos que se acumulam nessa doença, levando ao dano cerebral. Nesse contexto, já foi demonstrado que os ácidos acumulados na HMGA induzem estresse oxidativo e causam disfunção energética *in vitro* em cérebro de ratos (Leipnitz et al., 2008a, 2008b, 2009; Ribeiro et al., 2011).

I.4. Radicais livres

I.4.1. Definição

Radicaís livres são moléculas ou átomos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados e possuem a capacidade de existir de forma independente (Southorn e Powis, 1988; Halliwell e Gutteridge, 1996). 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, 1996). 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, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido a intermediários reativos como os radicaís superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxil (OH^{\bullet}), e também o

peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (Boveris e Chance, 1973).

O termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do O_2 ($\text{O}_2^{\bullet-}$ e OH^\bullet), mas também alguns não radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Halliwell e Gutteridge, 1996, 2007). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO^\bullet) e o peroxinitrito (ONOO^-) as principais representantes.

1.4.2. 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 na formação 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; Halliwell e Gutteridge, 2007).

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; Halliwell e Gutteridge, 2007). Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, os radicais livres podem promover lipoperoxidação, principalmente de ácidos graxos poliinsaturados de membranas plasmáticas celulares; podem causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL); podem reagir com proteínas, levando à sua inativação e conseqüente alteração de sua função; e podem também reagir com o DNA e

RNA, levando a mutações somáticas e a distúrbios de transcrição (Delanty e Dichter, 1998), entre outros efeitos.

I.5. Defesas antioxidantes

Antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que reduzem a formação de radicais livres ou reagem com os mesmos, neutralizando-os. Assim, em condições de elevada produção de espécies reativas, a célula pode se proteger contra um possível dano oxidativo através de antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos.

Embora diferindo na composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo e compreendem agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), entre outras; proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo), ao se ligarem aos mesmos, como as transferrinas; proteínas que protegem biomoléculas de danos (incluindo dano oxidativo) por outros mecanismos; agentes de baixo peso molecular que sequestram ERO e ERN, como glutathione reduzida (GSH), α -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina (Singh et al., 2004; Halliwell and Gutteridge, 2007).

I.6. Estresse oxidativo

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

aumentada, e as defesas antioxidantes podem ser insuficientes para restabelecer a homeostase redox.

O rompimento entre o equilíbrio pró-oxidante e antioxidante é descrito como estresse oxidativo, e pode representar um mecanismo fundamental de doenças humanas (Halliwell e Gutteridge 2007; 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:

- Adaptação: as células podem tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em um aumento da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço pró-oxidante / antioxidante.
- Dano celular: o estresse oxidativo pode provocar dano a alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Nesses casos, a resposta à injúria tecidual pode ser reversível: a célula entra em um estado de homeostase alterado temporário ou prolongado, que não leva à morte celular.
- Morte celular: pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose. Na morte celular por necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. Pode haver a liberação de antioxidantes, como a catalase e a GSH, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e proteínas do grupo heme, agentes esses que podem até mesmo causar estresse oxidativo em células adjacentes. Já na apoptose, o mecanismo intrínseco de morte celular programada é ativado e não há a liberação do conteúdo celular. Tanto a apoptose quanto a necrose podem ocorrer

em certas doenças, tais como as desordens neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

I.7. Suscetibilidade cerebral ao dano oxidativo

O cérebro é altamente dependente de energia para o seu funcionamento normal e a mitocôndria é a estrutura intracelular responsável pela produção dessa energia. Para a produção eficiente de energia na forma de ATP, a mitocôndria possui uma alta demanda por oxigênio, já que utiliza uma grande quantidade de O_2 em uma massa de tecido relativamente pequena, o que torna esse tecido altamente suscetível à ação de espécies reativas.

A presença de membranas celulares ricas em ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada (PUFA), os quais são especialmente sensíveis ao ataque de radicais livres e consequente oxidação de lipídeos, também pode levar ao dano por radicais livres no tecido cerebral. Outros fatores que aumentam a suscetibilidade do cérebro ao estresse oxidativo incluem um alto conteúdo de ferro, o qual favorece a lipoperoxidação e autooxidação de neurotransmissores, a considerável quantidade de microglia, que são macrófagos residentes do sistema nervoso que podem produzir $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , e a modesta defesa antioxidante, sendo os níveis de catalase particularmente baixos em muitas regiões cerebrais (Halliwell, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2007). Além disso, uma disfunção mitocondrial pode ocorrer por diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória com um consequente prejuízo no transporte de elétrons, o que leva a uma dispersão dos elétrons na forma de radicais livres potencialmente danosos à célula.

I.8. Estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas

Numerosas hipóteses têm sido propostas para explicar a neurodegeneração das doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson (Alexi et al., 2000; Mendéz-Álvarez et al.,

2001; Behl et al., 2002; Halliwell, 2006), sem, entretanto, obter até o momento uma explicação completamente satisfatória para explicar o dano cerebral dessas doenças. No entanto, acredita-se que possíveis mecanismos envolvam deficiência no metabolismo energético, estresse oxidativo e neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (excitotoxicidade), ou, possivelmente, um somatório desses fatores (Rose e Henneberry, 1994).

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

Na doença de Alzheimer, a mais comum dentre as doenças neurodegenerativas, é possível que o estresse oxidativo tenha um papel chave na morte neuronal. Tem sido proposto que o peptídeo 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-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdGA), produtos de oxidação de outras bases e de RNA, carbonilas de proteínas, nitrotirosina e marcadores de peroxidação lipídica (Smith et al., 1991; Markesbery e Carney, 1999; Nourooz-Zadeh et al., 1999; Lovell et al., 2000).

Por outro lado, verificou-se um dano oxidativo importante em pacientes portadores da doença de Huntington, particularmente representado pela formação de 3-nitrotirosina nas

áreas afetadas (Alexi et al., 2000). Entretanto, o dano oxidativo observado nessa doença aparentemente tem menor importância do que nas doenças de Parkinson e Alzheimer.

Também se observou o envolvimento de estresse oxidativo na fisiopatogenia responsável pelo dano tecidual encontrado em portadores de EIM, os quais são caracterizados principalmente por disfunção neurológica. Estudos *in vitro* e *in vivo* em modelos animais dessas doenças (Wajner et al., 2004; Latini et al., 2007; Ribeiro et al., 2007; Feksa et al., 2008; Kessler et al., 2008; Zugno et al., 2008; Leipnitz et al., 2011; Knebel et al., 2012; Viegas et al., 2012) e em plasma de pacientes (Sitta et al., 2006; Deon et al., 2007; Barschak et al., 2008a,b; Deon et al., 2008; Vanzin et al., 2011; Vargas et al., 2011; Ribas et al., 2012) evidenciam aumento de malondialdeído, dano ao DNA e proteínas, além de alterações das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas.

Tendo em vista a importância dos radicais livres e do estresse oxidativo como importante mecanismo fisiopatogênico de doenças neurodegenerativas, e que pacientes com HMGA apresentam predominantemente disfunção neurológica, o presente trabalho avaliou o efeito *ex vivo* dos ácidos HMG e MGA sobre diversos parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens.

II - TRABALHO EXPERIMENTAL

II.1. Artigo Científico

Intrastriatal administration of 3-hydroxy-3-methylglutaric and 3-methylglutaric acids induces oxidative stress in rat brain

Mateus Struecker da Rosa^a, Bianca Seminotti^a, Carolina Gonçalves Fernandes^a, Moacir
Wajner^{a,b}, Guilhian Leipnitz^{a*}

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

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

Running title: Oxidative stress in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria

* 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 3308-5551, fax: +55 51 3308-5535, e-mail: guilhian@ufrgs.br

Intention of submission after further investigation to the journal:

International Journal of Developmental Neuroscience

Abstract

3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria (HMGA) is a neurometabolic disorder biochemically characterized by the predominant accumulation of 3-hydroxy-3-methylglutaric (HMG) and 3-methylglutaric (MGA) acids. Affected patients present neurological symptoms and abnormalities in basal ganglia. Considering that the pathomechanisms involved in the severe brain damage found in HMGA are not completely established, in the present study we investigated the *in vivo* effects of intrastriatal injections of HMG (4 μ mol) and MGA (4 μ mol) on important parameters of oxidative stress in rat brain. Our results demonstrate that HMG and MGA increased thiobarbituric acid-reactive substances and carbonyl formation, indicating that these organic acids induce lipid and protein oxidative damage. We also found that HMG and MGA decreased glutathione levels, the most important cellular antioxidant in brain. Regarding to the enzymatic antioxidant defenses, both organic acids decreased the activities of superoxide dismutase and glutathione reductase and increased glutathione peroxidase activity. On the other hand, only HMG increased catalase activity and decreased glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. According to the present data, it may be presumed that oxidative stress induced by HMG and MGA *in vivo* in rat striatum contribute, at least in part, to the brain damage found in HMGA.

Keywords: 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria; 3-hydroxy-3-methylglutaric acid; 3-methylglutaric acid; oxidative stress; striatum.

Highlights

HMG and MGA accumulate in HMGA.

HMG and MGA induce lipid and protein oxidative damage *in vivo* in striatum.

HMG and MGA alter striatal antioxidant defenses *in vivo*.

Oxidative stress may contribute to the neuropathology found in HMGA.

Introduction

3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria (HMGA), also known as 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL) deficiency (OMIM 246450), is a rare autosomal recessive genetic disorder that affects ketogenesis and L-leucine catabolism. In mitochondria, HL catalyses the cleavage of HMG-CoA to form acetoacetic acid and acetyl-CoA. This disorder is biochemically characterized by tissue accumulation and high urinary excretion of large quantities of 3-hydroxy-3-methylglutarate (HMG), 3-methylglutarate (MGA), 3-methylglutaconate, 3-hydroxyisovalerate and 3-methylcrotonylglycine (Bonafé et al., 2000; Sweetman et al., 2001).

Clinical presentation usually occurs in the first year of life. Acute episodes are common and are characterized by vomiting, diarrhea, dehydration, hypotonia, hypothermia, lethargy, cyanosis and apnea that sometimes evolve to coma (Schutgens et al., 1979; Wysocki and Hähnel 1986; Gibson et al., 1988a,b). Other signs include macrocephalia, developmental delay, hepatomegalia, acute pancreatitis and dilated cardiomyopathy (Stacey et al., 1985; Gibson et al., 1988a; Gibson et al., 1994). This disease is fatal in approximately 20% of cases, although the symptoms tend to be milder after childhood (Thompson et al., 1990). Magnetic resonance neuroimaging scanning shows abnormalities in the caudate nucleus and dentate nucleus and multiple coalescent lesions in periventricular subcortical white matter and arcuate fibers (van der Knaap et al., 1998; Yalcinkaya et al., 1999; Yilmaz et al., 2006).

The mechanisms underlying the pathogenesis of the brain damage found in HMGA is not yet well established. It has been suggested that a deficit of ketone bodies as an alternative energy source, secondary carnitine deficiency or the intracellular accumulation of toxic organic acids or fatty acids could explain the pathophysiology of this disease (Sweetman et al., 2001). Regarding to the accumulation of toxic metabolites, previous studies demonstrated that HMG and MGA induce lipid and protein oxidative damage and reduce the non-enzymatic

antioxidant defenses *in vitro* in cerebral cortex, striatum and liver of young rats (Leipnitz et al., 2008a, 2008b, 2009). Furthermore, MGA induces mitochondrial dysfunction and inhibits Na^+, K^+ -ATPase activity in synaptosomes prepared from rat brain (Ribeiro et al., 2011). However, to our knowledge, no *in vivo* studies were performed in order to evaluate the toxic effects of the metabolites accumulating in HMGA. Therefore, the present work investigated the effects of intrastriatal administration of HMG and MGA on important parameters of oxidative stress, namely thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS, lipid peroxidation), carbonyl formation (protein oxidative damage), reduced glutathione (GSH) levels (non-enzymatic antioxidant defenses) and the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) in rat striatum.

Material and methods

Animals and reagents

Thirty-day-old Wistar rats, obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, were used. The animals were maintained on a 12:12 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). All reagents used were of analytical grade and purchased from Sigma Co. (St Louis, MO, USA).

Administration of 3-hydroxy-3-methylglutaric (HMG) and 3-methylglutaric acids (MGA)

Male Wistar rats were anesthetized with ketamine and xylazine (75 and 10 mg / kg, ip, respectively) and placed in a stereotaxic apparatus. The solutions of HMG (4 M), MGA (4 M) or NaCl were prepared in water and pH was adjusted to 7.4 with NaOH so that all solutions contained the same amount of sodium. Two small holes were drilled in the skull and 1 μ L (4 μ mol) of a HMG solution, MGA solution or NaCl solution (control group) was slowly injected bilaterally into each striatum over 3 min via a needle connected by a polyethylene tube to a 10 μ L Hamilton syringe. The needle was left in place for another 1 min before being softly removed, so that the total procedure lasted 4 min. The coordinates for injections were as follows: 0.6 mm posterior to the bregma, 2.6 mm lateral to the midline and 4.5 mm ventral from dura (Paxinos and Watson, 1986). The correct position of the needle was tested by injecting 0.5 μ L of methylene blue injection (4 % in saline solution). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for animal research of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil and followed the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication 85-23, revised 1985). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Striatum preparation

The rats were sacrificed by decapitation without anesthesia 30 min after intrastriatal injection of the metabolites or NaCl. The brain was rapidly excised on a Petri dish placed on ice. The striatum was dissected, weighed, and homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at 750 g for 10 min at 4 °C to discard nuclei and cell debris (Evelson et al., 2001).

The pellet was discarded and the supernatant, a suspension of mixed and preserved organelles, including mitochondria, was separated and used to measure oxidative stress parameters.

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) levels

TBA-RS levels according to the method described by Yagi (1998) with slight modifications. Briefly, 200 μ L of 10% trichloroacetic acid (TCA) and 300 μ L of 0.67% thiobarbituric acid in 7.1 % sodium sulfate were added to 100 μ L of tissue supernatants containing 0.3 mg of protein and incubated for 2 h in a boiling water bath. The mixture was allowed to cool on running tap water for 5 min. The resulting pink-stained complex was extracted with 400 μ L of butanol. Fluorescence of the organic phase was read at 515 nm and 553 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane and subjected to the same treatment as supernatants. TBA-RS levels were calculated as nmol TBA-RS / mg of protein.

Protein carbonyl formation

Protein carbonyl formation, a marker of protein oxidative damage, was measured spectrophotometrically according to Reznick and Packer (1994). Two hundred microliters of striatum supernatants containing 0.3 mg of protein 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% TCA and centrifuged for 5 min at 10,000 g. The pellet was then washed with 1 mL ethanol: ethyl acetate (1:1, V/V) and suspended in 550 μ L 6 M guanidine prepared in 2.5 N HCl at 37°C for 5 min. The difference between the DNPH-treated and HCl-treated samples (blank) was used to calculate the carbonyl content determined at 365 nm. The results were calculated as nmol of carbonyl

groups / mg of protein, using the extinction coefficient of $22,000 \times 10^6$ nmol/mL for aliphatic hydrazones.

Reduced glutathione (GSH) concentrations

GSH concentrations were measured according to Browne and Armstrong (1998). Tissue supernatants with approximately 0.3 mg of protein were diluted in 20 volumes (1:20, v/v) of 100 mM sodium phosphate buffer pH 8.0, containing 5 mM EDTA. One hundred microliters of this preparation were incubated with an equal volume of o-phthalaldehyde (1 mg / mL methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 nm and 420 nm, respectively. Calibration curve was performed with standard GSH (0.001-0.1 mM), and GSH concentrations were calculated as nmol / mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was assayed according to Marklund (1985) and was based on the capacity of pyrogallol to autooxidize, a process highly dependent on $O_2^{\bullet-}$, which is a substrate for SOD. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be then indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm. The reaction medium contained 50 mM Tris buffer / 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8.2, 80 U / mL catalase, 0.38 mM pyrogallol and approximately 1 μ g of protein. A calibration curve was performed with purified SOD as standard to calculate the activity of SOD present in the samples. The results are reported as U / mg of protein.

Glutathione reductase (GR) activity

GR activity was measured according to Carlberg and Mannervik (1985) using oxidized glutathione (GSSG) and NADPH as substrates. The enzyme activity was determined by monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium with 200 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, containing 6.3 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM GSSG, 0.1 mM NADPH and tissue supernatants (approximately 3 μ g of protein). One GR unit (U) is defined as 1 μ mol of GSSG reduced per minute. The specific activity was calculated and expressed as U / mg of protein.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity

G6PDH activity was measured by the method of Leong and Clark (1984), in which the reaction mixture (1 mL) contained 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺ and approximately 3 μ g of protein. The reaction was started by the addition of 1 mM glucose-6-phosphate and was followed in a spectrophotometer at 340 nm. One G6PDH unit corresponds to 1 μ mol of substrate transformed per minute and the specific activity is represented as U / mg of protein.

Glutathione peroxidase (GPx) activity

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

Catalase (CAT) activity

CAT activity was assayed according to Aebi (1984) by measuring the absorbance decrease at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0.1 % Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and approximately 1 µg of protein. One unit (U) of the enzyme is defined as 1 µmol of H₂O₂ consumed per minute. The specific activity was calculated as U / mg of protein.

Determination of protein content

The protein content was determined by the method of Lowry and colleagues (1951), using bovine albumin as standard.

Statistical analysis

Data were expressed as means ± SD for absolute values. Assays were performed in duplicate or triplicate and the mean was used for statistical analysis. Data was analysed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post hoc Duncan multiple range test when F was significant. Differences between groups were rated significant at $P < 0.05$. All analyses were carried out in an IBM-compatible PC computer using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software.

Results

HMG and MGA induce lipid peroxidation

We first studied the effect of intrastriatal administration of HMG and MGA on TBA-RS levels in striatum of young rats. Figure 1 shows that HMG and MGA significantly increased TBA-RS levels 30 min after the injection [$F_{(2,13)} = 12.78$; $P < 0.001$]. These data indicate that HMG and MGA induce lipid oxidative damage in rat striatum.

HMG and MGA increase carbonyl formation

We also evaluated the effect of intrastriatal administration of HMG and MGA on carbonyl formation. We can observe that HMG and MGA significantly increased carbonyl formation [$F_{(2,10)} = 8.13$; $P < 0.01$] (Figure 2), indicating that both organic acids provoke protein oxidative damage.

HMG and MGA reduce GSH concentrations

The next step of this work was to investigate the effects of HMG and MGA on GSH concentrations. Figure 3 depicts that HMG and MGA decreased GSH concentrations in rat striatum 30 min after their administration [$F_{(2,15)} = 20.29$; $P < 0.001$]. These results indicate that HMG and MGA decrease striatal non enzymatic defenses.

HMA and MGA modulate antioxidant enzymes activities

Finally, we determined the effects of intrastriatal administration of HMG and MGA on the activities of the antioxidant enzymes SOD, GR, G6PDH, GPx and CAT. It can be observed in figure 4 that HMG and MGA significantly decreased SOD [$F_{(2,15)} = 13.78$; $P < 0.001$] and GR [$F_{(2,15)} = 44.97$; $P < 0.001$] activities, whereas only HMG decreased the activity of G6PDH [$F_{(2,15)} = 2.88$; $P < 0.05$] in rat striatum. On the other hand, GPx activity was increased by HMG and MGA [$F_{(2,15)} = 12.58$; $P < 0.01$] (Figure 4). Regarding to CAT activity, only HMG increased this activity [$F_{(2,15)} = 6.44$; $P < 0.05$] (Figure 4).

Discussion

HMGA is an autosomal recessive metabolic disorder predominantly characterized by neurological symptoms that can progress to coma. This disease generally appears in the first year of life and is fatal in about 20 % of the cases. Since the pathomechanisms responsible for

the brain damage found in HMGA are not fully established, more research, preferentially *in vivo* studies, is necessary to clarify the mechanisms causing neurological dysfunction in HMGA.

In the present study we evaluated the *ex vivo* effects of an acute intrastriatal administration of HMG and MGA on important parameters of oxidative stress in rat striatum. We found that HMG and MGA increased TBA-RS levels in rat brain 30 min after the administration, corroborating with previous *in vitro* findings from our group showing that both organic acids increased TBA-RS levels in rat brain (Leipnitz et al, 2009). Since TBA-RS measurement reflects the amount of malondialdehyde generated, a final product formed by the oxidation of unsaturated fatty acids of lipid constituents of the tissues, these results indicate that HMG and MGA induced lipid peroxidation *in vivo*.

HMG and MGA also increased carbonyl formation after intrastriatal administration. In this context, it should be noted that carbonyl groups are generated in proteins by the oxidation of amino acid side chain residues (Pro, Arg, Lys, and Thr) mediated by reactive species (Dalle-Donne et al. 2003). We cannot also exclude the possibility that aldehydes resulting from lipid peroxidation may induce carbonyl generation (Dalle-Donne et al. 2003). Since carbonyl group generation is currently used as a marker of free radical-mediated protein oxidation (Levine et al. 2002), it is presumed that these organic acids provoked protein oxidative damage in striatum.

Next, we found that HMG and MGA significantly reduced GSH concentrations. The decrease of this antioxidant caused by HMG and MGA is also in line with our previous *in vitro* findings (Leipnitz et al., 2009). Considering that endogenous GSH is the main naturally-occurring antioxidant in the brain and is used to evaluate the capacity of a tissue to prevent the damage associated to free radical processes (Halliwell and Gutteridge, 2007), it can be presumed that the rat striatum non enzymatic antioxidant defenses were compromised by

HMG and MGA *in vivo* administration. Furthermore, since GSH is considered an important defense against lipid oxidative damage in the brain eliminating reactive species responsible for the initiation of this process, it is also feasible that lipid peroxidation elicited by HMG and MGA could be secondary to GSH reduction.

Regarding to the enzymatic antioxidant system, administration of HMG and MGA significantly decreased SOD. It has been suggested that a decrease in the activities of antioxidant enzymes, such as SOD, may be due to reactive oxygen species causing a site-specific amino acid modification (Singh et al., 2004). On the other hand, the reduction of SOD activity result in excess of superoxide anions that can generate other forms of carbon-, nitrogen- and oxygen-centered radicals that could contribute to the lipid and protein oxidative damage induced by HMG and MGA in the brain. In contrast, HMG increased CAT activity in rat striatum. It is presumed that induction of the expression of this antioxidant enzyme at the gene level might take place as a compensatory mechanism in response to increased formation of hydrogen peroxide induced by HMG. Although we cannot presently explain the mechanisms responsible for these conflicting results (SOD activity decrease and CAT activity increase), our data showing that the metabolites accumulating in HMGA modulate the activities of SOD and CAT indicate that HMG and MGA increase the production of reactive species.

The present data also demonstrated that HMG and MGA increased GPx activity, reinforcing the view that hydrogen peroxide and lipid peroxide, which are scavenged by this antioxidant enzyme, are involved in HMG- and MGA-induced toxic effects. The increase of GPx activity may also occur as a compensatory mechanism in response to the inhibition of GR and the decrease of GSH levels caused by the organic acids. In this particular, the fact that HMG diminished G6PDH activity also contributes to the decreased GR activity due to the lack of NADPH for GSH recycling through this enzyme.

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 HMG and MGA induce *in vivo* oxidative stress in rat striatum. It must be emphasized here that reactive oxygen species are capable to oxidize different molecules, including lipids, proteins, sugars and DNA, representing a key event in the pathogenic cascade leading to cell death (Kroemer and Reed, 2000; Niizuma et al., 2009; Circu and Aw, 2010). Furthermore, oxidative stress is a very deleterious condition especially to the brain compared with other tissues (Halliwell and Gutteridge, 2007). This is supported by the fact that the brain has a high rate of oxidative metabolism coupled to ROS production, lower activity of antioxidant enzymes, reduced content of non enzymatic antioxidants and higher peroxidation potential because of its high content of polyunsaturated fatty acids (Halliwell and Gutteridge, 2007).

In conclusion, to our knowledge this is the first report showing that HMG and MGA *in vivo* administration induces oxidative stress in brain. It can be therefore presumed that this pathomechanism due to brain HMG and MGA accumulation may potentially contribute to the neurologic manifestations found in HMGA.

Acknowledgements

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

REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase, *in vitro*. Meth. Enzymol. 105, 121–126.
- Bonafé, L., Troxler, H., Kuster, T., Heizmann, C.W., Chamoles, N.A., Burlina, A.B., Blau, N., 2000. Evaluation of urinary acylglycines by electrospray tandem mass spectrometry in mitochondrial energy metabolism defects and organic acidurias. Mol. Genet. Metab. 69, 302-311.
- Browne, R.W. and Armstrong D., 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. Meth. Mol. Biol. 108, 347-352.
- Carlberg, I. and Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. Meth. Enzymol. 113, 484-490.
- Circu, M.L. and Aw, T.Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. Free Radic. Biol. Med. 48, 749-762.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin. Chim. Acta 329, 23-38.
- Evelson, P., Travacio, M., Repetto, M., Escobar, J., Llesuy, S., Lissi, E., 2001. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. Arch. Biochem. Biophys. 388, 261-266.
- Gibson, K.M., Breuer, J., Kaiser, K., Nyhan, W.L., McCoy, E.E., Ferreira, P., Greene, C.L., Blitzer, M.G., Shapira, E., Reverte, F., Conde, C., Bagnell, P., Cole, D.E.C., 1988a. 3-Hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A lyase deficiency: report of five new patients. J. Inherit. Metab. Dis. 11, 76–87.
- Gibson, K.M., Breuer, J., Nyhan, W.L., 1988b. 3-Hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A lyase deficiency: review of 18 reported patients. Eur. J. Pediatr. 148, 180–186.
- Gibson, K.M., Cassidy, S.B., Seaver, L.H., Wanders, R.J., Kennaway, N.G., Mitchell, G.A., Spark, R.P., 1994. Fatal cardiomyopathy associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. J. Inherit. Metab. Dis. 17, 291–304.

- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 2007. Measurement of reactive species. In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., eds. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn. Oxford University Press, Oxford, pp. 268-340.
- Kroemer, G., Reed, J.C., 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6, 513-519.
- Leipnitz, G., Seminotti, B., Haubrich, J., Dalcin, M.B., Dalcin, K.B., Solano, A., de Bortoli, G., Rosa, R.B., Amaral, A.U., Dutra-Filho, C.S., Latini, A., Wajner, M., 2008a. Evidence that 3-hydroxy-3-methylglutaric acid promotes lipid and protein oxidative damage and reduces the nonenzymatic antioxidant defenses in rat cerebral cortex. *J. Neurosci. Res.* 86, 683-93.
- Leipnitz, G., Seminotti, B., Amaral, A.U., de Bortoli, G., Solano, A., Schuck, P.F., Wyse, A.T., Wannmacher, C.M., Latini, A., Wajner, M., 2008. Induction of oxidative stress by the metabolites accumulating in 3-methylglutaconic aciduria in cerebral cortex of young rats. *Life Sci.* 82, 652-62.
- Leipnitz, G., Seminotti, B., Fernandes, C.G., Amaral, A.U., Beskow, A.P., da Silva, L.B., Zanatta, A., Ribeiro, C.A., Vargas, C.R., Wajner, M., 2009. Striatum is more vulnerable to oxidative damage induced by the metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency as compared to liver. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 351-6.
- Leong, S.F., Clark, J.B., 1984. Regional development of glutamate dehydrogenase in the rat brain. *J. Neurochem.* 43, 106-111.
- Levine, R.L., 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 790-796.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis-Farr, A., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Marklund, S.L., 1985. Pyrogallol autoxidation. In: *Handbook for oxygen radical research*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 243-247.

- Niizuma, K., Endo, H., Chan, P.H., 2009. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J. Neurochem.* 109, 133-138.
- Paxinos, G. & Watson, C., 1986. *The rat brain in Stereotaxic Coordinates*. 2^o ed. Sydney: Academic Press.
- Ribeiro, C.A., Hickmann, F.H., Wajner, M., 2011. Neurochemical evidence that 3-methylglutaric acid inhibits synaptic Na⁺,K⁺-ATPase activity probably through oxidative damage in brain cortex of young rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 1-7.
- Reznick, A.Z. and Packer, L., 1994. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth. Enzymol.* 233, 357-363.
- Schutgens, R.B., Heymans, H., Ketel, A., Veder, H.A., Duran, M., Ketting, D., Wadman, S.K., 1979. Lethal hypoglycemia in a child with a deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A lyase. *J. Pediatr.* 94, 89-91.
- Singh, P., Jain, A., Kaur, G., 2004. Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: Correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol. Cell. Biochem.* 260, 153-159.
- Stacey, T.E., de Sousa, C., Tracey, B.M., Whitelaw, A., Mistry, J., Timbrell, P., Chalmers, R.A., 1985. Dizygotic twins with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria; unusual presentation, family studies and dietary management. *Eur. J. Pediatr.* 144, 177-81.
- 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. 2340–2342.
- Thompson, G.N., Chalmers, R.A., Halliday, D., 1990. The contribution of protein catabolism to metabolic decompensation in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Eur. J. Pediatr.* 149, 346–350.

- van der Knaap, M.S., Bakker, H.D., Valk, J., 1998. MR imaging and proton spectroscopy in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase deficiency. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 19, 378-82.
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* 77, 325–332.
- Wysocki, S.J., Hähnel, R., 1986. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a lyase deficiency: a review. *J. Inherit. Metab. Dis.* 9, 225-33.
- Yagi, K., 1998. Simple procedure for especific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol. Biol.* 108, 107-110.
- Yalcinkaya, C., Dincer, A., Gündüz, E., Ficicioglu, C., Kocer, N., Aydin, A., 1999. MRI and MRS in HMG-CoA lyase deficiency. *Pediatr. Neurol.* 20, 375–380.
- Yylmaz, Y., Ozdemir, N., Ekinci, G., Baykal, T., Kocaman, C., 2006. Corticospinal tract involvement in a patient with 3-HMG coenzyme A lyase deficiency. *Pediatr. Neurol.* 35, 139–141.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Effect of intrastriatal administration of 3-hydroxy-3-methylglutaric (HMG, 4 μmol) and 3-methylglutaric (MGA, 4 μmol) acids on thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) levels in rat striatum 30 min after injection. Data are expressed as mean \pm SD for 4-6 independent experiments (animals) performed in triplicate. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, compared to rats that received intrastriatal NaCl injection (one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test).

Figure 2. Effect of intrastriatal administration of 3-hydroxy-3-methylglutaric (HMG, 4 μmol) and 3-methylglutaric (MGA, 4 μmol) acids on carbonyl formation in rat striatum 30 min after injection. Data are expressed as mean \pm SD for 4-5 independent experiments (animals) performed in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared to rats that received intrastriatal NaCl injection (one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test).

Figure 3. Effect of intrastriatal administration of 3-hydroxy-3-methylglutaric (HMG, 4 μmol) and 3-methylglutaric (MGA, 4 μmol) acids on reduced glutathione (GSH) concentrations in rat striatum 30 min after injection. Data are expressed as mean \pm SD for 6 independent experiments (animals) performed in triplicate. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, compared to rats that received intrastriatal NaCl injection (one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test).

Figure 4. Effect of intrastriatal administration of 3-hydroxy-3-methylglutaric (HMG, 4 μmol) and 3-methylglutaric (MGA, 4 μmol) acids on the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione

peroxidase (GPx) and catalase (CAT) in rat striatum 30 min after injection. Data are expressed as mean \pm SD for 6 independent experiments (animals) performed in triplicate. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, compared to rats that received intrastriatal NaCl injection (one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test).

Figures

Figure 1.

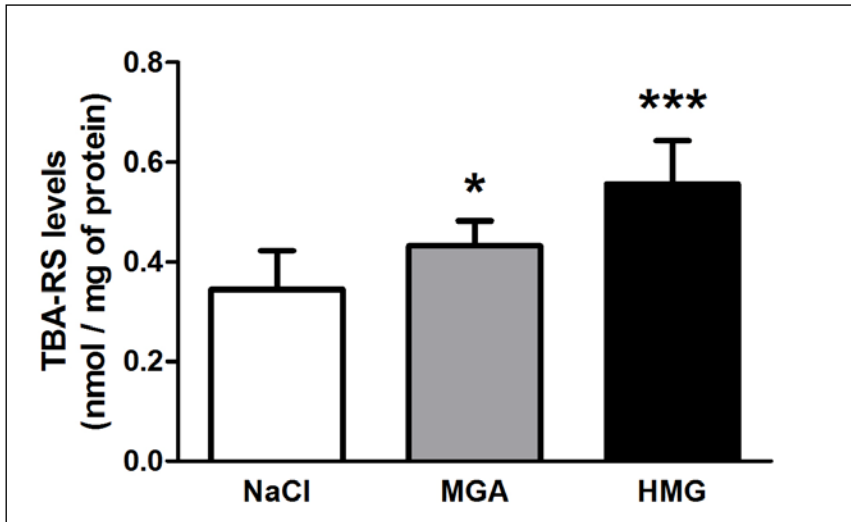


Figure 2.

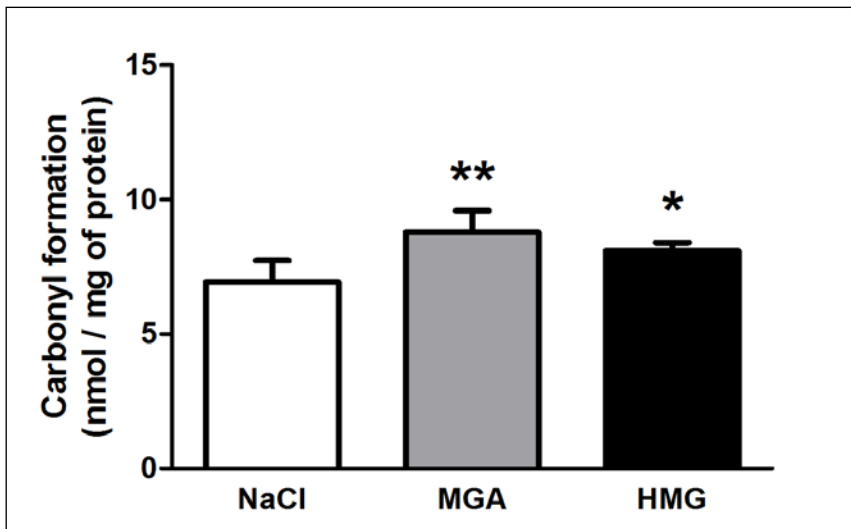
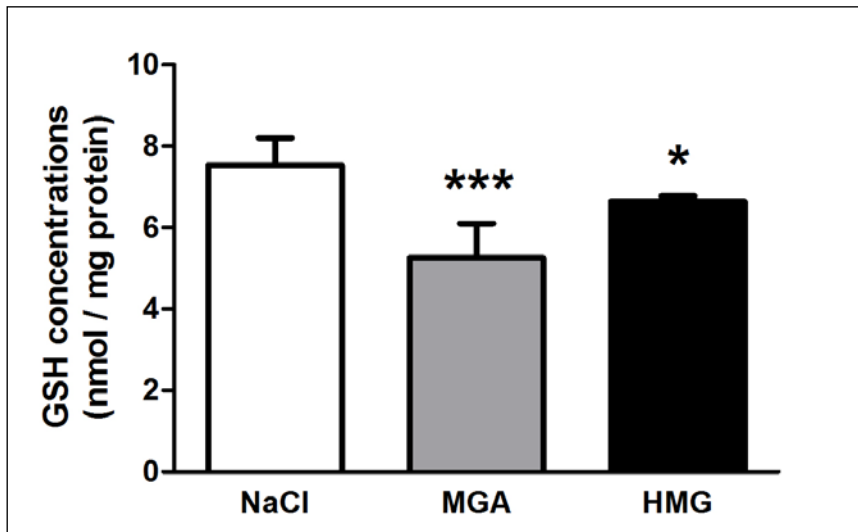
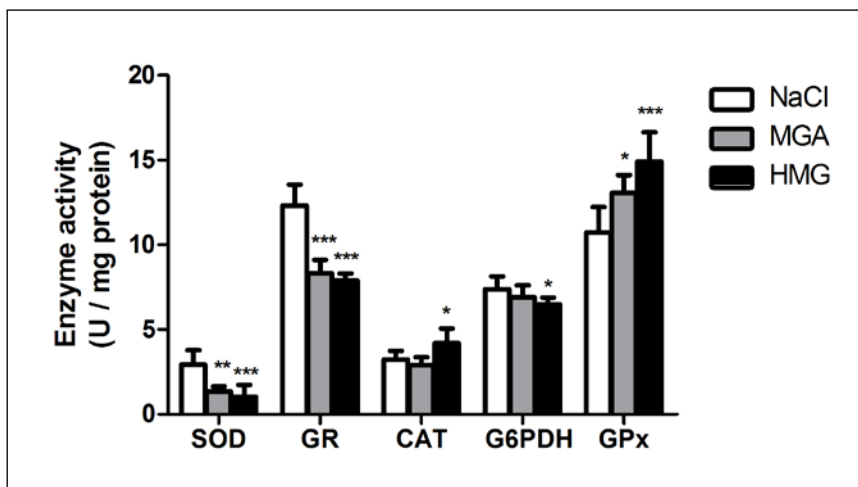


Figure 3.*Figure 4.*

III – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A HMGA é uma doença neurometabólica caracterizada predominantemente por sintomas neurológicos, sendo que os pacientes afetados apresentam lesões na substância branca, bem como anormalidades no trato corticoespinal e dos núcleos caudado e denteado (Yalcinkaya et al., 1999; Yilmaz et al., 2006; Zaifeiriou et al., 2007), cujos mecanismos fisiopatogênicos não estão totalmente esclarecidos. Visto que estudos anteriores *in vitro* demonstraram que o HMG e o MGA induzem estresse oxidativo em cérebro de ratos (Leipnitz et al., 2008a, 2008b, 2009), no presente estudo avaliamos os efeitos *ex vivo* da administração intraestriatal do HMG e do MGA sobre parâmetros de estresse oxidativo no estriado de ratos.

Verificamos inicialmente que a injeção de HMG e MGA aumentou os níveis de TBA-RS. Visto que a medida de TBA-RS reflete a quantidade de malondialdeído (MDA) formado, que é um produto altamente tóxico da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados de lipídios complexos, nossos resultados indicam que o HMG e o MGA induzem peroxidação lipídica (Halliwell and Gutteridge, 2007).

O HMG e o MGA também aumentaram a formação de carbonilas em estriado de ratos. Os grupamentos carbonila são formados por oxidação de aminoácidos proteicos mediada por espécies reativas ou por aldeídos resultantes da peroxidação lipídica (Levine et al., 1994; Dalle-Done et al., 2003). Portanto, sugere-se que os metabólitos acumulados na HMGA induzem dano oxidativo proteico.

Observamos ainda que o HMG e o MGA reduziram significativamente as concentrações de GSH, o principal antioxidante cerebral. Considerando que as concentrações de GSH refletem a capacidade antioxidante de um tecido para prevenir o dano associado a radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 2007), presumimos que as defesas antioxidantes não enzimáticas do estriado foram comprometidas pela administração *in vivo* de HMG e MGA.

Com relação à influência da injeção intraestriatal de HMG e MGA sobre as defesas antioxidantes enzimáticas, verificamos que os ácidos orgânicos diminuíram a atividade da SOD. Essa diminuição pode ser explicada pelo fato de que as enzimas antioxidantes são inibidas por espécies reativas, as quais causam modificações sítio-específicas em determinados aminoácidos (Singh et al., 2004). Além disso, a diminuição da atividade da SOD leva ao acúmulo de ânions superóxido, os quais podem gerar outras formas de radicais livres. Por outro lado, o HMG aumentou a atividade da CAT, o que provavelmente representa um mecanismo compensatório em resposta ao aumento na formação de peróxido de hidrogênio induzido por esse ácido orgânico.

Os resultados também mostram que o HMG e o MGA aumentaram a atividade da GPx, reforçando a hipótese de que peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos estão envolvidos nos efeitos tóxicos induzidos pelo HMG e pelo MGA. O aumento da atividade da GPx também pode estar ocorrendo como um mecanismo compensatório em resposta à inibição da GR e à diminuição dos níveis de GSH causada pelos metabólitos. Neste contexto, o fato do HMG diminuir a atividade da G6PDH também pode contribuir para a diminuição da atividade da GR devido à falta de NADPH para a reciclagem de GSH. Esses achados demonstrando que os metabólitos acumulados na HMGA modulam as atividades de importantes enzimas antioxidantes indicam fortemente que o HMG e o MGA causam aumento na produção de espécies reativas.

Visto que o estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes totais e as espécies reativas geradas em um tecido, levando ao dano de diferentes moléculas, nossos dados indicam fortemente que o HMG e o MGA induzem estresse oxidativo *in vivo* em estriado de ratos, uma condição deletéria para as células (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Concluindo, esse é o primeiro relato mostrando que o HMG e o MGA promovem dano oxidativo *in vivo*. Caso os resultados aqui apresentados sejam confirmados em tecidos de pacientes portadores da HMGA, pode-se especular que o estresse oxidativo contribui, ao menos em parte, para o dano neurológico encontrado nessa doença. Nesse particular, a investigação da influência de compostos neuroprotetores sobre os efeitos tóxicos causados pelo HMG e pelo MGA parece promissora no intuito de esclarecer a fisiopatogenia da HMGA e desenvolver terapias adjuvantes com o objetivo de melhorar o prognóstico dos pacientes.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexi, T., Borlongan, C.V., Faull, R.L., Williams, C.E., Clark, R.G., Gluckman, P.D., Hughes, P.E. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog. Neurobiol.* 60: 409-70, 2000.

Al-Sayed, M., Imtiaz, F., Alsmadi, O.A., Rashed, M.S., Meyer, B.F. Mutations underlying 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency in the Saudi population. *BMC Med. Genet.* 7: 86, 2006.

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

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

Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., Barden, A.T., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Vargas, C.R. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab. Brain. Dis.* 23: 71-80, 2008b.

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

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

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

Bonafé, L., Troxler, H., Kuster, T., Heizmann, C.W., Chamoles, N.A., Burlina, A.B., Blau, N. Evaluation of urinary acylglycines by electrospray tandem mass spectrometry in mitochondrial energy metabolism defects and organic acidurias. *Mol. Genet. Metab.* 69: 302-311, 2000.

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

Chalmers, R.A., Purkiss, P., Watts, R.W., Lawson, A.M. Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. *J. Inherit. Metab. Dis.* 3: 27-43, 1980.

Chalmers, R.A., Lawson, A.M. Organic acids in man. *Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias.* London, Chapman & Hall, pp. 221-229, 1982.

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

Dasouki, M., Buchanan, D., Mercer, N., Gibson, K.M., Thoene, J. 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria: response to carnitine therapy and fat and leucine restriction. *J. Inherit. Metab. Dis.* 10: 142-146, 1987.

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

Deon, M., Sitta, A., Barschak, A.G., Coelho, D.M., Pigatto, M., Schmitt, G.O., Jardim, L.B., Giugliani, R., Wajner, M., Vargas, C.R. Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25: 441-444, 2007.

Deon, M., Garcia, M.P., Sitta, A., Barschak, A.G., Coelho, D.M., Schmitt, G.O., Pigatto, M., Jardim, L.B., Wajner, M., Giugliani, R., Vargas, C.R. Hexacosanoic and docosanoic acids plasma levels in patients with cerebral childhood and asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy: Lorenzo's oil effect. *Metab. Brain Dis.* 23: 43-49, 2008.

Faull, K.F., Bolton, P.D., Halpern, B., Hammond, J., Danks, D.M. The urinary organic acid profile associated with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Clin. Chim. Acta* 73: 553-559, 1976a.

Faull, K., Bolton, P.D., Halpern, B., Hammond, J., Danks, D., Hahnel, R., Wilkinson, S.P., Wysocki, S.J., Masters, P.L. Patient with defect in leucine metabolism. *N. Engl. J. Med.* 294: 1013, 1976b.

Feksa, L.R., Latini, A., Rech, V.C., Feksa, P.B., Koch, G.D., Amaral, M.F., Leipnitz, G., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M. Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats. *Metab. Brain Dis.* 23: 221-233, 2008.

Funghini, S., Pasquini, E., Cappellini, M., Donati, M.A., Morrone, A., Fonda, C., Zammarchi, E. 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria in an Italian patient is caused by a new nonsense mutation in the HMGDL gene. *Mol. Genet. Metab.* 73: 268–275, 2001.

Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M., Schapira, A.H. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.* 39: 385-389, 1996.

Gu, M., Owen, A.D., Toffa, S.E., Cooper, J.M., Dexter, D.T., Jenner, P., Marsden, C.D., Schapira, A.H. Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases. *J. Neurol. Sci.* 158: 24-29, 1998.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci.* 8: 22-26, 1996.

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

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

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

Hoffmann, G.F., Von Kries, R., Klose, D., Lindner, M., Schulze, A., Muntau, A.C., Röschinger, W., Liebl, B., Mayatepek, E., Roscher, A.A. Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur. J. Pediatr.* 163: 76-80, 2004.

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

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

Knebel, L.A., Zanatta, A., Tonin, A.M., Grings, M., Alvorcem, L. de M., Wajner, M., Leipnitz, G. 2-Methylbutyrylglycine induces lipid oxidative damage and decreases the antioxidant defenses in rat brain. *Brain Res.* 1478: 74-82, 2012.

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

Leipnitz, G., Seminotti, B., Haubrich, J., Dalcin, M.B., Dalcin, K.B., Solano, A., de Bortoli G., Rosa, R.B., Amaral, A.U., Dutra-Filho, C.S., Latini, A., Wajner, M. Evidence that 3-hydroxy-3-methylglutaric acid promotes lipid and protein oxidative damage and reduces the nonenzymatic antioxidant defenses in rat cerebral cortex. *J. Neurosci. Res.* 86: 683-693, 2008a.

Leipnitz, G., Seminotti, B., Amaral, A.U., de Bortoli, G., Solano, A., Schuck, P.F., Wyse, A.T., Wannmacher, C.M., Latini, A., Wajner, M. Induction of oxidative stress by the metabolites accumulating in 3-methylglutaconic aciduria in cerebral cortex of young rats. *Life Sci.* 82: 652-662, 2008b.

Leipnitz, G., Seminotti, B., Fernandes, C.G., Amaral, A.U., Beskow, A.P., da Silva, L. de B., Zanatta, A., Ribeiro, C.A., Vargas, C.R., Wajner, M. Striatum is more vulnerable to oxidative damage induced by the metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency as compared to liver. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27:351-356, 2009.

Leipnitz, G., Amaral, A.U., Fernandes, C.G., Seminotti, B., Zanatta, A., Knebel, L.A., Vargas, C.R., Wajner, M. Pristanic acid promotes oxidative stress in brain cortex of young rats: a possible pathophysiological mechanism for brain damage in peroxisomal disorders. *Brain Res.* 1382: 259-65, 2011.

Liu, D., Wen, J., Liu, J., Li, L. 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, 1999.

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

Mark, R.J., Lovell, M.A., Markesbery, W.R., Uchida, K., Mattson, M.P. 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, 1997.

Markesbery, W.R., Carney, J. M. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 9: 133-146, 1999.

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

Mayatepek, E., Hoffmann, G.F., Baumgartner, R., Schulze, A., Jakobs, C., Trefz, F.K., Bremer, H.J. Atypical vitamin B12-unresponsive methylmalonic aciduria in sibship with severe progressive encephalomyopathy: a new genetic disease? *Eur. J. Pediatr.* 155: 398-403, 1996.

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

Menao, S., López-Viñas, E., Mir, C., Puisac, B., Gratacós, E., Arnedo, M., Carrasco, P., Moreno, S., Ramos, M., Gil, M.C., Pie, A., Ribes, A., Pérez-Cerda, C., Ugarte, M., Clayton,

P.T., Korman, S.H., Serra, D., Asins, G., Ramos, F.J., Gómez-Puertas, P., Hegardt, F.G., Casals, N., Pié, J. Ten novel HMGCL mutations in 24 patients of different origin with 3-hydroxy-3-methyl-glutaric aciduria. *Hum. Mutat.* 30: E520-E529, 2009.

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

Perry, G., Taddeo, M.A., Petersen, R.B., Castellani, R.J., Harris, P.L., Siedlak, S.L., Cash, A.D., Liu, Q., Nunomura, A., Atwood, C.S., Smith, M.A. Oxidative damage in Alzheimer disease. *Biometals.* 16: 77-81, 2003.

Pié, J., López-Viñas, E., Puisac, B., Menao, S., Pié, A., Casale, C., Ramos, F.J., Hegardt, F.G., Gómez-Puertas, P., Casals, N. Molecular genetics of HMG-CoA lyase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 92: 198-29, 2007.

Pospisilova, E., Mrazova, L., Hrda, J., Martincova, O., Zeman, J. Biochemical and molecular analyses in three patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 26: 433-441, 2003.

Rashed, M., Ozand, P.T., al Aqueel, A., Gascon, G.G. Experience of King Faisal Specialist Hospital and Research Center with Saudi organic acid disorders. *Brain Dev.* 16: 1-6, 1994.

Ribas, G.S., Biancini, G.B., Mescka, C., Wayhs, C.Y., Sitta, A., Wajner, M., Vargas, C.R. Oxidative stress parameters in urine from patients with disorders of propionate metabolism: a beneficial effect of L-carnitine supplementation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32: 77-82, 2012.

Ribeiro, C.A.J., Balestro, F., Grando, V., Wajner, M. Isovaleric acid reduces Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27: 529-540, 2007.

Ribeiro, C.A., Hickmann, F.H., Wajner, M. Neurochemical evidence that 3-methylglutaric acid inhibits synaptic Na⁺,K⁺-ATPase activity probably through oxidative damage in brain cortex of young rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29:1-7, 2011.

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

Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., Marsden, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet.* 1: 1269, 1989.

Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., Marsden, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54: 823-827, 1990a.

Schapira, A.H.V., Mann, V.M., Cooper, J.M., Dexter, D., Daniel, S.E., Jenner, P., Clark, J.B., Marsden, C.D. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 55: 2142-2145, 1990b.

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8^a edition. New York, McGraw-Hill, pp. 3-45, 2001.

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

Singh, P., Jain, A., Kaur, G. Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: Correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol. Cell Biochem.* 260: 153-159, 2004.

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

Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A., Markesbery, W.R. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 10540-10543, 1991.

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

Suh, S.W., Gum, E.T., Hamby, A.M., Chan, P.H., Swanson, R.A. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 117: 910-918, 2007.

Sweetman, L., Williams, J.C. 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. 2340–2342, 2001.

Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Sitta, A., Wayhs, C.A., Pereira, I.N., Rockenbach, F., Garcia, S.C., Wyse, A.T., Schwartz, I.V., Wajner, M., Vargas, C.R. Experimental evidence of oxidative stress in plasma of homocystinuric patients: a possible role for homocysteine. *Mol. Genet. Metab.* 104:112-117, 2011.

Vargas, C.R., Sitta, A., Schmitt, G., Ferreira, G.C., Cardoso, M.L., Coelho, D., Gibson, K.M., Wajner, M. Incidence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA coenzyme A lyase (HL) deficiency in Brazil, South America. *J. Inherit. Metab. Dis. Short report #093*, 2007.

Vargas, C.R., Wajner, M., Sitta, A. Oxidative stress in phenylketonuric patients. *Mol. Genet. Metab.* 104: 97-99, 2011.

Viegas, C.M., Tonin, A.M., Zanatta, A., Seminotti, B., Busanello, E.N., Fernandes, C.G., Moura, A.P., Leipnitz, G., Wajner, M. Impairment of brain redox homeostasis caused by the major metabolites accumulating in hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome *in vivo*. *Metab. Brain Dis.* 27: 521-530, 2012.

Wajner, M., Latini, A., Wyse, A.T., Dutra-Filho, C.S. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27: 427-48, 2004.

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

Yalcinkaya, C., Dincer, A., Gündüz, E., Fişcioglu, C., Kocer, N., Aydin, A. MRI and MRS in HMG-CoA lyase deficiency. *Pediatr. Neurol.* 20: 375–380, 1999.

Yilmaz, Y., Ozdemir, N., Ekinçi, G., Baykal, T., Kocaman, C. Corticospinal tract involvement in a patient with 3-HMG coenzyme A lyase deficiency. *Pediatr. Neurol.* 35: 139–141, 2006.

Zaifeiriou, D.I., Vargiami, E., Mayapetek, E., Augoustidou-Savvopoulou, P., Mitchell, G.A. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A lyase deficiency with reversible white matter changes after treatment. *Pediatr. Neurol.* 37: 47-50, 2007.

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