

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Curso de Biomedicina

Estágio em Pesquisa e Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina

**Avaliação dos efeitos *in vitro* do ácido hexacosanóico sobre parâmetros
de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens**

Clarissa Günther Borges

Porto Alegre

Dezembro/2013

Clarissa Günther Borges

Avaliação dos efeitos *in vitro* do ácido hexacosanóico sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Wajner

Co-orientador(a): Dr. Estela Natacha Brandt Busanello

Porto Alegre

Dezembro/2013

"Ninguém baterá tão forte quanto a vida. Porém, não se trata de quão forte pode bater, se trata de quão forte pode ser atingido e continuar seguindo em frente. É assim que a vitória é conquistada."

(Rocky Balboa)

AGRADECIMENTOS

*A Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
pelo ensino gratuito e de qualidade.*

*Ao grupo de Erros Inatos do Metabolismo,
pelos conhecimentos compartilhados e pelo bom convívio.*

*Ao Moacir,
por sempre acreditar em mim e incentivar a pesquisa,
pela sabedoria e pelo carinho.*

*A Estela,
por ter me guiado durante este projeto, pelos conhecimentos passados,
pela paciência e pela amizade.*

*A Vannessa,
pela amizade e pelo companheirismo.*

*A Carol,
Por ser minha primeira mentora, por sempre estar disposta a ajudar,
por transmitir conhecimentos e por ser uma grande amiga.*

*Aos colegas de Laboratório,
por sempre estarem presentes, dispostos a ajudar,
pelas conversas e pelas amizades.*

*A Michelle, Lauryn, Mariana Santos, Mariana Borges, Thais e Maira,
pela grande e essencial amizade formada durante a faculdade.*

*Aos colegas de faculdade,
por terem proporcionado muitos momentos de alegria durante a faculdade.*

*Aos meus amigos Isabel, Luiza, Laura, Gabriela, Vanessa,
por se importarem comigo e pela amizade.*

*Aos meus amigos de intercâmbio Larissa, Victória, Luisa, Cynthia, Sandro, Ramon,
Emerson, Elomar, Augusto, Sílvio e Gustavo,
Por terem sido fundamentais durante meu intercâmbio. Sinto muita saudade.*

*A minha família,
Pelo apoio, carinho e compreensão.*

*A minha mãe
Por todo apoio e por sempre acreditar em mim.*

*As minhas irmãs,
Pela amizade e momentos de alegria.*

*Ao Thiago,
Pela presença, apoio e amor.*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8
I. INTRODUÇÃO	11
I.1. Erros Inatos do Metabolismo	11
I.2. Metabolismo do Ácido Hexacosanóico	12
I.3. Desordens de Armazenamento de Lipídeos	14
I.3.1. Doenças com Acúmulo do Ácido Hexacosanóico	14
I.3.1.1. Adrenoleucodistrofia Ligada ao X	14
I.3.1.2. Manifestações Clínicas e Neuropatológicas	15
I.3.1.3. Genética	16
I.3.1.4. Diagnóstico	16
I.3.1.5. Tratamento	17
I.3.1.6. Fisiopatogenia	18
I.4. Radicais Livres	19
I.4.1. Definição	19
I.4.2. Mecanismos de Dano Celular Induzido por Radicais Livres	20
I.5. Defesas Antioxidantes	20
I.5.1. Defesas Antioxidantes não Enzimáticas	21
I.6. Estresse Oxidativo	22
I.7. Susceptibilidade Cerebral ao Dano Oxidativo	23

I.8. Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas	24
II. OBJETIVOS	26
II.1. Objetivos específicos	26
III. TRABALHO EXPERIMENTAL	27
III.1. Artigo Científico	27
IV. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ABREVIATURAS

EIM	Erros inatos do metabolismo
SNC	Sistema nervoso central
FAS	Ácido graxo sintase
LCFA	Ácidos graxos de cadeia longa
VLCFA	Ácidos graxos de cadeia muito longa
ELOVL	Elongase de ácidos graxos de cadeia muito longa
HSD17B12	3-Cetoacil-CoA redutase
HCAD	3-Hidroxiacil desidratase
TECR	Trans-2,3,-enoil-CoA redutase
C:24	Ácido lignocérico
C:26, HXCO	Ácido hexacosanóico
VLCFA-CoA	VLCFA na forma coenzima-A
FATP4	Proteína de transporte de ácidos graxos 4
ALD-X	Adrenoleucodistrofia ligada ao X
ATP	Adenosina trifosfato
ALDP	Proteína adrenoleucodistrofia
AMN	Adrenomieloneuropatia
HSCT	Transplante de células tronco hematopoiéticas
O ₂	Oxigênio molecular

H ₂ O	Água
O ₂ • ⁻	Superóxido
OH•	Hidroxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
1O ₂	Oxigênio singlete
ERO	Espécies reativas de oxigênio
NO•	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
MEL	Melatonina
NAC	N-acetilcisteína
MDA	Malondialdeído
HNE	4-hidroquinonenal
PUFA	Ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada
8-OhdGA	8-Hidroxi-2'-deoxiguanosina
TBA-RS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TAS	Estado antioxidante total
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina

DTNB	5,5'-Ditio-bis(2-nitrobenzoico)
TNB	Ácido 2-nitro-5-tiobenzoico
ABST	2,2'-Azino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfonato)
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
DCFH	2',7'-Diclorofluorosceína
DCF-DA	2',7'-Diacetato diclorofluorosceína
DCF	Diclorofluorosceína
CSF	Líquido cérebro espinhal

I. INTRODUÇÃO

I.1. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) correspondem a uma classe de distúrbios hereditários que são transmitidos principalmente de forma autossômica recessiva. Foram primeiramente descritos pelo médico britânico Archibald Garrod em 1908. Essas doenças, se consideradas individualmente, são raras, entretanto em seu conjunto atingem um em cada mil nascimentos e são na maioria das vezes expressas fenotipicamente no período neonatal. Bioquimicamente os EIM se caracterizam principalmente pela perda parcial ou total da atividade de uma enzima específica. Além de perda de função enzimática, outros tipos de proteínas, como proteínas estruturais, de transporte e imunoglobulinas, podem ter suas funções alteradas.

Os EIM normalmente se devem a um defeito genético em um único gene que codifica uma proteína específica, geralmente uma enzima a qual converte um determinado substrato em um produto. Com a deficiência da enzima, a mesma não é mais capaz de catalizar a reação, o que pode ocasionar um acúmulo de substâncias tóxicas nos tecidos e líquidos corporais ou à falta de síntese de substâncias essenciais. Essas condições levam a danos no desenvolvimento mental e/ou físico dos indivíduos acometidos por essas doenças (Del Rio, 1962). Outro problema é o aparecimento de outras substâncias possivelmente tóxicas por meio de rotas alternativas do metabolismo da substância acumulada. Os EIM podem ser classificados em quatro grupos, que vão depender da função exercida pela enzima deficiente e do tecido envolvido, bem como dos aspectos bioquímicos, patológicos, clínicos e terapêuticos. Estes grupos são: desordens de transporte, desordens de armazenamento, desordens de síntese e desordens do metabolismo intermediário (Sinclair, 1982).

Atualmente se conhece o defeito bioquímico de mais de 500 EIM, sendo que a maioria deles envolve processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Scriver *et al.*, 2001). Os pacientes acometidos por essas doenças possuem uma sintomatologia muito variada e inespecífica, mesmo entre

aqueles com o mesmo erro inato do metabolismo. Essa variabilidade deve-se às diferentes áreas do metabolismo e tecidos afetados, bem como aos diferentes graus de deficiência enzimática. Os sintomas mais comuns nos pacientes afetados por essas doenças envolvem o sistema nervoso central (SNC), onde retardo neuropsicomotor e neurodegeneração progressiva são as características predominantes (Burton, 1987).

I.2. Metabolismo do ácido hexacosanóico

A síntese de ácidos graxos ocorre no citoplasma das células, preferencialmente no fígado, mas podendo ocorrer também no tecido adiposo, nas glândulas mamárias e em outros tecidos. A síntese ocorre a partir de acetil-CoA, malonil-CoA e NADPH. O acetil-CoA é proveniente de piruvato da glicose, de ácidos graxos das gorduras e de alguns aminoácidos de proteínas. Primeiramente o acetil-CoA é ativado a malonil-CoA pela ação da acetil-CoA carboxilase. Posteriormente o complexo enzimático da ácido graxo sintase (FAS) utiliza acetil-CoA, malonil-CoA e NADPH para alongar os ácidos graxos adicionando 2 carbonos por vez. Neste processo as reações ocorrem no máximo sete vezes, formando então um ácido graxo de 16 carbonos (Wakil *et al.*, 1989).

O alongamento de ácidos graxos de cadeia longa (16-18 átomos de carbono, LCFA) a ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) acontece na membrana endoplasmática (Osei *et al.*, 1989) através da ação de quatro enzimas: elongase de ácidos graxos de cadeia muito longa (ELOVL), 3-cetoacil-CoA redutase (HSD17B12), 3-hidroxiacil desidratase (HCAD) e trans-2,3,-enoil-CoA redutase (TECR). Recentes estudos mostraram que a síntese de C:24 (ácido lignocérico) e C:26 (ácido hexacosanóico) requer duas enzimas da família ELOVL. Primeiramente, o complexo de alongação com ELOVL6 alonga C16:0 a C20:0/C22:0 e posteriormente ELOVL1 alonga esses ácidos graxos em C24:0 e C26:0 (Ofman *et al.*, 2010). A especificidade ao substrato (ácido graxo saturado, monoinsaturado ou poliinsaturado) para a reação de alongação é conferida pela ELOVL.

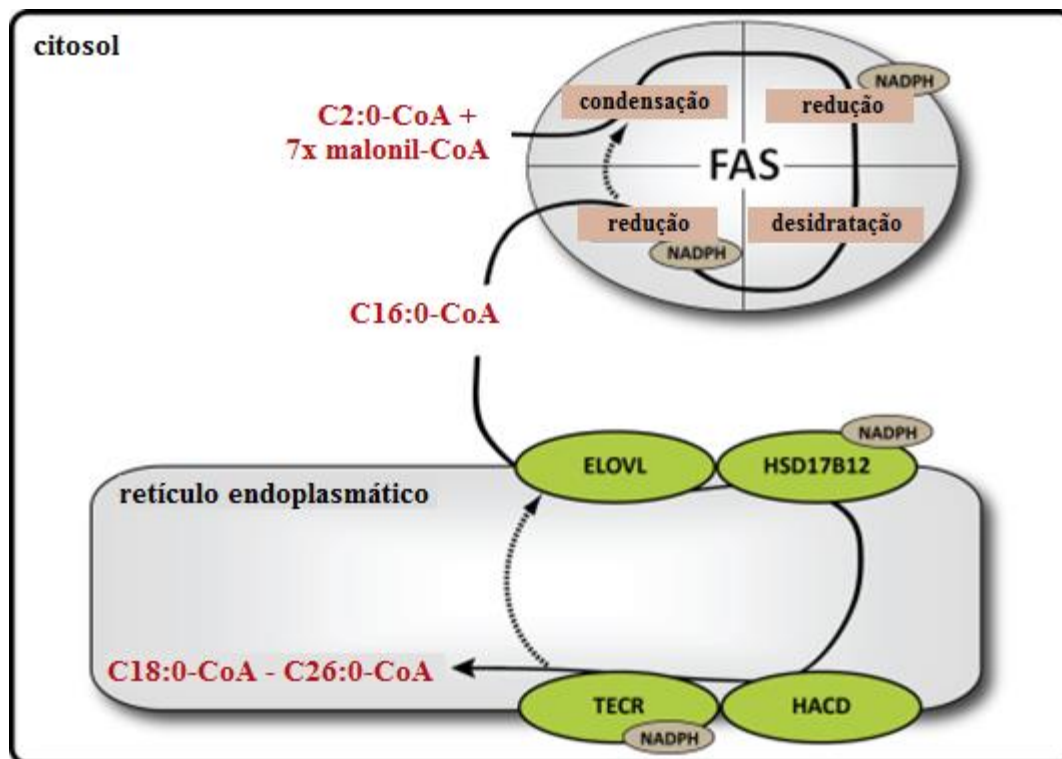


Figura 1. Rota da síntese de ácidos graxos de cadeia muito longa (Adaptado de Jakobsson *et al.*, 2006).

Ácidos graxos livres normalmente são metabolicamente inativos. Para os ácidos graxos de cadeia longa se tornarem ativos, eles devem ser ativados por tioesterificação para a sua forma coenzima-A (VLCFA-CoA). A proteína de transporte de ácidos graxos 4 (FATP4) é a acil-CoA graxo sintetase que preferencialmente ativa os VLCFA em seus derivados CoA (Lia *et al.*, 2007).

A degradação de ácidos graxos de cadeia muito longa ocorre exclusivamente nos peroxissomos. Os VLCFA são transportados para dentro do peroxissomo através de proteínas transportadoras específicas (Mosser *et al.*, 1993), onde podem sofrer α e/ou β oxidação.

I.3. Desordens de armazenamento de lipídeos

Desordens do armazenamento de lipídeos (ou lipidoses) são um grupo de EIM em que se acumulam quantidades elevadas de lipídeos potencialmente tóxicos em algumas células e tecidos corporais. Indivíduos com essas desordens não sintetizam quantidades suficientes de uma das enzimas necessárias para o metabolismo de lipídeos ou sintetizam enzimas que não funcionam corretamente. Ao longo do tempo, o acúmulo excessivo de lipídeos pode causar danos permanentes a células e tecidos, particularmente no cérebro, sistema nervoso periférico, fígado, baço e medula óssea (National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS), 2012).

I.3.1. Doenças com acúmulo do ácido hexacosanóico

I.3.1.1. Adrenoleucodistrofia ligada ao X

Na adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (ALD-X) uma mutação no gene ABCD1, responsável por codificar uma importante proteína de transporte peroxissomal acoplada à adenosina trifosfato (ATP), a ALDP (proteína adrenoleucodistrofia), leva a um distúrbio no transporte de VLCFA. Tem sido proposto que o ABCD1 possui um papel fundamental no transporte de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) ou de seus derivados de Coenzima A (CoA) para o interior dos peroxissomos (Hettema *et al.*, 1996; Shani *et al.*, 1995). Com o defeito na ALDP, a β -oxidação dos VLCFA é prejudicada e os VLCFA-CoA, principalmente o ácido hexacosanóico, são acumulados nas células.

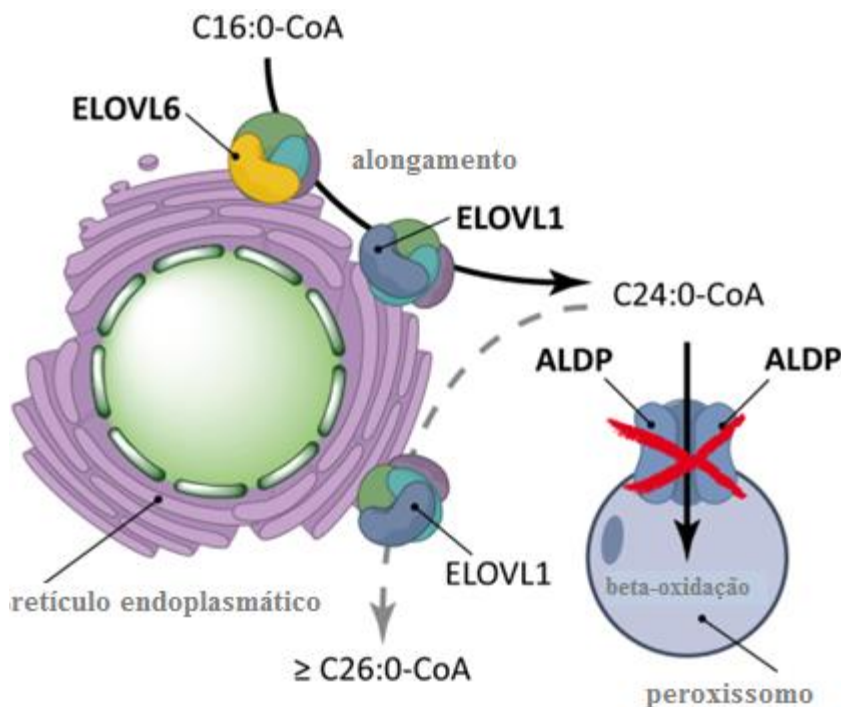


Figura 2. Defeito na ALDP prejudica a β -oxidação de VLCFA (Kemp *et al.*, 2012)

A ALD-X possui diferentes fenótipos, sendo que todos eles são originados a partir de mutações no gene ABCD1 (Ferrer *et al.*, 2010).

I.3.1.2. Manifestações Clínicas e Neuropatológicas

As manifestações clínicas da doença são variáveis e dependem do fenótipo da doença. Por ser uma doença autossômica recessiva ligada ao cromossomo X, a doença predomina em homens, os quais possuem os sintomas mais graves e proeminentes. A ALD-X é caracterizada clinicamente por dois fenótipos principais: adrenomieloneuropatia (AMN) e forma desmielinizante cerebral (ALD cerebral) (Aubourg *et al.*, 1996). A ALD cerebral é a forma mais severa da doença na qual normalmente há uma rápida desmielinização inflamatória progressiva no cérebro resultando em uma série de distúrbios cognitivos e neurológicos, que incluem labilidade emocional, comportamento hiperativo, incapacidade na escola (para meninos afetados),

entre outros. Entre dois a cinco anos do estabelecimento dos sintomas clínicos, o paciente pode entrar em um estado vegetativo e posteriormente morrer. Este fenótipo é mais comum durante a infância e adolescência (Van Geel *et al.*, 2001). A patologia da AMN é o fenótipo mais frequente da ALD-X e é fundamentalmente diferente da ALD cerebral, sendo caracterizada predominantemente por uma axonopatia não inflamatória distal envolvendo principalmente os tratos da coluna espinhal que resulta em uma paraplegia espástica progressiva (Moser *et al.*, 2007). Os pacientes masculinos com AMN apresentam uma rigidez e fraqueza das pernas, senso de vibração prejudicado nos membros inferiores, distúrbios do esfíncter e impotência (Chaundhry *et al.*, 1996). Os primeiros sintomas geralmente aparecem nos pacientes entre 20 e 30 anos (Van Geel *et al.*, 2001).

I.3.1.3. Genética

O gene ABCD1 localizado no Xq28 possui 19.9 kb, contém 10 exons e codifica uma proteína transmembrana peroxissomal de 745 aminoácidos. Possui uma estrutura geral de um transportador cassete ligante a ATP (ABC). Todos os pacientes da ALD-X têm mutações no gene ABCD1, o que confirma que essa é a causa genética da doença. A doença é autossômica recessiva ligada ao X (Kemp *et al.*, 2012).

I.3.1.4. Diagnóstico

O diagnóstico pré-natal através de análise mutacional do ABCD1 pode ser feita em amostras frescas das vilosidades coriônicas entre as semanas 11 e 13 de gravidez ou em células obtidas do líquido amniótico após centrifugação entre as semanas 15 e 18 de gestação (Engelen, *et al.*, 2012).

A triagem neonatal de recém nascidos já é possível, sendo baseada na medida de C26:0 lisofosfatidilcolina (26:0-liso-PC) em amostras de sangue através de cromatografia líquida combinada com espectrometria de massa (Hubbard *et al.*, 2009). Este teste leva à identificação de pacientes pré-assintomáticos com ALD-X. Se a doença

é suspeitada em pacientes do sexo masculino com sintomas neurológicos ou doença de Addison, a demonstração de que os níveis de VLCFA estão elevados no plasma confirma o diagnóstico. Para mulheres com a doença, o teste diagnóstico de escolha é análise mutacional do gene ABCD1, porque 15% das mulheres com ALD-X possuem níveis normais de VLCFA no plasma (Moser *et al.*, 2007). A triagem das famílias que possuam casos da doença segue as mesmas recomendações.

Os ácidos graxos de cadeia muito longa, em particular o ácido hexacosanóico, também se acumulam em células sanguíneas e no plasma de pacientes com a doença ALD-X, o que têm sido um fator crucial no diagnóstico da doença (Moser *et al.*, 1981). Se for detectado um aumento de VLCFA no sangue, o próximo passo é confirmar o diagnóstico por análise de mutação do gene ABCD1. Se este teste der negativo, outras desordens peroxissomais devem ser consideradas. Em pacientes do sexo masculino com mudanças confluentes na massa branca, a ALD-X deve ser considerada, especialmente quando há aumento da intensidade do sinal na região parieto-occipital e no esplênio do corpo caloso (Van der Knaap *et al.*, 2005).

I.3.1.5. Tratamento

O transplante de células tronco hematopoiéticas (HSCT) tem sido utilizado como tratamento para diversas doenças, como leucemia, anemia aplástica e hemoglobinopatias, e tem sido usado também para o tratamento de desordens genéticas. O HSCT é uma forma de terapia gênica “adotiva” pela qual células do doador são capazes de produzir a enzima/proteína que o receptor é geneticamente incapaz de produzir. Com o transplante, pacientes de ALD-X passariam a ter células capazes de produzir a enzima/proteína (Peters C *et al.*, 2004). A terapia adrenal hormonal é outro tipo de tratamento muito utilizado, já que pelo menos 70% dos pacientes com ALD cerebral infantil e adrenomieloneuropatia possuem evidências clínicas e bioquímicas de insuficiência adrenocortical primária. Este tipo de terapia é obrigatória para todos os pacientes com ALD-X que possuem insuficiência adrenal.

Outra tipo de tratamento mais recente é a terapia gênica, onde as células da medula óssea são extraídas dos pacientes e uma cópia normal do gene ABCD1 é inserido nas células utilizando um vetor viral do HIV. O paciente passa por um procedimento de quimioterapia e as células geneticamente modificadas são inseridas na medula do paciente (Cartier *et al.*, 2009). Além dessas medidas terapêuticas, o óleo de Lorenzo também pode ser administrado. O objetivo seria administrar ácidos graxos de cadeia longa sem ligações duplas, os quais levariam então ao impedimento do processo de alongamento, diminuindo a produção dos VLCFAs acumulados na doença. O óleo é administrado oralmente e normalmente é bem tolerado pelos pacientes. O óleo de Lorenzo, entretanto, não altera o curso da adrenoleucodistrofia cerebral infantil ou adulta, e não é indicado para a forma cerebral da doença. O uso do óleo é recomendado para pacientes pré-assintomáticos identificados em colaboração com um monitoramento de doença cerebral (Moser *et al.*, 2005).

Os VLCFAs que acumulam na adrenoleucodistrofia ligada ao X são apenas parcialmente absorvidos da dieta. A grande parte dos ácidos graxos de cadeia longa resulta de síntese endógena através da alongação de ácidos graxos de cadeia longa. Redução dietética de alimentos contendo VLCFAs, portanto, não diminuirá os níveis de C26:0 em pacientes com ALD-X (Brown *et al.*, 1982).

I.3.1.6. Fisiopatogenia

Embora não se conheça os mecanismos patogênicos na ALD-X, o acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa é tóxico e eles podem causar efeitos deletérios sobre a estrutura, estabilidade e função das membranas celulares (Ho *et al.*, 1995). Assim, foi verificado previamente que os VLCFA causam estresse oxidativo e dano oxidativo a proteínas em culturas celulares (Fourcade *et al.*, 2008), além de ativação microglial e apoptose (Eichler *et al.*, 2008). Estes achados definiram a ALD-X como uma doença de armazenamento de lipídeos e levou à hipótese de que o metabolismo anormal dos VLCFA é o fator chave na patogenia da doença (Singh *et al.*, 1981). O ácido hexacosanóico é um dos VLCFA mais acumulados na ALD-X, a qual é um erro

inato do metabolismo que acomete o córtex da adrenal e o cérebro (Forsyth *et al.*, 1971), afetando principalmente hemisférios cerebrais, medula espinhal e córtex adrenal. O acúmulo de VLCFAs nas células adrenocorticais provoca um efeito tóxico sobre as enzimas e membranas intracelulares das células, prejudicando a síntese de esteróide. A doença predomina na infância, mas pode ocorrer também alguns episódios raros na idade adulta. Apesar desses estudos, a fisiopatogenia da ALD-X é pouco conhecida, especialmente a ação do ácido hexacosanóico sobre o o funcionamento do SNC.

I.4. Radicais Livres

I.4.1. Definição

Radicaís livres são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e que têm a capacidade de existir de forma independente (Southorn e Powis, 1988; Halliwell e Gutteridge, 1999). Essas espécies possuem uma alta reatividade devido ao desemparelhamento de elétrons, o qual deixa a molécula energeticamente instável. Os radicaís livres podem ser formados através de duas maneiras: ganho de um elétron por uma molécula não-radical ou perda de um elétron de uma molécula não-radical. Outra possível maneira é por meio de uma fissão homolítica, onde uma ligação covalente é quebrada e cada átomo envolvido fica com um dos elétrons compartilhados (Halliwell e Gutteridge, 1999). Um radical livre pode gerar outro radical livre ao reagir com uma molécula não-radical; a presença de um único radical livre pode, então, iniciar uma sequência de reações em cadeia de transferência de elétrons (redox) (Maxwell, 1995). Nessas reações redox, um radical livre leva a formação de um radical livre, que poderá reagir com uma outra molécula e gerar outro radical livre.

No metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente aceitando quatro elétrons, que resulta na formação de água (H_2O). Aproximadamente 5% do oxigênio usado na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, porém, não é completamente reduzido a água, podendo ser convertido em intermediários reativos de oxigênio, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e a hidroxila (OH^{\bullet}), bem

como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em condições patológicas, esse processo pode ser aumentado ocasionando danos a células e seus componentes celulares (Boveris e Chance, 1973).

Os radicais originados pela redução de oxigênio ($O_2\cdot^-$ e $OH\cdot$) e os não radicais derivados de oxigênio, como o oxigênio singlete (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são chamados genericamente de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Halliwell e Gutteridge, 1999). Existem também espécies reativas de nitrogênio, cujos principais representantes são o óxido nítrico ($NO\cdot$) e o peroxinitrito ($ONOO^-$).

I.4.2. Mecanismos de dano celular induzidos por radicais livres

As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio ocorrem em processos fisiológicos e patológicos. Elas possuem várias funções fisiológicas, como regulação do tônus vascular, monitoramento da tensão de oxigênio no controle da ventilação e na produção de eritropoietina (Dröge, 2002; Bergendi *et al.*, 1999). Logo um aumento na liberação local de radicais livres pode ser benéfico, que é o caso da liberação local de espécies tóxicas oxidantes pelos neutrófilos, as quais podem atuar na defesa do hospedeiro contra uma infecção (Delanty e Dichter, 1998). Os radicais livres também podem participar da sinalização celular e da síntese e regulação de algumas proteínas (Ward e Peters, 1995). Apesar de possuírem papéis fisiológicos, essas espécies reativas podem oxidar moléculas biológicas como proteínas, lipídeos e DNA (Maxwell, 1995). Dentre os efeitos prejudiciais que os radicais livres podem causar ao organismo, estão a lipoperoxidação, onde os radicais podem causar oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipídeos de membranas biológicas; oxidação de proteínas, levando a inativação das mesmas; oxidação de DNA e RNA, levando a mutações somáticas e a distúrbios na transcrição (Delanty e Dichter, 1998); entre outros danos.

I.5. Defesas antioxidantes

Antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que reduzem a formação de radicais livres ou reagem com os mesmos, neutralizando-os. A célula pode se proteger contra o dano oxidativo através de antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos. Embora diferindo na composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo e compreendem agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), entre outras; proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo), ao se ligarem aos mesmos, como as transferrinas; proteínas que protegem biomoléculas de danos (incluindo dano oxidativo) por outros mecanismos; agentes de baixo peso molecular que aprisionam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como glutathiona reduzida (GSH), α -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina.

I.5.1. Defesas Antioxidantes não enzimáticas

As defesas antioxidantes não enzimáticas podem ser separadas em dois grandes grupos: agentes hidrossolúveis e lipossolúveis. O primeiro grupo inclui GSH, ácido ascórbico, ácido úrico, melatonina (MEL), os cofatores selênio e coenzima Q10 e proteínas plasmáticas. O tripeptídeo GSH é um dos mais efetivos e abundantes antioxidantes contra ERO, particularmente no cérebro onde as concentrações alcançam 1-10 mmol / L (Bast, 1993). GSH mantém o equilíbrio redox na célula e inativa ERO. Ácido ascórbico também parece ser muito importante no cérebro porque células neurais têm um sistema de captação altamente eficiente e os níveis de ácido ascórbico no CSF são muito mais altos do que no plasma (Lonnrot *et al.*, 1996). Os agentes antioxidantes lipossolúveis, incluindo α -tocoferol, β -caroteno, bilirrubina, são mais efetivos no combate contra lipoperoxidação. Outros antioxidantes não enzimáticos incluem flavonóides, licopenos, quelantes de metais e precursores endógenos de antioxidantes, como N-acetilcisteína (NAC).

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 mais 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 (Sies, 1985; Halliwell e Gutteridge, 1999). Assim, o termo “Estresse Oxidativo” é usado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis. Pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a combinação de quaisquer desses fatores (Halliwell, 2001).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular. Quando ocorre adaptação, as células podem em geral tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em “up-regulation” da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço oxidante/antioxidante. Apesar disso, nem sempre o estresse oxidativo precisa envolver defesas antioxidantes aumentadas. No dano celular, o estresse oxidativo pode danificar todos os alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A resposta ao dano pode ser reversível: a célula entra em “steady state” alterado temporário ou prolongado que não leva à morte celular. A morte celular pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose. Na morte celular por necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. Pode haver a liberação de

antioxidantes, como a CAT e a GSH, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e proteínas do grupo HEME, agentes esses que podem afetar as células adjacentes, podendo até mesmo impor a elas um estresse oxidativo. Já na apoptose, o mecanismo intrínseco de suicídio celular é ativado, e não há a liberação do conteúdo celular. A morte celular por apoptose pode ser acelerada em certas doenças, como as desordens neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Além da indução de necrose e apoptose, o estresse oxidativo pode levar a um aumento da lipoperoxidação, cujos produtos [malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HNE), entre outros] são altamente neurotóxicos, e a um dano oxidativo tanto às proteínas, inibindo a atividade de diversas enzimas e alterando a função celular, quanto ao DNA, causando alteração de bases púricas e pirimídicas (Halliwell e Gutteridge, 1999).

I.7. Susceptibilidade 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 susceptível à ação de espécies reativas.

Além disso, 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 conseqüente oxidação delipídeos, pode levar ao dano por radicais livres no tecido cerebral. Alto conteúdo de ferro, o qual favorece a lipoperoxidação e auto-oxidação de neurotransmissores através do $OH\cdot$ formado na reação de Fenton (Zaleska e Floyd, 1985), a considerável quantidade de microglia, macrófagos residentes do sistema nervoso que podem produzir $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , sua modesta defesa antioxidante, sendo os níveis de catalase particularmente baixos em muitas regiões cerebrais

(Halliwell, 1996; Halliwell e Gutteridge, 1999), aumentam a suscetibilidade do cérebro ao dano causado por radicais livres. Além disso, uma disfunção mitocondrial pode ocorrer por diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória com um conseqüente 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 evidências sugerem que os radicais livres e o estresse oxidativo possam estar envolvidos na patogênese dos danos neurológicos de várias doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica. Como medida de parâmetros de estresse oxidativo, existe um considerável número de casos onde se relatou aumento nos níveis de MDA e HNE no cérebro de pacientes, além de produtos da oxidação protéica, como grupos carbonil e 3-nitrotirosina, e também produtos que resultam da oxidação de DNA, bem como concentrações reduzidas dos antioxidantes não enzimáticos GSH e ácido ascórbico e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx (Jenner e Olanow, 1996; Liu *et al.*, 1999; Perry *et al.*, 2003).

Estudos demonstraram uma diminuição na atividade do complexo I da cadeia respiratória em cérebros post mortem de pacientes portadores de doença de Parkinson. Essa inibição do complexo I pode acarretar na geração de espécies reativas, tais como ânion superóxido, radicais hidroxila e peroxinitrito, as quais poderiam causar um prejuízo ainda maior na cadeia transportadora de elétrons. Dessa forma, é possível que o estresse oxidativo e as disfunções mitocondriais formem um ciclo vicioso na doença de Parkinson (Gu *et al.*, 1996; Janetzky *et al.*, 1994; Schapira *et al.*, 1989, 1990).

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 post mortem 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 *et al.*, 1999; Nourooz-zadeh *et al.*, 1999; Lovell *et al.*, 2000).

Tendo em vista a importância dos radicais livres e do estresse oxidativo como importante mecanismo fisiopatogênico de doenças neurodegenerativas, e que pacientes com adrenoleucodistrofia ligada ao X podem apresentar disfunção neurológica, o presente trabalho avaliou o efeito *in vitro* do ácido hexacosanóico sobre diversos parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens.

II. OBJETIVOS

Investigar os efeitos do acúmulo do ácido hexacosanóico (HXCO) na adrenoleucodistrofia ligada ao X (ALD-X) sobre a homeostase redox em córtex cerebral de ratos jovens.

II.1. Objetivos específicos

II.1.1. Avaliar os efeitos do HXCO sobre oxidação a lipídeos em córtex cerebral de ratos jovens;

II.1.2. Avaliar os efeitos do HXCO sobre a oxidação a proteínas em córtex cerebral de ratos jovens;

II.1.3. Avaliar os efeitos do HXCO sobre as defesas antioxidantes em córtex cerebral de ratos jovens;

II.1.4. Avaliar os efeitos do HXCO sobre a produção de radicais livres em córtex cerebral de ratos jovens.

III. TRABALHO EXPERIMENTAL

III.1. Artigo Científico

Avaliação dos efeitos *in vitro* do ácido hexacosanóico sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens

Clarissa G. Borges¹, Vannessa G. A. Lobato¹, Carolina G. Fernandes¹, Estela N. B. Busanello¹, Moacir Wajner^{1,2}*

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

² Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor para correspondência: Moacir Wajner

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

Resumo

A adrenoleucodistrofia ligada ao X (ALD-X) é uma doença peroxissomal na qual ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) acumulam-se nos tecidos dos pacientes, sendo o ácido hexacosanóico (HXCO) o principal ácido graxo acumulado. A doença é caracterizada principalmente por disfunção neurológica e possui variados fenótipos. Considerando que os mecanismos da fisiopatologia da doença são pouco conhecidos, o presente estudo investigou os efeitos *in vitro* do ácido hexacosanóico sobre diversos parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens. Nossos resultados mostraram que o HXCO não induz lipoperoxidação, já que os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) não sofreram modificação, assim como não provoca dano oxidativo proteico, pois a formação de carbonilas não foi alterada. Além disso, os níveis de DCF e a produção de óxido nítrico (NO) não se alteraram, sugerindo que a geração de espécies reativas não está envolvida nesse processo. O ácido hexacosanóico também não alterou os níveis de glutathione (GSH) e o estado antioxidante total (TAS), o que demonstra que o ácido não interfere nas defesas antioxidantes do cérebro. Os resultados presentes indicam que o ácido hexacosanóico no meio de incubação (*in vitro*) não induz estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens. Logo, pode-se dizer que este mecanismo patológico provavelmente não está envolvido nos danos neurológicos encontrados em pacientes afetados pela ALD-X.

Palavras chave: Desordens peroxissomais, adrenoleucodistrofia ligada ao X, ácido hexacosanóico, estresse oxidativo, córtex cerebral

1. Introdução

O ácido hexacosanóico (HXCO) acumula-se nos tecidos de pacientes afetados pela adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (ALD-X) e em outras doenças peroxissomais, as quais são caracterizadas por sinais e anormalidades neurológicas, cuja etiopatogenia é pouco conhecida (Engelen *et al.*, 2012). As principais características da ALD-X são a presença de axonopatia na medula espinhal, demielinização nos hemisférios cerebrais e insuficiência adrenal. A prevalência dessa doença é de aproximadamente 1:17000 nascidos vivos nos Estados Unidos (Bezman *et al.*, 2001), constituindo-se na doença peroxissomal mais frequente. A manifestação da doença ocorre predominantemente na infância com alguns episódios raros na idade adulta. Fatores ambientais parecem influenciar as manifestações clínicas nesta doença multifatorial. A ALD-X é clinicamente caracterizada por diferentes fenótipos, sendo que todos os fenótipos são originados a partir de mutações no gene *ABCD1* (Ferrer *et al.*, 2010).

O gene *ABCD1* é responsável por codificar uma importante proteína de transporte peroxissomal acoplada à adenosina trifosfato (ATP). Tem sido proposto que o *ABCD1* exerce importante papel no transporte de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) ou de seus derivados de Coenzima A (CoA) para o interior dos peroxissomos. Isto é baseado em um estudo realizado demonstrando que o acúmulo de VLCFA e sua beta oxidação defeituosa estão relacionados com dificuldade de importação dos VLCFA para os peroxissomos (Hettema *et al.*, 1996; Shani *et al.*, 1995). Estudos mais recentes foram capazes de determinar que uma superexpressão de *ABCD1* humano em *Saccaromices cerevisiae* permite a importação de inúmeros ésteres acil-CoA de VLCFA, tais como C18:1w9, C16:0, C22:0 e C24:6w3, para o interior dos peroxissomos (van Roermund *et al.*, 2008).

Apesar de alguns estudos *in vitro* terem demonstrado que os ácidos graxos de cadeia muito longa que se acumulam na ALD-X são tóxicos especialmente provocando a morte de astrócitos e oligodendrócitos (Hein *et al.*, 2008), poucos estudos foram realizados envolvendo o papel do estresse oxidativo na doença.

Tendo em vista que pacientes afetados por ALD-X apresentam acúmulo do ácido hexacosanóico em seus tecidos, especialmente no cérebro, que apresentam

predominantemente sintomas neurológicos e anormalidades do sistema nervoso central e que os mecanismos de dano cerebral nesta doença são pouco conhecidos, o presente estudo teve por objetivo verificar se o ácido hexacosanóico pode provocar estresse oxidativo e alterar o status antioxidante em córtex cerebral de ratos jovens. Neste sentido, foram realizados estudos *in vitro* testando os efeitos da adição deste ácido graxo ao meio de incubação.

2. Procedimentos experimentais

2.1. Animais e reagentes

Ratos Wistar de trinta dias de idade obtidos do Centro de Animais do Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brasil, foram usados. Os animais foram mantidos num ciclo claro / escuro 12:12 h (luzes acesas das 07.00 às 19.00 h) com ar condicionado em uma temperatura constante ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em sala de colônias com livre acesso a água e a 20% (w/w) de ração de proteína comercial (SUPRA, Porto Alegre, RS, Brasil). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil e seguiu o manual “Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório” (publicação NIH, p. 85 – 23, revisão 1996). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais usados, bem como minimizar o seu sofrimento.

Todos os reagentes químicos foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). O ácido hexacosanóico e outros reagentes químicos foram preparados em uma solução do solvente α -ciclodextrina no dia dos experimentos no meio de incubação utilizado para cada técnica e o pH foi ajustado a 7,4. A concentração final do ácido graxo no meio era de $200\mu\text{M}$. Os controles não continham o metabólito no meio de incubação, apenas α -ciclodextrina no meio apropriado.

2.2. *Preparação do sobrenadante de córtex cerebral*

No dia dos experimentos os ratos foram sacrificados por decapitação sem anestesia e o cérebro foi rapidamente dissecado em uma placa de Petri colocada no gelo. Os bulbos olfatórios, ponte, medula, cerebelo e estriado foram descartados, e o córtex cerebral foi dissecado, pesado e homogeneizado em 10 volumes (1:10, p/v) ou 5 volumes (1:5, p/v) em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 contendo 140 mM KCl. Homogeneizados foram centrifugados a 750 g por 10 min a 4 °C para descartar núcleos e debris celulares (Evelson *et al.*, 2001). O pellet foi descartado e o sobrenadante, uma suspensão de organelas mistas e preservadas, incluindo mitocôndrias, foi separado e incubado a 37°C por 1 hora com o ácido hexacosanóico. Imediatamente após a incubação, alíquotas foram feitas para medir TBA-RS, concentrações de GSH, conteúdo de carbonilas, produção de óxido nítrico e TAS. Para os experimentos de oxidação de 2',7'-Dichlorofluorosceína (DCFH) e da viabilidade celular, fatias de córtex cerebral de 400µm foram obtidas utilizando um fatiador McIlwain.

2.3. *Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)*

TBA-RS foi determinado de acordo com o método de Esterbauer e Cheeseman (1990). Resumidamente, 300 µL de ácido tricloroacético 10% foram adicionados a 150 µL de sobrenadantes de córtex cerebral pré-tratados e centrifugados a 3.000 g por 10 min. Trezentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um tubo de eppendorfe e incubados com 300 µL de 0,67% ácido tiobarbitúrico (TBA) em 7,1% de sulfato de sódio em banho de água fervente por 2 horas. Os tubos contendo a mistura foram esfriados com água por 5 min. O resultante TBA-RS com coloração rosa foi determinado usando comprimentos de onda de excitação e de emissão de 515 nm e 553 nm, respectivamente. A curva de calibração foi feita com 1,1,3,3-tetrametoxipropano, e cada ponto da curva é sujeito ao mesmo tratamento que os sobrenadantes. Os valores de TBA-RS foram expressos como nmol/ mg proteína.

2.4. Determinação do conteúdo de carbonilas

A formação de carbonilas de proteínas, um marcador de dano oxidativo a proteínas, foi medido espectrofotometricamente de acordo com Reznick e Packer (1994). Duzentos microlitros de córtex cerebrais de sobrendantes pré-tratados foram tratados com 400 μ L de 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) dissolvido em 2,5 N HCl ou 2,5 N HCl (brancos) e deixados no escuro por 1 hora. As amostras foram então precipitadas com 600 μ L 20% TCA e centrifugadas por 5 min a 10.000 g. O pellet foi então lavado com 1 mL de etanol: acetato de etila (1:1, v/v) e suspensos em 550 μ L de 6 M guanidina preparada em 2,5 N HCl a 37 ° C por 5 min. A diferença entre as amostras tratadas com DNPH e com HCl (branco) foi utilizada para calcular o conteúdo de carbonilas determinado a 365 nm. Os resultados foram expressos como nmol de grupos carbonila / mg de proteína, usando o coeficiente de extinção de 22.000×10^6 nmol/ mL para hidrazonas alifáticas.

2.5. Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH)

As concentrações de GSH foram medidas de acordo com Browne e Armstrong (1998). Sobrenadantes corticais pré-tratados foram diluídos em 20 volumes (1:20, v/v) de 100 mM de tampão fosfato de sódio pH 8,0 contendo 5 mM EDTA. Cem microlitros do preparado foram incubados com um volume igual de *o*-ftaldialdeído (1 mg / mL metanol) à temperatura ambiente por 15 minutos. A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de excitação e de emissão de 350 nm e 420 nm, respectivamente. Uma curva de calibração foi preparada com padrão de GSH (0.001 - 1 mM) e as concentrações foram expressos como nmol / mg proteína.

2.6. Determinação do estado antioxidante total (TAS)

O TAS, que representa a quantidade antioxidante dos tecidos, foi determinada pelo kit comercial dos laboratórios RANDOX. O homogeneizado de córtex cerebral foi diluído 1:2 e incubado com 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfonato) (ABST),

metamioglobina (peroxidase) e H_2O_2 para produzir o cátion $ABTS^+$. Uma coloração azul esverdeada relativamente estável resultante é medida a $37^\circ C$ por espectrofotômetro a 600 nm. Antioxidantes presentes na amostra adicionada causam a supressão da produção de cor a um grau que é proporcional à sua concentração (Miller *et al.*, 1993; Yu e Ong, 1999). Os resultados foram expressos em $mmol/mg$ of proteína.

2.7. Oxidação de 2',7'-Diclorofluorosceína (DCFH)

A produção de espécies reativas foi determinada de acordo com o método de LeBel *et al.* (1992) com algumas modificações. Durante a incubação do metabólito por 1h a $37^\circ C$, as fatias de córtex cerebral (25 mg) foram expostas a 2',7' - diacetato diclorofluorosceína (DCF-DA) ($25 \mu M$), que é permeável à membrana celular. No meio intracelular, DCF-DA é deacetilado por esterases a DCFH. Este produto não fluorescente é convertido por espécies reativas em produtos altamente fluorescentes, diclorofluorosceína (DCF). Depois da incubação, a fluorescência é medida usando comprimentos de onda de 480 nm (excitação) e de 535 nm (emissão). A curva de calibração foi feita utilizando DCF padrão ($1-100 \mu M$). A produção de espécies reativas foi expressa como $pmol DCF/g$ de tecido.

2.8. Conteúdo de nitratos e nitritos

As concentrações de nitratos e nitritos foram avaliadas de acordo com Navarro-González (1998) com algumas modificações (Fernandes *et al.*, 2013). Cento e cinquenta microlitros de sobrenadantes corticais (contendo aproximadamente 1,2 mg de proteína) foram desproteinizados pela adição de $125 \mu L$ de uma solução de $ZnSO_4$ $75 mM$, seguido de centrifugação a $9.000 g$ por 2 minutos a $25^\circ C$. O sobrenadante obtido foi neutralizado com $55 mM$ de solução de NaOH e diluído em 5 volumes de solução de tampão glicina, pH 9,7. Grânulos de cádmio cobertos com cobre (600-1000 mg), que foram previamente ativados com $5mM$ de solução de $CuSO_4$ em tampão glicina-NaOH, pH 9,7, foram adicionados aos sobrenadantes diluídos e gentilmente misturados por 20

min. O tratamento com cádmio é usado para converter todo o nitrato em nitrito em amostras biológicas, levando a uma estimativa mais apurada da formação total de óxido nítrico (NO). Alíquotas de 200 μL foram então tratadas com 200 μL de reagent Griess (2% sulfanilamida em 5% HCl e 0,1% N-1-(naftil)etilenediamina em H_2O) e incubado à temperatura ambiente por 10 min. A absorvância foi lida a 505 nm. A curva de calibração foi preparada com NaNO_2 em concentrações que iam de 1 a 125 μM . Os resultados finais foram expressos em μmol de nitrato e nitrito/ mg de proteína.

2.9. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada em fatias de córtex cerebral pelo método do sal tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazoliobrometo (MTT). Após uma incubação de 1h com HXCO a 35°C, as fatias de córtex cerebral foram lavadas e incubadas por 45min a 35°C na presença de 0,35 mg/mL de MTT. As desidrogenases mitocondriais ativas das células clivam e reduzem a sonda amarela solúvel MTT a um composto roxo insolúvel, formazan em dimetil sulfóxido (Mosmann, 1983). A extinção é medida a 570 e 630nm e a relação $\Delta A(570-630)$ reflete o índice de viabilidade celular. Os resultados foram comparados ao controle onde uma viabilidade de 100% foi atribuída e expressos em porcentagem do controle.

2.10. Determinação de proteína

O conteúdo de proteínas foi determinado em sobrenadantes de córtex cerebral pelo método de Lowry *et al.* (1951) utilizando albumina sérica bovina como padrão.

2.11. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. As técnicas foram feitas em duplicata ou triplicata e a média ou mediana foi usada para a análise estatística. Os resultados foram analisados usando teste *t* Student para amostras

pareadas. Diferenças entre grupos foram consideradas significativas a um valor de $P < 0,05$. Todas as análises foram desenvolvidas utilizando o software GraphPad.

3. Resultados

3.1. *O ácido hexacosanóico não provoca dano oxidativo a lipídeos e proteínas em córtex cerebral de ratos*

A peroxidação lipídica foi determinada pelos níveis de TBA-RS. A figura 1A mostra que HXCO não altera os níveis de TBA-RS (controle: $0,44 \pm 0,06$; HXCO: $0,42 \pm 0,05$ n = 6) em sobrenadantes de córtex cerebral de ratos jovens. O dano oxidativo proteico também foi avaliado pela medida do conteúdo de carbonilas em sobrenadantes corticais incubados com HXCO. A figura 1B mostra que o ácido graxo não provocou mudanças nos níveis de carbonilas (controle: $8,57 \pm 1,68$; HXCO: $11,18 \pm 1,52$ n = 4). Os resultados incidam que este metabólito provavelmente não provoca dano oxidativo lipídico e proteico.

3.2. *O ácido hexacosanóico não modifica os níveis das defesas antioxidantes ou a produção de espécies reativas em sobrenadantes e fatias corticais de ratos*

As defesas antioxidantes não enzimáticas também foram investigadas através da medida dos níveis de GSH. Nossos resultados demonstram que o HXCO não altera os níveis de GSH em sobrenadantes corticais de ratos jovens (controle: $10,45 \pm 1,63$; HXCO: $10,35 \pm 1,42$ n = 6) (Figura 2A).

Além disso, não houve alteração no estado antioxidante total (TAS) (controle: $0,41 \pm 0,1$; HXCO: $0,48 \pm 0,06$ n = 4) em sobrenadante de córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida (Figura 2B). Esses resultados sugerem que o HXCO não induz alteração nas defesas antioxidantes.

A figura 3A mostra que os níveis de DCF (controle: $0,33 \pm 0,03$; HXCO: $0,30 \pm 0,04$ n = 4) não foram alterados. Não houve também mudança na produção de óxido nítrico (NO) na presença deste ácido graxo (controle: $0,3 \pm 0,05$; HXCO: $0,28 \pm 0,07$ n=X) (Figura 3B). Isso demonstra que a formação de espécies reativas provavelmente não está envolvida nesse processo.

3.3. O ácido hexacosanóico não altera a viabilidade celular em fatias corticais de ratos

Finalmente, verificamos se o HXCO poderia alterar a viabilidade celular através do método do MTT. A figura 4 demonstra que não houve alteração da viabilidade celular (controle: $0,23 \pm 0,07$; HXCO: $0,25 \pm 0,07$ n=X), sugerindo que o HXCO não diminui a viabilidade celular.

4. Discussão

A adrenoleucodistrofia ligada ao X (ALD-X) é uma doença monogênica, peroxissomal resultante da inativação do gene ABCD1 comprometendo o funcionamento do sistema nervoso, do córtex adrenal e dos testículos. A ALD-X é uma desordem heterogênea, já que vários fenótipos podem ocorrer em pacientes do sexo masculino da mesma família, como por exemplo a adrenoleucodistrofia cerebral infantil (cALD), a cerebral juvenil, a cerebral adulta, a adrenomieloneuropatia (AMN) e a doença de Addison isolada. Apesar da investigação crescente a respeito da doença, vários aspectos ainda são obscuros, como a relação entre a inativação da proteína ALDP e o metabolismo anormal dos lipídeos (Ferrer *et al.*, 2010). Logo, a investigação de importantes parâmetros relacionados com neurodegeneração é relevante e justificável.

O propósito do presente estudo, portanto, foi investigar se o ácido hexacosanóico (HXCO), principal ácido graxo de cadeia muito longa (VLCFA) acumulado na ALD-X, causa dano oxidativo a lipídeos e proteínas, ou se altera as defesas antioxidantes em córtex cerebral de ratos jovens. Primeiramente verificamos que o HXCO não altera os níveis de TBA-RS em sobrenadantes de córtex cerebral. TBA-RS reflete a quantidade de malondialdeído formada, que consiste em um produto da peroxidação de ácidos graxos de membrana (Halliwell e Gutteridge, 2007). Os níveis de TBA-RS não foram modificados, podendo-se inferir, portanto, que o HXCO não provoca lipoperoxidação *in vitro* em córtex cerebral sob nossas condições experimentais.

Em seguida, foi analisado o papel do HXCO na oxidação protéica e verificou-se que a exposição de sobrenadantes de córtex cerebral a esse ácido graxo não alterou o conteúdo de carbonilas. A formação de carbonilas é um marcador de dano oxidativo a proteínas, logo um aumento no conteúdo de carbonilas indicaria oxidação proteica. A partir deste resultado pode-se sugerir que o HXCO provavelmente não induz dano oxidativo a proteínas *in vitro* em córtex cerebral de ratos jovens.

Em relação às defesas antioxidantes, também investigamos se a exposição do HXCO a sobrenadantes de córtex cerebral poderia levar a uma modificação no estado antioxidante das células. A medida da concentração de GSH é utilizada para avaliar a capacidade antioxidante não enzimática de prevenir dano a tecidos associado com radicais livres. Este parâmetro não foi alterado na presença de HXCO, indicando que as defesas antioxidantes não enzimáticas da célula provavelmente não estão comprometidas por este ácido graxo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Além disso, analisamos o estado antioxidante total (TAS), onde não foi verificada alteração significativa em córtex cerebral incubado com HXCO. Uma modificação no TAS indicaria um desequilíbrio das defesas antioxidantes, o que reforça a conclusão de que o HXCO provavelmente não possui envolvimento na alteração nas defesas antioxidantes.

Em relação à produção de espécies reativas, avaliamos a influência do HXCO sobre a oxidação de DCFH. Não foi verificada nenhuma alteração na oxidação de DCFH em córtex cerebral com HXCO. A análise da produção de óxido nítrico (NO) também foi realizada e verificou-se que a incubação de HXCO com sobrenadantes de córtex cerebral não altera a produção de NO. Esses dados sugerem que a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio provavelmente não é desencadeada na presença de HXCO.

Finalmente, analisamos a viabilidade celular através do teste de MTT. Verificou-se que o HXCO não alterou a viabilidade celular do córtex cerebral.

Nossos resultados na presente investigação indicam que o HXCO *in vitro* não induz estresse oxidativo em incubados de córtex cerebral sob nossas condições

experimentais. No que se refere às concentrações do HXCO, não se conhece as mesmas nos cérebros dos pacientes acometidos pela doença. Neste contexto, os parâmetros avaliados neste trabalho foram realizados com HXCO na concentração de 200 μ M. É difícil, portanto, determinar a relevância patofisiológica de nossos resultados *in vitro*. Por outro lado, outros estudos *in vivo* demonstraram que o mesmo composto bem como o ácido lignocérico induzem estresse oxidativo em culturas celulares de fibroblastos e em plasma de pacientes (Vargas *et al.*, 2004).

Considerando os resultados *in vitro* do presente estudo, sugere-se que o HXCO não leva ao estresse oxidativo, já que não provoca danos oxidativo a lipídeos e a proteínas, além de não ocasionar um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a formação de radicais livres. Sendo assim, podemos inferir que os danos neuropatológicos apresentados pelos pacientes acometidos com a ALD-X parecem estar associados principalmente a outros mecanismos fisiopatológicos.

Agradecimentos

Apoio financeiro: CNPq, PROPESQ/UFRGS, FAPERGS, PRONEX, FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00.

Referências

Aksenov M.Y. and Markesbery W.R., (2001) Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141-145.

Bezman, L., Moser, A.B., Raymond, G.V., Rinaldo, P., Watkins, P.A., *et al.* (2001) Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Ann Neurol* 49:512-517.

Browne R.W. and Armstrong D., (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347-352.

Engelen, M., Kemp, S., De Visser, M., Van Geel B.M., Wanders, J.A.R., Aubourg, P., Poll-The, B.T. (2012) X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet J Rare Dis* 7:51-64.

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

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

Fernandes, C.G., da Rosa, M.S., Seminotti, B., Pierozan, P., Martell, R.W., *et al.* (2013) In vivo experimental evidence that the major metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency induce oxidative stress in striatum of developing rats: a potential pathophysiological mechanism of striatal damage in this disorder. *Mol Genet Metab* 109:144-153.

Ferrer, I., Aubourg, P., Pujol, A. (2010) General aspects and neuropathology of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* 20:817-830.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007) Measurement of reactive species. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4th ed.:268-340.

Hein, S., Schönfeld, P., Kahlert, S., Reiser, G. (2008) Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Hum Mol Genet* 17:1750-1761.

Hettema, E.H., Van Roermund C.W., Distel B., Van Den Berg M., Vilela C., Rodrigues Pousada C., Wanders R.J., Tabak H.F. (1996) The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo. J* 15:3813-3822.

LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227-231.

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.

Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (London)* 84:407-412.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.

Navarro-González, J.A., García-Benayas, C., Arenas, J. (1998) Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 44:679-681.

Reznick A.Z. and Packer L., (1993) Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: Poli G, Albano E, Dianzani UM (eds) *Free radicals: from basic science to medicine*. Birkhauser Verlag, Basel, pp 425-437.

Shani, N. Watkins, P.A., Valle, D. (1995) PXA1, a possible *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the human adrenoleukodystrophy gene. *Proc Natl Acad Sci* 92:6012-6016.

Van Roermund, C.W., Visser, W.F., Ijlst, L., Van Cruchten, A., Boek, M., Kulik, W., Waterham, H.R., Wanders, R.J. (2008) The human peroxisomal ABC transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. *Faseb J* 12:4201-4208.

Vargas, C.R., Wajner, M., Sirtori, L.R., Goulart, L., Chiochetta, M., Coelho, D., *et al* (2004) Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1688:26–32.

Yu, T.W., Ong, C.N. (1999) Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application, and limitation. *Anal Biochem* 275:217-223.

Legendas das figuras

Figura 1. A. Efeitos *in vitro* do ácido hexacosanóico (HXCO) no parâmetro de peroxidação lipídica de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em sobrenadantes de córtex cerebral. Sobrenadantes corticais foram incubados por 60 minutos na presença de HXCO na concentração de 200 μ M. Valores são média \pm desvio padrão de cinco a seis experimentos independentes feitos em triplicata e expressos como porcentagem do controle (sem HXCO). Controles: níveis de TBA-RS $0,445 \pm 0,061$ nmol / mg proteína. $P < 0,05$, comparado aos controles (teste *t* de Student). Não foi observada nenhuma diferença significativa em relação ao controle. **B.** Efeitos *in vitro* do ácido hexacosanóico (HXCO) nos parâmetros de oxidação protéica de formação de carbonilas em sobrenadantes de córtex cerebral. Sobrenadantes corticais foram incubados por 60 minutos na presença de HXCO na concentração de 200 μ M. Valores são média \pm desvio padrão de cinco a seis experimentos independentes feitos em triplicata. Controles: conteúdo de carbonilas $8,57 \pm 1,68$ nmol grupos carbonila / mg proteína. $P < 0,05$, comparado aos controles (teste *t* de Student). Não foi observada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

Figura 2. A. Efeitos *in vitro* do ácido hexacosanóico (HXCO) sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) em sobrenadantes de córtex cerebral. Sobrenadantes corticais foram incubados por 60 minutos na presença de HXCO na concentração de 200 μ M. Valores são média \pm desvio padrão de cinco a seis experimentos independentes feitos em triplicata. Controles: níveis de GSH $XX \pm XX$ nmol / mg proteína. $P < 0,05$, comparado aos controles (teste *t* de Student). Não foi observada nenhuma diferença significativa em relação ao controle. **B.** Efeitos *in vitro* do ácido hexacosanóico (HXCO) sobre o TAS em sobrenadantes de córtex cerebral. Sobrenadantes corticais foram incubados por 60 minutos na presença de HXCO na concentração de 200 μ M. Valores são média \pm desvio padrão de cinco a seis experimentos independentes feitos em triplicata. Controles: TAS $0,41 \pm 0,1$ mmol / mg proteína. $P < 0,05$, comparado aos controles (teste *t* de Student). Não foi observada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

Figura 3. A. Efeitos *in vitro* do ácido hexacosanóico (HXCO) sobre a produção de espécies reativas pela medida de DCF formado em sobrenadantes de córtex cerebral. Sobrenadantes corticais foram incubados por 60 minutos na presença de HXCO na concentração de 200 μ M. Valores são média \pm desvio padrão de cinco a seis experimentos independentes feitos em triplicata. Controles: DCF $0,33 \pm 0,03$ pmol / g de tecido. $P < 0,05$, comparado aos controles (teste *t* de Student). Não foi observada nenhuma diferença significativa em relação ao controle. **B.** Efeitos *in vitro* do ácido hexacosanóico (HXCO) sobre a produção de óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de córtex cerebral. Sobrenadantes corticais foram incubados por 60 minutos na presença de HXCO na concentração de 200 μ M. Valores são média \pm desvio padrão de cinco a seis experimentos independentes feitos em triplicata. Controles: produção de óxido nítrico $0,3 \pm 0,05$ μ mol de nitrato e nitrito/ mg de proteína. $P < 0,05$, comparado aos controles (teste *t* de Student). Não foi observada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

Figura 4. Efeitos *in vitro* do ácido hexacosanóico (HXCO) sobre a viabilidade celular em sobrenadantes de córtex cerebral. Sobrenadantes corticais foram incubados por 60 minutos na presença de HXCO na concentração de 200 μ M. Valores são média \pm desvio padrão de cinco a seis experimentos independentes feitos em triplicata e expressos como porcentagem do controle (sem HXCO). Controles: MTT (viabilidade celular) $0,23 \pm 0,07$ % do controle $P < 0,05$, comparado aos controles (teste *t* de Student). Não foi observada nenhuma diferença significativa em relação ao controle.

Lista de Figuras

Figura 1. Efeito do HXCO sobre as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e as carbonilas em córtex cerebral de ratos jovens

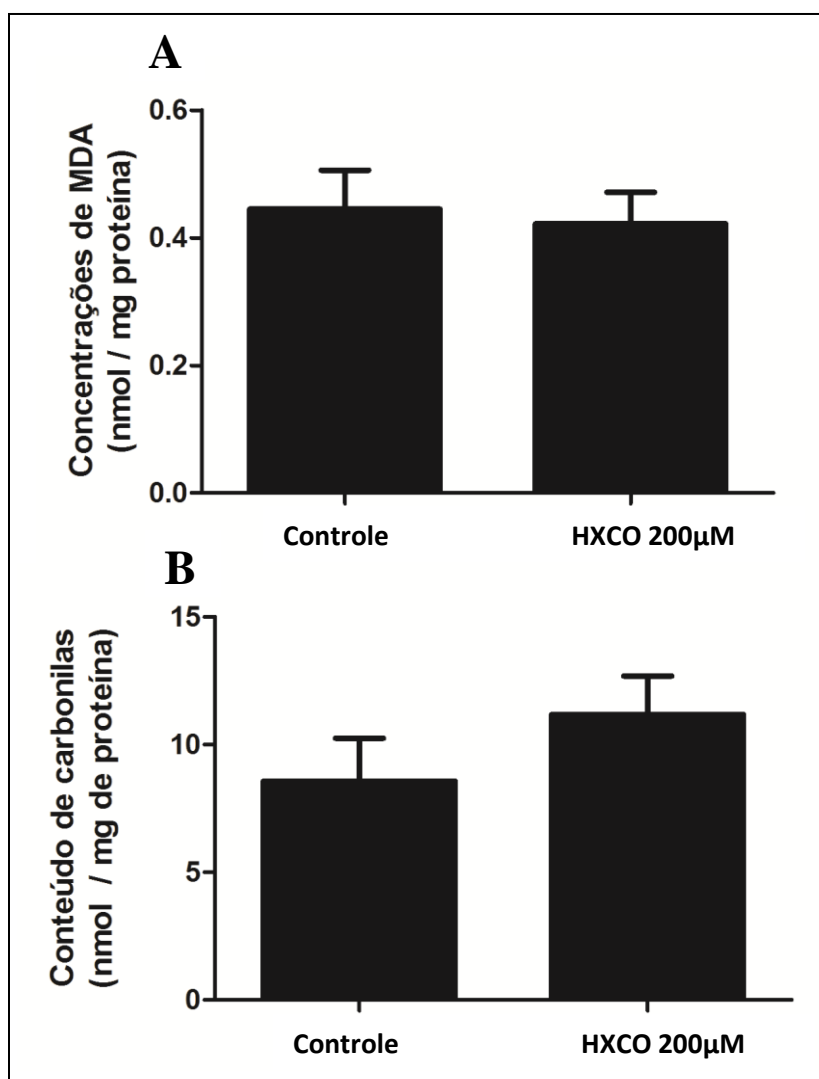


Figura 2. Efeito do HXCO sobre os níveis de glutatona reduzida (GSH) e o estado antioxidante total (TAS) em córtex cerebral de ratos jovens

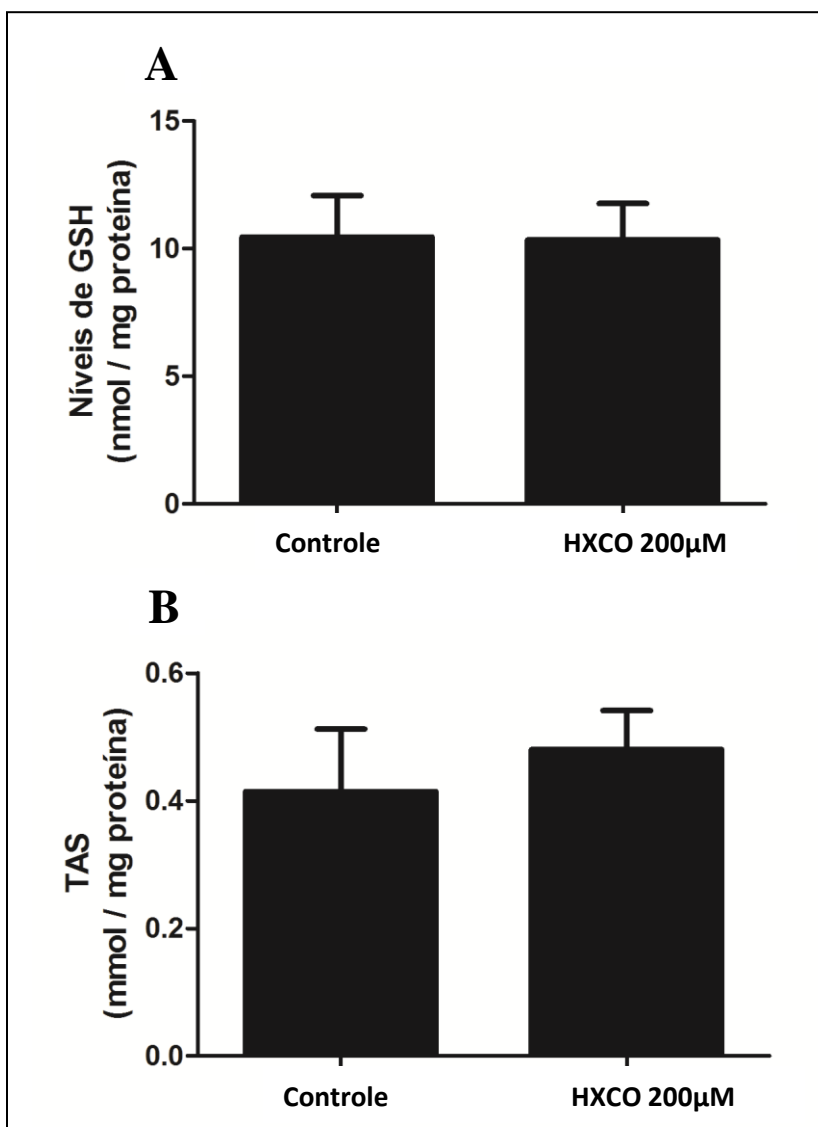


Figura 3. Efeito do HXCO sobre a oxidação de 2',7'-Diclorofluorosceína (DCFH) e a produção de óxido nítrico (NO) em córtex cerebral de ratos jovens

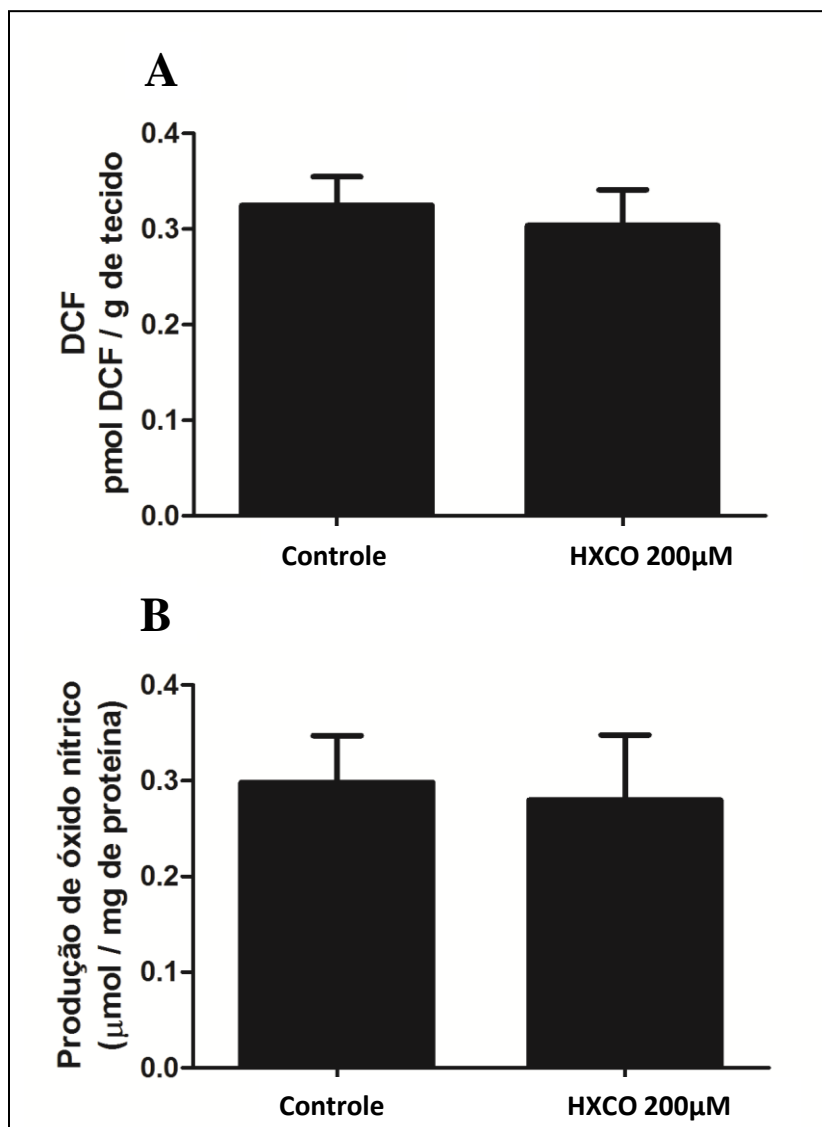
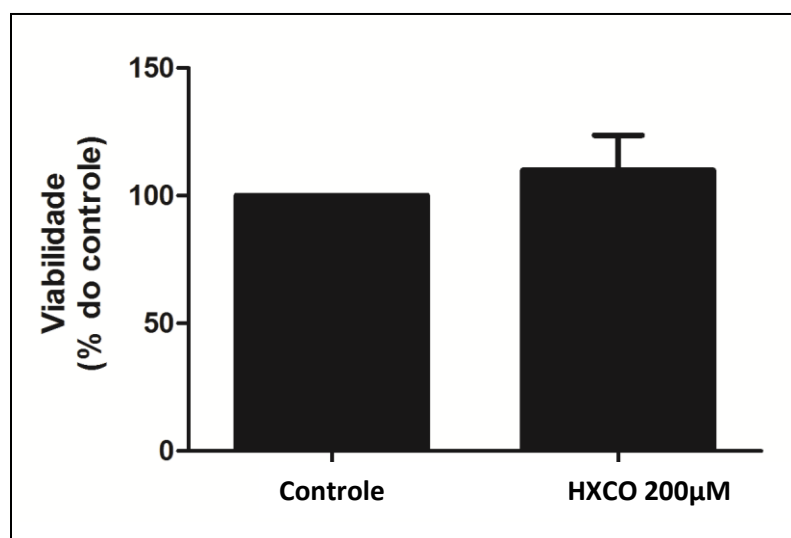


Figura 4. Efeito do HXCO sobre a viabilidade celular em córtex cerebral de ratos jovens



IV. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir do presente estudo pode-se inferir que o ácido hexacosanóico na concentração de 200 uM não alterou os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), o conteúdo de carbonilas, os níveis de GSH, o estado antioxidante total (TAS), a produção de óxido nítrico (NO) e a oxidação de DCFH *in vitro* em córtex cerebral de ratos jovens. Esse composto também não alterou a viabilidade celular *in vitro* de amostras de córtex cerebral de ratos jovens.

Nossos dados indicam, portanto, que o ácido hexacosanóico provavelmente não induz estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens *in vitro*. Para melhor compreender os resultados encontrados, estudo *in vivo* com injeção intracerebral e posterior avaliação de parâmetros de estresse oxidativo devem ser realizados. A avaliação do metabolismo energético também poderá ser estudada, para melhor compreender a fisiopatologia da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUBOURG, P., X-linked adrenoleukodystrophy, in: VINKEN, P.J., BRUYN, C.W., MOSER, H.W., (Eds), Handbook of Clinical Neurology. v. 66, p. 447 – 483, 1996

BAST, A. Oxidative stress and calcium homeostasis. In: HALLIWELL, B., ARUOMA, O.I., eds. DNA and Free Radicals. Chichester: Ellis Horwood, p. 95-108, 1993

BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z., FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sci. v. 65, p. 1865 – 1874, 1999

BOVERIS, A., CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Biochem J. v. 134, p. 707-716, 1973

BROWN, F.R., VAN DUYN, M.A., MOSER, A.B., SCHULMAN, J.D., RIZZO, W.B., SNYDER, R.D., *et al.* Adrenoleukodystrophy: effects of dietary restriction of very long chain fatty acids and of administration of carnitine and clofibrate on clinical status and plasma fatty acids. Johns Hopkins Med J. v. 151, p. 164 – 172, 1982

BURTON, B.K. Inborn Errors of Metabolism: The clinical diagnosis in early infancy. Pediatrics. v. 79, p. 359-369, 1987

CARTIER, N., HACEIN-BEY-ABINA, S., BATHOLOMAE, C.C., VERES, G., *et al.* Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. Science. v. 326, p. 818 – 823, 2009

CHAUDHRY, V., MOSER, H.W., CORNBATH, D.R. Nerve conduction studies in adrenomyeloneuropathy, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. v. 61, p. 181 – 185, 1996

DEL RIO, R.M. Aminoacidopatias congenitas y sus repercusiones en el desarrollo del SNC. Madrid, 1962

DELANTY, N.; DICHTER, M. A. Oxidative injury in the nervous system. Acta Neurol. Scand. v. 98, p. 145-153, 1998

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* v. 82, p. 47 – 95, 2002

EICHLER, F.S., REN, J.Q., COSSOY, M. RIETSCH, A.M., NAGPAL, S., MOSER, A.B., *et al.* Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? *Ann. Neurol.* v. 63, p. 729 – 742, 2008

FORSYTH, C.C., FORBES, M., CUMINGS, J.N. Adrenocortical atrophy and diffuse cerebral sclerosis, *Arch. Dis. Child.* v. 46, p. 273 – 284, 1971

FOURCADE, S., LOPEZ-ERAUSKIN, J., GALINO, J. DUVAL, C., NAUDI, A., JOVE, M., *et al.* Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* v. 17, p. 1762 – 1773, 2008

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.* v. 39, p. 385 - 389, 1996

JANETZKY, B., HAUCK, S., YODIM, M.B., RIEDERER, P., JELLINGER, K., PANTUCEK, F., *et al.* Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* v. 169, p. 126 – 128, 1994

HALLIWELL, B. Free radicals, protein and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem. Soc. Trans.* v. 24, p. 1023-1027, 1996

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

HO, J.K., MOSER, H., KISHIMOTO, Y., HAMILTON, J.A. Interactions of a very long chain fatty acid with a model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *J. Clin. Invest.* v. 96, p. 1455 – 1463, 1995

HUBBARD, W.C., MOSER, A.B., LIU, A.C., JONES, R.O., STEINBERG, S.J., LOREY, F., *et al.* Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD):

validation of a combined liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS MS) method. *Mol. Genet. Metab.* v. 97, p. 212 – 220, 2009

JAKOBSSON, A., WESTERBERG, R., JACOBSSON, A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* v. 45, p. 237 – 249, 2006

JENNER, P., OLANOW, C.W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology.* v. 47, p. 161-170, 1996

KEMP, S., BERGER, J., AUBOURG, P. X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects, *Biochim. et Biophys. Acta* 1822, p. 1465 – 1474, 2012

LIA, Z., MOULSON, C.L., PEI, Z., MINER, J.H., WATKINS, P.A. Fatty acid transport protein 4 is the principal very long chain fatty acyl-CoA synthetase in skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, v. 282, p. 20573 – 20583, 2007

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.* v. 13, p. 2318 - 2328, 1999

LONNROT, K., METSA-KETELA, T., MOLNAR, G., et al. The effect of ascorbic acid and ubiquinone supplementation on plasma and CSF total antioxidant capacity. *Free Radic. Biol. Med.* v. 21, p. 211 - 217, 1996

LOVELL, M.A., XIE, C., MARKESBERY, W.R. Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* v. 855, p. 116 - 123, 2000

MARSDEN, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.

Lancet. v. 1, p. 1269, 1989

MAXWELL, S.R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. v. 49, p. 345 – 361, 1995

MOSER, H.W., MAHMOOD, A., RAYMOND, G.V. X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* v. 3, p. 140 – 151, 2007

MOSER, H.W., MOSER, A.B., FRAYER, W., CHEN, J.D., SCHULMAN, B.P., O'NEILL, Y. KISHIMOTO, Y. Adrenoleukodystrophy: increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology*. v. 31, p. 1241 – 1249, 1981

MOSER, H.W., RAYMOND, G.V., LU, S.E., MUENZ, L.R., *et al.* Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil. *Neurol.* v. 62, p. 1073 – 1080, 2005

MOSSER, J., DOUAR, A.M., SARDE, C.O., KIOSCHIS, P., FEIL, R., MOSER, H., POUSTKA, A.M., MANDEL, J.L., AUBOURG, P. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature*, v. 361, p. 726 – 730, 1993

NINDS, National Institute of Neurological Disorders and Stroke: Lipid Storage Diseases Fact Sheet. NIH (National Institute of Health), n. 05-2628, 2012

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.* v. 72, p.734 - 740, 1999

OFMAN, N R., DIJKSTRA, I.M., VAN ROERMUND, C.W., BURGER, N., TURKENBURG, M., VAN CRUCHTEN, A., VAN ENGEN, C.E., WANDERS, R.J., KEMP, S. The role of ELOVL1 in very long chain fatty acid homeostasis and X-linked adrenoleukodystrophy. *EMBO Mol. Med.* v. 2, p. 90 – 97, 2010

OSEI, P., SUNEJA, S.K., LAGUNA, J.C., NAGI, M.N., COOK, L., PRASAD, M.R., CINTI, D.L. Topography of rat hepatic microsomal enzymatic components of the fatty acid chain elongation system. *J. Biol. Chem.* v. 264, p. 6844 – 6849, 1989

PERRY, G., TADDEO, M.A., PETERSEN, R.B., et al. Oxidative damage in Alzheimer disease. *Biometals.* v. 16, p. 77 - 81, 2003

PETERS, C., CHARNAS, L.R., TAN, Y., ZIEGLER, R.S., SHAPIRO, E.G., DEFOR, T., *et al.* Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Jour. Americ. Soc. Hemat.* v. 104, p. 881 – 888, 2004

SCHAPIRA, A.H., COOPER, J.M., DEXTER, D., JENNER, P., CLARK, J.B., MARKESBERY, W.R., CARNEY, J. M. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain. Pathol.* v. 9, p. 133-146, 1999

SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill Inc., p. 3-45, 2001

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

SINCLAIR, L.A. A new look at the inborn errors of metabolism. *Ann Clin Biochem.* v. 19, p. 314-321, 1982

SINGH, I., MOSER, H.W., MOSER, A.B., KISHIMOTO, Y. Adrenoleukodystrophy: impaired oxidation of long chain fatty acids in cultured skin fibroblasts an adrenal cortex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 102, p. 1223 – 1229, 1981

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. v. 88, p. 10540 - 10543, 1991

SOUTHORN, P. A., POWIS, G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and

biological reactions. Mayo Clin. Proc. v. 63, p. 381-389, 1988.

VAN DER KNAAP, M.S., VALK, J. X-linked adrenoleukodystrophy. In Magnetic Resonance of Myelination and Myelin Disorders. 3rd ed., p. 176 – 190, 2005

VAN GEEL, B.M., BEZMAN L., LOES, D.J., MOSER, H.W., RAYMOND, G.V. Evolution of phenotypes in adult male patients with X-linked adrenoleukodystrophy. Ann. Neurol. v. 49, p. 186 – 194, 2001

WAKIL, S.J. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. Biochem. v. 28, p. 4523 – 4530, 1989

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, p. 765-777, 1995

ZALESKA, M.M., FLOYD, R.A. Regional lipid peroxidation in rat brain in vitro:

possible role of endogenous iron. Neurochem. Res. v. 10, p. 397-410, 1985