

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

**PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA NEUROTOXICIDADE DO
ÁCIDO L-PIROGLUTÂMICO: RELEVÂNCIA NOS DISTÚRBIOS
HEREDITÁRIOS DO CICLO γ -GLUTAMIL**

Carolina Didonet Pederzoli

Orientador
Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre, 2004

“Não faças de ti um sonho a realizar.

Vai. Sem caminho marcado.

Tu és o de todos os caminhos....”

Cecília Meireles

*Dedico este trabalho aos meus
pais, estrelas-guia de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Severo Dutra Filho, pela orientação, paciência e carinho em todos os momentos;

Aos outros professores do Grupo de Erros Inatos do Metabolismo Angela, Clóvis e Moacir, pelas importantes contribuições, e aos demais professores e funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial ao CEPEA;

Ao CNPq, FAPERGS e PRONEX, pelo apoio financeiro;

Ao Xuxa, meu irmão do coração, pela amizade e ajuda em tantos momentos importantes da minha vida;

Aos colegas do laboratório 34, em especial à Cuca e à Fran, pela amizade, pela parceria em muitas disciplinas e pelas boas risadas que demos juntas;

A todos os amigos do laboratório 38 (minha segunda casa), principalmente Dênis, Guilhian, Karina D., Karina S., Patrícia e Rita, em especial ao César e à Alexandra pela prontidão com que sempre me ajudaram, e ao Rafael, pelo exemplo de pessoa e de profissional;

À colega e amiga Ângela pela amizade e cumplicidade infinitas, e pela troca constante de experiências no laboratório;

Aos bolsistas de iniciação científica Carla, César, Giovanni, Janaína, Karina e Mirian, fundamentais para a realização deste trabalho, obrigado por torná-lo muito mais divertido!;

Aos demais colegas do laboratório 36, em especial à Cris e à Aline, pela amizade e carinho;

Às irmãs, confidentes e amigas preciosas Ana Rita, Cássia e Gabi, por estarem sempre ao meu lado compartilhando de todos os momentos, pelo estímulo constante, e por alegrarem os meus dias, obrigada por existirem!;

À toda minha família, pelo carinho e apoio constantes;

E em especial aos meus pais maravilhosos, meus alicerces, pela compreensão e incentivo, pelos exemplos de caráter, honestidade e força, e por terem me ensinado que sonhos foram feitos para serem realizados.

RESUMO

O ácido L-piroglutâmico (PGA) é o principal intermediário do ciclo γ -glutamil, que está relacionado à síntese e degradação da glutathione. Altos níveis de PGA no líquido cefalorraquidiano, sangue e outros tecidos, juntamente com a alta excreção urinária do mesmo (acidúria piroglutâmica ou 5-oxoprolinúria), ocorrem em alguns erros inatos do metabolismo envolvendo diferentes enzimas do ciclo γ -glutamil. Essas desordens são clinicamente caracterizadas por anemia hemolítica, acidose metabólica e disfunção neurológica severa. No entanto, os mecanismos de dano cerebral permanecem ainda não esclarecidos. Várias ações neurotóxicas foram previamente atribuídas ao PGA, como excitotoxicidade, inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase e alteração do metabolismo energético cerebral. No presente estudo, investigamos o possível papel do estresse oxidativo na neurotoxicidade do PGA. O efeito *in vitro* do PGA nas concentrações de 0,5 – 3,0 mM foi estudado sobre o potencial antioxidante total (TRAP), a reatividade antioxidante total (TAR), quimiluminescência, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), e atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) em córtex cerebral e cerebelo de ratos de 14 dias de vida. Tanto o TRAP quanto o TAR foram significativamente reduzidos nas estruturas estudadas. Ao contrário, a quimiluminescência e o TBA-RS não foram afetados pelo PGA. As atividades da CAT, SOD e GPx também não foram alteradas. Esses resultados mostram que o PGA pode diminuir as defesas antioxidantes não-enzimáticas em córtex cerebral e cerebelo de ratos. Outros estudos, no entanto, parecem válidos a fim de melhor caracterizar o papel dos radicais livres na neurotoxicidade do PGA.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido L-piroglutâmico; estresse oxidativo; defesas antioxidantes cerebrais

ABSTRACT

L-pyroglutamic acid (PGA) is a major intermediate in the γ -glutamyl cycle, which is related to the synthesis and breakdown of glutathione. High levels of PGA in cerebrospinal fluid, blood and other tissues, in addition to its high urinary excretion, occur in some inborn metabolic defects involving enzymes of the γ -glutamyl cycle. These disorders are clinically characterized by hemolytic anemia, metabolic acidosis and severe neurological disorders. However, mechanisms of brain damage remain unclear. Various neurotoxic actions have already been attributed to PGA such as excitotoxicity, inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity and brain energy impairment. In the present study, we investigated the possible role of oxidative stress in PGA neurotoxicity. The *in vitro* effect of 0.5 – 3.0 mM PGA was studied on total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), total antioxidant reactivity (TAR), chemiluminescence, thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), and activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) in cerebral cortex and cerebellum of 14-day-old rats. Both TRAP and TAR were significantly reduced in the cerebral structures studied. In contrast, chemiluminescence and TBA-RS were not affected by PGA. The activities of CAT, SOD and GPx were also not altered. These results show that PGA may cause an impairment of non-enzymatic antioxidant defenses in rat brain. Further studies, however, appear to be worthwhile in order to better characterize the role of free radicals in the neurotoxicity of PGA.

KEYWORDS: L-pyroglutamic acid; oxidative stress; brain antioxidant defenses

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1– Ácido L-piroglutâmico.....	1
1.1.1 – Papel Fisiológico.....	1
1.1.2 – Deficiências de GS e de GCS.....	2
1.1.2.1 – Manifestações Clínicas.....	3
1.1.2.2 – Genética.....	4
1.1.2.3 – Alterações Bioquímicas e Neuropatológicos.	6
1.1.2.4 – Diagnóstico.....	7
1.1.2.5 – Tratamento.....	8
1.1.3 – Ações Neurotóxicas do PGA.....	9
1.2 – Radicais Livres.....	12
1.2.1 – Definição.....	12
1.2.2 – Lipoperoxidação.....	16
1.2.3 – Defesas Antioxidantes.....	19
1.2.3.1 – Enzimas Antioxidantes.....	22
1.2.3.1.1 – Superóxido Dismutase (SOD).....	23
1.2.3.1.2 – Catalase (CAT).....	24
1.2.3.1.3 – Glutaciona Peroxidase (GPx).....	25
1.2.3.2 – Antioxidantes não-enzimáticos.....	27
1.2.3.2.1 – Ácido Ascórbico.....	27
1.2.3.2.2 – α -tocoferol (Vitamina E).....	28
1.2.3.2.3 – Glutaciona (GSH).....	29
1.2.4 – Estresse Oxidativo.....	31
1.2.5 – Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas.....	32
1.2.6 – Estresse Oxidativo e Deficiências de GS e de GCS.....	34
2. OBJETIVO.....	35

3. ARTIGO CIENTÍFICO

L-pyroglutamic acid reduces the antioxidant capacity in rat brain.....36

4. DISCUSSÃO.....66

5. CONCLUSÃO.....74

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas estruturais dos ácidos glutâmico e piroglutâmico.	1
Figura 2. Ciclo γ -glutamil. Enzimas envolvidas: ① = γ -glutamilcisteína sintetase; ② = glutathiona sintetase; ③ = γ -glutamil transpeptidase; ④ = γ -glutamil ciclotransferase; ⑤ = 5-oxoprolinase; ⑥ = dipeptidase.	2
Figura 3. Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água.	13
Figura 4. Reação de Haber-Weiss.	14
Figura 5. Reações de iniciação, propagação e terminação da lipoperoxidação.	17
Figura 6. Reações em cadeia da lipoperoxidação.	18
Figura 7. Reação de dismutação do radical superóxido.	23
Figura 8. Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao oxigênio no estado fundamental (O_2).	25
Figura 9. Reação de redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água (H_2O) com concomitante oxidação da glutathiona reduzida (GSH).	26
Figura 10. Reação de redução de peróxidos a álcoois, catalisada pela GPx.	26
Figura 11. Estrutura química do antioxidante ácido ascórbico (Vitamina C).	28
Figura 12. Estrutura química do antioxidante α -tocoferol (Vitamina E).	28
Figura 13. Estruturas das glutathionas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).	30

Figura 14. Regeneração da glutathione reduzida (GSH) a partir da glutathione oxidada (GSSG) através da ação da enzima glutathione redutase (GR).30

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	catalase
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
GABA	ácido γ -aminobutírico
GCS	γ -glutamylcisteína sintetase
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GS	glutathione sintetase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LOOH	hidroperóxido lipídico
PGA	ácido L-piroglutâmico
ROO•	radical peroxila
-SH	grupo sulfidrílico
SOD	superóxido dismutase
TAR	reatividade antioxidante total
TBA-RS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRAP	potencial antioxidante total

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Ácido L-pirolglutâmico

1.1.1 – Papel fisiológico

O ácido L-pirolglutâmico (PGA), também conhecido como 5-oxoprolina ou ácido pirrolidona carboxílico, é uma molécula endógena estruturalmente similar ao glutamato (Figura 1).

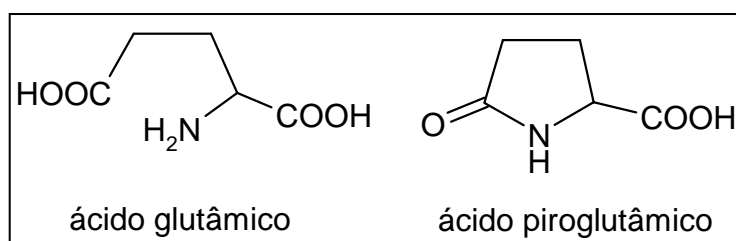


Figura 1. Fórmulas estruturais dos ácidos glutâmico e pirolglutâmico. Adaptado de RIEKE *et al.*, 1984.

Pode ocorrer na forma livre em tecidos animais (MEISTER, 1974) ou ainda estar presente nos resíduos N-terminais de numerosas proteínas, neuropeptídios e outras moléculas, incluindo o hormônio liberador de tirotrina (TRH), o hormônio luteinizante (LH), a neurotensina e a gastrina (RIEKE *et al.*, 1989).

É o principal intermediário no ciclo γ -glutamil (Figura 2), o qual por sua vez está relacionado ao transporte intracelular de aminoácidos livres e à síntese e degradação de glutatona (GSH) (MEISTER, 1991). A biossíntese da GSH é catalisada pela ação consecutiva das enzimas γ -glutamilcisteína sintetase (GCS)

piroglutâmica ou 5-oxoprolinúria (LARSSON *et al.*, 1985; LARSSON E ANDERSON, 2001). A doença foi descrita pela primeira vez por JELLUM e colaboradores em 1970, em um paciente de 19 anos de idade que apresentava sintomas neurológicos progressivos, incluindo retardo mental e distúrbios cerebelares (ataxia, tremor, entre outros), além de acidose metabólica crônica.

1.1.2.1 – *Manifestações Clínicas*

De uma forma geral, essas desordens genéticas são clinicamente caracterizadas por anemia hemolítica e acidose metabólica severa, capaz de levar à morte; além disso, aproximadamente um terço dos pacientes também desenvolvem sintomas neurológicos progressivos, incluindo convulsões, retardo mental, ataxia, retardo psicomotor, espasticidade e grau variado de psicose, entre outros (ROBERTSON *et al.*, 1991; LARSSON E ANDERSON, 2001; RISTOFF *et al.*, 2001). Todos os pacientes com disfunção neurológica apresentam um comprometimento progressivo. De forma geral, aproximadamente 25% dos pacientes morrem no período neonatal. O fenótipo clínico dos pacientes sobreviventes é bastante variado, podendo se apresentar de forma leve, tendo a anemia hemolítica como único sintoma; de forma moderada, apresentando como sintomas anemia hemolítica, acidose metabólica e 5-oxoprolinúria; e de forma severa, desenvolvendo também disfunções neurológicas progressivas além dos outros sintomas já descritos para as outras formas de apresentação clínica da doença (RISTOFF, 2002).

Nessas condições, o mecanismo da acidose metabólica consiste no seguinte: devido aos níveis diminuídos de GSH, há uma diminuição na inibição por *feedback* da enzima γ -glutamilcisteína sintetase, o que resulta na formação excessiva de γ -glutamilcisteína, que é então convertida a PGA pela ação da enzima ciclotransferase. A superprodução de PGA, por sua vez, excede a capacidade da 5-oxoprolinase em convertê-lo a glutamato, levando ao acúmulo de PGA nos fluidos corporais e causando, com isso, acidose metabólica e 5-oxoprolinúria (LARSSON E ANDERSON, 2001; RISTOFF, 2002).

Infecções bacterianas recorrentes também acometem esses pacientes, sendo atribuídas provavelmente a uma função granulocítica deficiente (RISTOFF *et al.*, 2001). A administração de Vitamina E normaliza a função de leucócitos polimorfonucleares (granulócitos) em pacientes com deficiência de GS, sem no entanto normalizar os níveis de GSH, sendo recomendada sua suplementação para evitar a ocorrência de infecções freqüentes nesses pacientes (BOXER *et al.*, 1979).

1.1.2.2 – Genética

O padrão de herança é autossômico recessivo. Muitas vezes a dosagem da atividade enzimática da GS ou GCS feita nos pais dos pacientes revela uma atividade intermediária entre um indivíduo normal e um com a deficiência (ROBERTSON *et al.*, 1991). Essas desordens apresentam um fenótipo clínico heterogêneo, variando da forma leve à severa da doença. Até o presente momento, apenas um gene mas mais de vinte mutações diferentes foram

identificadas na deficiência de GS, o que pode explicar essa heterogeneidade. As principais são mutações *missense* que estão geralmente situadas em regiões que codificam porções da enzima que não fazem parte do sítio ativo, áreas de interação ou sítios de ligação, mas no entanto causam um enovelamento deficiente e degradação proteolítica aumentada da proteína mutante (RISTOFF E LARSSON, 1998; RISTOFF, 2002). Assim, as diferentes formas pelas quais as mutações afetam a estrutura tridimensional da enzima GS contribuem para a diversidade de fenótipos observada. Estudos *in vitro* permitiram uma classificação grosseira de tais mutações de acordo com o dano que elas provocam. A maioria das mutações conhecidas na deficiência de GS afetam o K_m e/ou o V_{max} para glicina, com diminuição da afinidade pelo substrato e da velocidade máxima. Foi demonstrado que uma das mutações diminui a estabilidade da enzima. Assim, diferentes mutações podem afetar a capacidade catalítica da GS por diminuir a afinidade pelo substrato, a velocidade máxima ou a estabilidade da enzima (NJALSSON *et al.*, 2000). Muitas mutações parecem afetar a capacidade de ligação do ligante ou a catálise, enquanto outras provavelmente afetam a dimerização ou o enovelamento protéico (POLEKHINA *et al.*, 1999). Supõe-se que a forma mais branda da doença seja devida a uma mutação que afeta primariamente a estabilidade da enzima, enquanto que a forma severa seja devida a mutações que afetam as propriedades catalíticas da enzima (SPIELBERG *et al.*, 1978). Independente do tipo de mutação, todos os pacientes encontrados até o presente momento apresentam alguma atividade enzimática residual. Parece provável que a completa perda de função de ambos os alelos da glutatona sintetase (GS) seja letal (DAHL *et al.*, 1997; RISTOFF *et al.*, 2000; RISTOFF E LARSSON, 1998).

1.1.2.3 – Alterações Bioquímicas e Neuropatológicas

As alterações bioquímicas observadas por MARSTEIN *et al.* (1981) em órgãos provenientes da autópsia de um paciente com deficiência de GS incluem uma redução marcante na atividade da GS e altos níveis de PGA em todos os tecidos analisados, particularmente nos rins e no cérebro. O conteúdo de glutatona se encontrava muito reduzido em todas as regiões cerebrais, principalmente no cerebelo, estrutura que apresentou também as alterações patológicas mais proeminentes. Outras importantes anormalidades de aminoácidos estavam também centradas no cerebelo. O conteúdo de glutamato, neurotransmissor excitatório das células granulosas, estava fortemente diminuído no córtex cerebelar. O mesmo foi observado com o conteúdo de ácido γ -aminobutírico (GABA), refletindo provavelmente a perda de células de Purkinje, neurônios cerebelares eferentes que utilizam GABA como seu neurotransmissor inibitório (MARSTEIN *et al.*, 1981).

Dentre os achados neuropatológicos da deficiência de GS e deficiência de GCS estão a atrofia seletiva da camada celular granulosa do cerebelo, lesões focais no córtex frontoparietal e lesões bilaterais no córtex visual e tálamo (SKULLERUD *et al.*, 1980). MARSTEIN e colaboradores (1981) observaram em um caso uma atrofia cerebelar generalizada como principal alteração macroscópica, havendo uma perda difusa das células granulosas do córtex cerebelar e perda neuronal com astrocitose no córtex visual. A autópsia de um paciente revelou achados neuropatológicos bastante similares aos casos anteriores, também com perda da camada celular granulosa, além de uma perda quase total das células

de Purkinje. Em pacientes que morreram no período neonatal observou-se uma atrofia cerebelar generalizada, desmielinização e necrose cerebral (RISTOFF, 2002). Além disso, as lesões cerebrais desses pacientes são bastante similares às vistas após intoxicação por mercúrio, encefalopatia tóxica causada pela ingestão e acúmulo de compostos orgânicos de mercúrio que afeta principalmente o cerebelo e algumas regiões do córtex cerebral (SKULLERUD, 1980; MARSTEIN *et al.*, 1981). Nessa doença, os neurônios são presumivelmente danificados por alterações oxidativas resultantes da ação quelante do mercúrio em grupos sulfidrílicos (-SH) vitais. Assim, na acidúria piroglutâmica perdas neuronais similares podem ocorrer devido à ineficiente manutenção dos grupos -SH em sua forma reduzida, provavelmente causada pela deficiência de GSH (MARSTEIN *et al.*, 1981).

Apesar de todos esses achados neuropatológicos em pacientes com deficiência de GS e deficiência de GCS, o mecanismo de dano cerebral permanece ainda não esclarecido.

1.1.2.4 – *Diagnóstico*

O diagnóstico precoce de desordens metabólicas é fundamental para proporcionar uma melhora no quadro clínico dos pacientes. Geralmente suspeita-se de deficiência de GS em recém-nascidos que apresentam um quadro de anemia hemolítica juntamente com acidose metabólica. Nesses casos, o diagnóstico consiste na detecção de baixa atividade enzimática e baixos níveis de GSH no sangue e/ou cultura de fibroblastos do paciente, bem como de altos

níveis de PGA no sangue e na urina, devido à elevada excreção urinária do mesmo. O PGA pode ser detectado através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) (HOFFMANN *et al.*, 1989). Através de técnicas de biologia molecular, pode-se detectar também a presença de mutações nos genes da GS ou GCS.

O diagnóstico pré-natal pode também ser feito através da análise de mutações em vilosidade coriônica (se a mutação já é conhecida na família), através da análise do PGA em líquido amniótico (ERASMUS *et al.*, 1992; MANNING *et al.*, 1994), ou ainda através da análise da atividade enzimática em cultura de amniócitos ou de vilosidade coriônica.

1.1.2.5 – *Tratamento*

Atualmente, o tratamento primário consiste na correção da acidose metabólica, através da administração de bicarbonato, por exemplo.

Além disso, os pacientes com deficiência de GS e deficiência de GCS devem evitar medicamentos que precipitam crises hemolíticas em pacientes com deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase, como fenobarbital, ácido acetilsalicílico e sulfonamidas.

Como os pacientes apresentam baixos níveis de glutathione, acredita-se que estejam mais suscetíveis ao estresse oxidativo e, por isso, tem-se avaliado a possibilidade de utilização de antioxidantes na terapêutica dessas desordens

hereditárias do ciclo γ -glutamil (RISTOFF, 2002). Dessa forma, compostos tiólicos ou outros antioxidantes capazes de cruzar a barreira hemato-encefálica devem ser considerados como possíveis agentes terapêuticos para esses pacientes (MARSTEIN *et al.*, 1981). Estudo realizado por JAIN e colaboradores (1994) avaliou o efeito do tratamento de curta duração com alguns antioxidantes sobre os níveis de glutathiona em um paciente de quatro anos de idade com deficiência de GS. Os resultados mostraram que os mesmos não foram alterados pela administração de α -tocoferol (Vitamina E), mas no entanto foram fortemente aumentados como resultado do tratamento com ácido ascórbico (Vitamina C). O tratamento com N-acetilcisteína (NAC) demonstrou pouco ou nenhum efeito. Além disso, a taxa de hemólise desse paciente foi grandemente reduzida durante o tratamento com ácido ascórbico (JAIN *et al.*, 1994). No entanto, os níveis de PGA não foram alterados durante o tratamento, e não há dados que indiquem que a disfunção neurológica teve alguma melhora significativa.

Ainda assim, os parâmetros prognósticos mais importantes para a sobrevivência dos pacientes e melhora do seu quadro clínico são o diagnóstico precoce, a correção da acidose metabólica e, provavelmente, a suplementação com antioxidantes, alternativa essa que tem sido amplamente estudada (RISTOFF *et al.*, 2001).

1.1.3 – Ações neurotóxicas do PGA

Várias ações neurotóxicas foram atribuídas ao PGA, cujo acúmulo é a principal característica bioquímica da deficiência de GS e deficiência de GCS

(RIEKE *et al.*, 1984; RIEKE *et al.*, 1989; ROTHSTEIN *et al.*, 1993). Sua excitotoxicidade já foi demonstrada; ele se liga aos receptores glutamatérgicos (BARONE E SPIGNOLI, 1990) e também inibe a captação de glutamato por sinaptossomas (BENNET *et al.*, 1973). O PGA age, assim, como um inibidor competitivo do sistema de alta afinidade de captação do glutamato (DUSTICIER *et al.*, 1985). Nesse mesmo estudo, uma captação de alta afinidade para o PGA foi também demonstrada (DUSTICIER *et al.*, 1985). Em conjunto, esses resultados sugerem que o PGA pode interferir com os terminais nervosos glutamatérgicos no cérebro por inibir a captação de glutamato, influenciando assim sua ação neurotransmissora (DUSTICIER *et al.*, 1985).

Além disso, as membranas celulares podem ser um outro sítio de interação do PGA, o qual é capaz de inibir a atividade da Na^+,K^+ -ATPase, enzima essencial para a função e desenvolvimento cerebrais (ESCOBEDO E CRAVIOTO, 1973).

Pode também promover um dano ao metabolismo energético cerebral, visto que inibe a produção de CO_2 e diminui os níveis de ATP e a síntese de lipídios, além de reduzir a atividade dos complexos I + III e complexo IV da cadeia respiratória. Isso indica que a cadeia respiratória é bloqueada em pelo menos dois pontos distintos, sendo esse o mecanismo mais provável de ser o responsável pela redução da produção de CO_2 e dos níveis de ATP causada pelo PGA (SILVA *et al.*, 2001). Ainda, a inibição da síntese de lipídios pode vir a ser danosa ao sistema nervoso central, visto que prejudicaria a sinaptogênese, a mielinização e

outros eventos, dependentes de lipídios, necessários para um desenvolvimento cerebral normal (SILVA *et al.*, 2001).

Ainda, a infusão intraestriatal crônica de PGA produz lesões neuronais em estriado de ratos, além de provocar alterações comportamentais dose-dependentes como assimetria postural, ataxia, descoordenação motora, tremor e discinesias (RIEKE *et al.*, 1984).

1.2 – Radicais Livres

1.2.1– Definição

Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (SOUTHORN E POWIS, 1988; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). O desemparelhamento de elétrons, situação energeticamente instável, é o que confere alta reatividade a essas espécies. Os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical. Radicais 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, 1999). 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 seqüência de reações em cadeia de transferência de elétrons (redox) (MAXWELL, 1995).

Nas reações em cadeia induzidas pelos radicais 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. Tais reações podem ser divididas em:

- * Reações de iniciação, nas quais um radical livre é formado a partir de uma espécie química não-radical estável;

- * Reações de propagação, nas quais um radical livre reage com uma molécula estável gerando um outro radical; e

* Reações de terminação, nas quais dois radicais livres anulam seus elétrons desemparelhados formando um produto estável (BOVERIS, 1998).

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). Cabe à citocromo oxidase mitocondrial a função de acrescentar quatro elétrons em cada molécula de O_2 para gerar duas moléculas de H_2O (BERGENDI *et al.*, 1999). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido a água, podendo ser convertido a intermediários reativos como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (OH^{\bullet}), e também o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (COHEN, 1989) (Figura 3), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (BOVERIS E CHANCE, 1973).

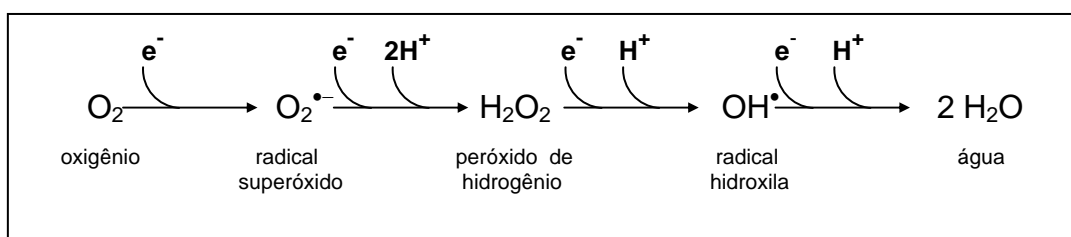


Figura 3. Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água. Adaptado de BOVERIS, 1998.

Apesar de o radical superóxido não poder atacar diretamente o DNA, lipídios e proteínas (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999), em concentrações elevadas o mesmo pode causar a mobilização de ferro a partir da ferritina e também atacar o sítio ativo de diversas enzimas, causando sua inativação acompanhada da liberação de ferro (Halliwell, 2001). Além disso, outras espécies reativas de oxigênio são geradas rapidamente a partir desse precursor. Duas moléculas de

radical superóxido são reduzidas a peróxido de hidrogênio por dismutação espontânea e/ou ação catalítica da enzima antioxidante superóxido dismutase. Por outro lado, radicais hidroxila altamente reativos, capazes de atacar e danificar todas as biomoléculas (HALLIWELL, 2001), são gerados sempre que o peróxido de hidrogênio entrar em contato com íons Cu^{2+} ou Fe^{2+} . A presença de Fe^{3+} livre no líquido cefalorraquidiano aumenta a probabilidade de formação desses radicais hidroxila altamente reativos através da reação de Haber-Weiss (Figura 4), na qual um íon férrico recebe um elétron do superóxido, se tornando íon ferroso, que então reage com o peróxido de hidrogênio para produzir íon hidróxido e radical hidroxila (PACKER *et al.*, 1996). O oxigênio molecular pode ainda ser eletronicamente excitado a oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$), o qual é também gerado a partir dos radicais superóxido e hidroxila. O oxigênio *singlet* não é um radical livre propriamente dito, mas sim uma forma especialmente reativa do oxigênio capaz de oxidar diversas moléculas, incluindo os lipídios de membrana, gerando com isso hidroperóxidos lipídicos (BERGENDI *et al.*, 1999).

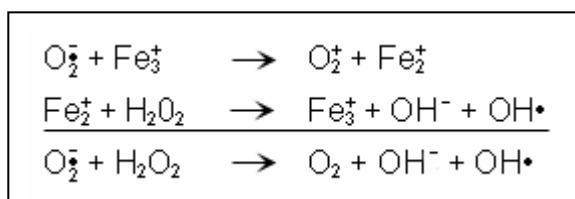


Figura 4. Reação de Haber Weiss. Adaptado de FERREIRA E MATSUBARA, 1997.

O termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do O_2 ($\text{O}_2^{\cdot-}$ e OH^\bullet) mas também alguns não-radicaís derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$), o ácido hipocloroso (HOCl) e o ozônio (O_3) (HALLIWELL E

GUTTERIDGE, 1999). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO^*) e o peroxinitrito (ONOO^-) as principais representantes.

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

Por outro lado, quando formadas em excesso, essas espécies altamente reativas tem o potencial de oxidar moléculas biológicas incluindo proteínas, lipídios e DNA (MAXWELL, 1995). Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, os radicais livres podem promover lipoperoxidação, ou seja, podem reagir com a bicamada lipídica, e também com proteínas das membranas celulares, alterando as características de fluidez de membrana e levando, assim, à liberação de subprodutos potencialmente tóxicos; podem causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o que parece estar

envolvido nos mecanismos patogênicos da aterosclerose (STEINBRECHER *et al.*, 1990); 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.

1.2.2 – Lipoperoxidação

Antes de ser vista como um mecanismo de dano oxidativo, a lipoperoxidação deve ser considerada como um processo fisiológico contínuo que ocorre normalmente nas membranas celulares. Além de ser um fator de renovação da membrana, este processo é essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose. No entanto, por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo. Assim, quando a produção de espécies reativas aumentar além da capacidade de detoxificação das mesmas esse processo será exacerbado, e com isso a lipoperoxidação poderá acarretar profundas alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Isso irá causar perda de seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído e o 4-hidroxinonenal, por exemplo), entre outros eventos (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

A lipoperoxidação, que pode ser catalisada por metais de transição como o ferro, por exemplo, é representada pelas etapas de iniciação, propagação e

terminação (Figuras 5 e 6). A iniciação é causada pelo ataque a um lipídio de membrana por parte de qualquer espécie que tenha reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH₂-). Ao contrário do radical superóxido, que não é suficientemente reativo para abstrair hidrogênios de lipídios, radicais hidroxila podem prontamente iniciar a lipoperoxidação. Já que o átomo de hidrogênio tem apenas um elétron, a abstração de H[•] de um grupo metileno deixa um elétron desemparelhado no carbono (-[•]CH-). Esse radical formado é geralmente estabilizado por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. O destino mais provável desse radical é reagir com o O₂, formando um radical peroxila (ROO[•]). Os radicais peroxila, por sua vez, são capazes de abstrair um próton de outra molécula lipídica, sendo esta fase conhecida como fase de propagação da lipoperoxidação. O radical de carbono formado pode reagir com o O₂ para formar outro radical peroxila, e assim sucessivamente. A abstração de um hidrogênio de outro lipídio por parte do radical peroxila gerará um hidroperóxido lipídico (LOOH). O término da reação poderá ocorrer quando dois radicais produzidos nas etapas anteriores reagirem entre si, formando um produto estável (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999).

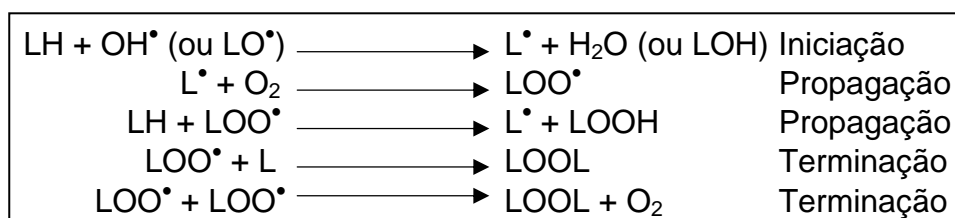


Figura 5. Reações de iniciação, propagação e terminação da lipoperoxidação. Adaptado de FERREIRA E MATSUBARA (1997).

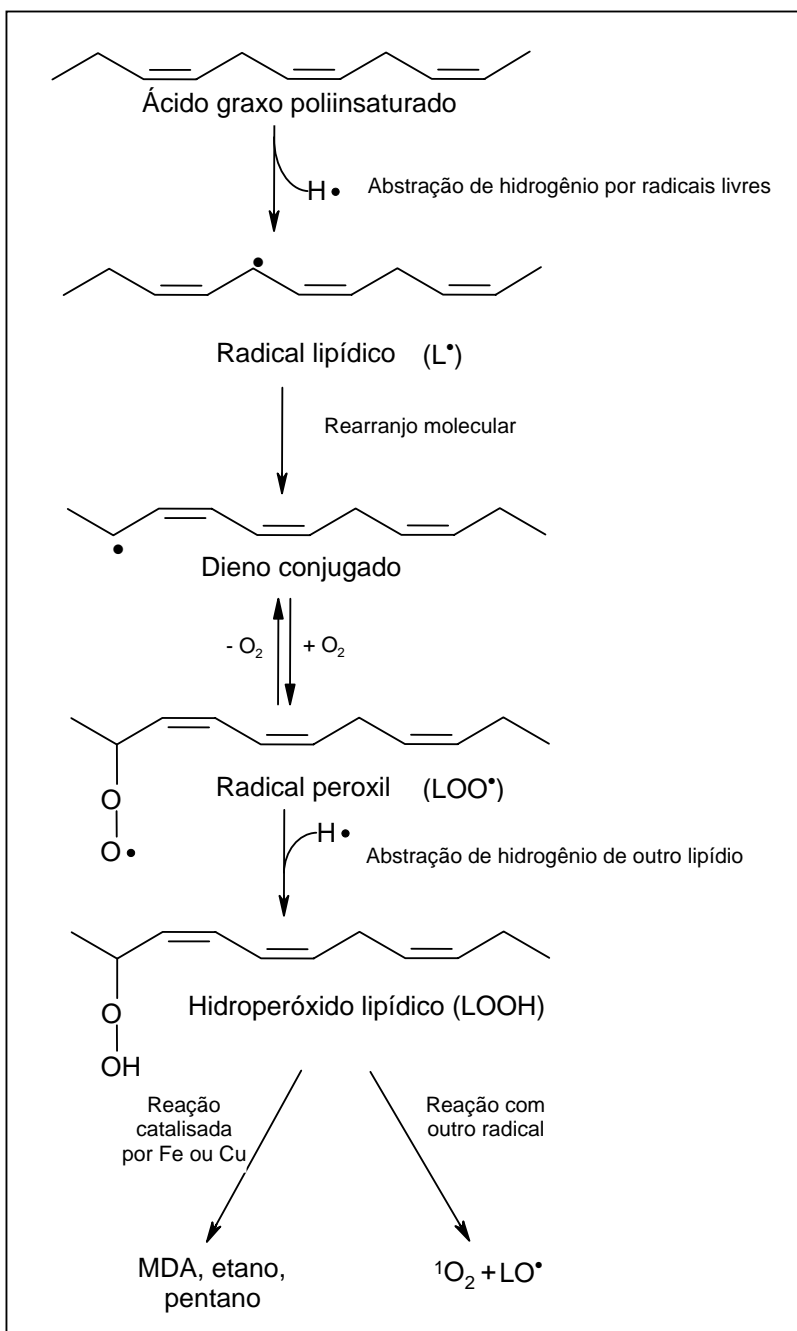


Figura 6. Reações em cadeia da lipoperoxidação. Adaptado de HALLIWELL E GUTTERIDGE (1999).

1.2.3 – Defesas Antioxidantes

Para evitar os efeitos danosos das espécies reativas, existem mecanismos eficientes para a detoxificação das mesmas, como a produção endógena de enzimas antioxidantes e alguns antioxidantes não-enzimáticos. Embora diferindo de tecido para tecido em sua composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo e compreendem:

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

- * proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo), como as transferrinas e haptoglobinas;

- * 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 glutathione, α -tocoferol, ácido ascórbico, bilirrubina e ácido úrico.

Dessa forma, em condições normais, nosso organismo é protegido contra o dano oxidativo induzido por radicais livres através de vários antioxidantes com diferentes funções que constituem um sistema de defesa tanto independente quanto cooperativo, ou mesmo sinérgico. A primeira linha de defesa é constituída dos antioxidantes preventivos, ou seja, aqueles que suprimem a formação de radicais livres. Para ter essa ação, alguns antioxidantes decompõem hidroperóxidos lipídicos, como as enzimas glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase, e outros decompõem o peróxido de hidrogênio, como a enzima

catalase. Nessa etapa atuam também agentes quelantes de metais de transição, como a transferrina, ferritina e lactoferrina, que quelam o ferro, enquanto a ceruloplasmina age como um quelante de cobre. Ainda nessa linha de defesa temos também os carotenóides, como o β -caroteno e o licopeno, que eliminam o oxigênio *singlet* rapidamente, inibindo a formação de hidroperóxidos lipídicos (Niki, 1993).

Apesar de a geração de radicais livres ser minimizada pelos antioxidantes preventivos, pequenas quantidades ainda podem ser formadas *in vivo*. A partir daí atua então a segunda linha de defesa, constituída pelos *scavengers* que seqüestram os radicais ativos para suprimir a iniciação ou impedir a propagação de reações em cadeia. Podem ser divididos em antioxidantes hidrofílicos (Vitamina C, ácido úrico, bilirrubina, albumina, tióis) e lipofílicos (Vitamina E, ubiquinol). Os carotenóides podem também agir como *scavengers*. De uma forma geral, os *scavengers* atuam através da doação de um hidrogênio ao radical ativo, formando-se um radical derivado do antioxidante, que pode então reagir com outro radical para formar um não-radical, reagir com um agente redutor para ser regenerado ou ainda reagir com lipídios ou hidroperóxidos lipídicos para formar radicais ativos, que podem iniciar outra reação em cadeia. A ação realizada irá depender de vários fatores, dentre os quais as concentrações de radicais e de agentes redutores presentes (Niki, 1993).

No entanto, os vários sistemas de defesa antioxidante presentes no organismo não conseguem prevenir completamente os danos causados por

espécies reativas às biomoléculas; conseguem apenas controlar os níveis dessas espécies, mas não eliminá-las. Sistemas de reparo, que constituem a terceira linha de defesa do organismo, tornam-se então de importância fundamental para impedir o acúmulo de biomoléculas danificadas oxidativamente (HALLIWELL, 2001). Várias fosfolipases reparam fosfolipídios danificados oxidativamente. A fosfolipase A₂, por exemplo, cliva seletivamente lipídios peroxidados das membranas, prevenindo com isso o acúmulo de produtos tóxicos (SEVANIAN E KIM, 1985). Os hidroperóxidos liberados são reduzidos por peroxidases aos seus álcoois correspondentes e detoxificados. Os sistemas de reparo do DNA também tem grande importância no sistema total de defesa contra o dano oxidativo. Várias enzimas como as glicosilases e nucleases reparam o DNA danificado, removendo a porção danificada através de uma clivagem na ponte base-pentose. A seguir, tem-se uma nova síntese de DNA para preencher a porção perdida e, para finalizar, uma DNA ligase irá unir o DNA recém-sintetizado com o restante da fita (NIKI, 1993).

Por fim existe ainda o mecanismo de adaptação, que constitui a quarta linha de defesa do organismo, onde os sinais gerados para produção e reação de radicais livres induzem a formação e o transporte dos antioxidantes apropriados até o local adequado (NIKI, 1993).

1.2.3.1 – Enzimas Antioxidantes

As enzimas de defesa antioxidante operam como um sistema coordenado, balanceado, e atuam juntamente com outros antioxidantes ditos não-enzimáticos (como o α -tocoferol, ácido ascórbico e glutatona) a fim de proteger o organismo da injúria celular causada pelo estresse oxidativo.

As enzimas antioxidantes estão presentes no organismo em diferentes concentrações, dependendo do tecido em que se encontram (Tabela 1). O fígado, por exemplo, contém altas concentrações tanto de catalase quanto de glutatona peroxidase. A catalase está presente também em altas concentrações no eritrócito. Por outro lado, o cérebro contém níveis muito baixos de catalase, sendo então de fundamental importância nesse tecido a presença da superóxido dismutase e glutatona peroxidase, presentes em todas as regiões cerebrais.

Tabela 1. Atividade das enzimas catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) em tecidos humanos.

Tecido	Atividade da CAT (por mg de proteína)	Atividade da GPx (por mg de proteína)
Fígado	~ 1400	~ 150
Eritrócitos	~ 1100	~ 20
Pulmões	~ 200	~ 50
Coração	~ 60	~ 60
Cérebro	~ 15	~ 70
Tecido adiposo	~ 400	~ 80

Atividade da CAT expressa em unidades/mg proteína, sendo 1 unidade definida como 1 μ mol de H_2O_2 consumido por minuto. Atividade da GPx expressa em unidades/mg proteína, sendo 1 unidade definida como 1 μ mol de NADPH consumido por minuto.

Adaptado de HALLIWELL E GUTTERIDGE (1999).

1.2.3.1.1– Superóxido Dismutase (SOD)

O íon superóxido é um dos fatores principais da toxicidade do O_2 , sendo a SOD uma defesa essencial contra ele. Dessa forma, o papel biológico das SOD consiste em atuar como *scavengers* do íon superóxido (FRIDOVICH, 1975; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999).

Tais radicais superóxido podem ser gerados em várias situações, como por exemplo na auto-oxidação de hidroquinonas, catecolaminas e tetraidropteridinas, e também na ação catalítica de diversas enzimas, como a xantina oxidase e a aldeído oxidase (FRIDOVICH, 1975).

Existem várias formas dessa metaloenzima, variando sua localização e o metal presente em sua estrutura. Todas as formas, no entanto, catalisam a mesma reação: aceleram grandemente a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ (íon superóxido), formando peróxido de hidrogênio e oxigênio (Figura 7) (FRIDOVICH E MCCORD, 1969; BERGENDI *et al.*, 1999; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999).

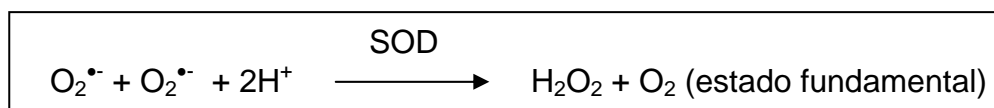


Figura 7. Reação de dismutação do radical superóxido. Adaptado de HALLIWELL E GUTTERIDGE (1999).

Dentre as diferentes formas de SOD, temos a CuZnSOD, que contém cobre e zinco em sua estrutura, e que ocorre em praticamente todas as células eucarióticas. Em células animais está localizada no citosol, estando também presente em lisossomos, no núcleo celular e no espaço entre as membranas

mitocondriais interna e externa. Tem sido relatado que peroxissomas também contém CuZnSOD (FRIDOVICH, 1995; WARD E PETERS, 1995). São formadas por duas subunidades idênticas, e contêm um Cu^{2+} e um Zn^{2+} em cada subunidade (FRIDOVICH, 1975). Os íons cobre na CuZnSOD parecem funcionar na reação de dismutação sofrendo alternadamente oxidação e redução. O Zn^{2+} , por sua vez, não atua no ciclo catalítico, mas ajuda a estabilizar a enzima (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). Existe ainda um subtipo de CuZnSOD, conhecida como SOD extracelular (EC-SOD), presente em fluidos extracelulares (ABRAHAMSSON *et al.*, 1992).

Uma segunda forma de SOD também presente em tecidos animais é a MnSOD. Essa SOD contendo manganês está por sua vez principalmente localizada nas mitocôndrias e apresenta quatro subunidades, cada qual contendo um átomo de manganês. Por fim existe ainda a SOD contendo ferro em sua estrutura (FeSOD), que no entanto é encontrada apenas em plantas e bactérias (FRIDOVICH, 1975).

1.2.3.1.2– Catalase (CAT)

A dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ catalisada pela SOD gera H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), espécie esta que é também gerada por diversas oxidases *in vivo*, incluindo xantina oxidase, urato oxidase e D-aminoácido oxidase. A CAT irá então catalisar diretamente a decomposição do H_2O_2 ao oxigênio no estado fundamental. O mecanismo de reação da CAT é, assim como o da SOD,

essencialmente uma dismutação; uma molécula de H_2O_2 é reduzida a H_2O e a outra é oxidada a O_2 (Figura 8).

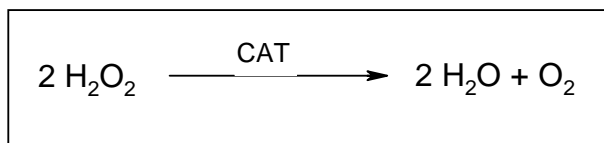


Figura 8. Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao oxigênio no estado fundamental (O_2). Adaptado de HALLIWELL E GUTTERIDGE (1999).

A CAT de tecidos animais e vegetais está principalmente localizada em organelas subcelulares conhecidas como peroxissomas, que contêm várias enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio, e também no citosol (CHANCE *et al.*, 1979; WARD E PETERS, 1995).

Nos animais, a catalase está presente em todos os principais órgãos do corpo, estando principalmente concentrada no fígado. Alguns órgãos como o coração, músculo esquelético e cérebro contêm níveis mais baixos de CAT do que o fígado, por exemplo, e estão portanto mais expostos aos danos provocados pelos radicais livres (BOVERIS E CHANCE, 1973).

1.2.3.1.3 – Glutathione Peroxidase (GPx)

Presente em animais, plantas e muitas bactérias aeróbicas em concentrações intracelulares que estão freqüentemente na faixa de milimolar, essa enzima atua removendo o H_2O_2 e outros peróxidos através do acoplamento de sua redução a H_2O com a concomitante oxidação da GSH (Figura 9).

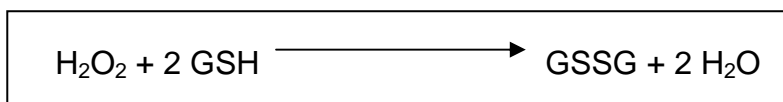


Figura 9. Reação de redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água (H_2O) com concomitante oxidação da glutathiona reduzida (GSH). Adaptado de HALLIWELL E GUTTERIDGE (1999).

Geralmente localiza-se nas membranas celulares e é específica para GSH como doador de hidrogênios, mas pode agir em outros peróxidos que não o H_2O_2 , sendo assim considerada um dos principais sistemas de defesa antioxidante presentes no organismo humano, particularmente eficiente na proteção contra a lipoperoxidação (WENDEL, 1981). Pode então catalisar a redução dependente de GSH de hidroperóxidos de ácidos graxos (como por exemplo os produtos de peroxidação dos ácidos linoleico e linolênico), do hidroperóxido de *tert*-butil e do 7- β -hidroperóxido do colesterol, entre outros. Em todos os casos o grupo peróxido será por fim reduzido a um álcool (Figura 10).

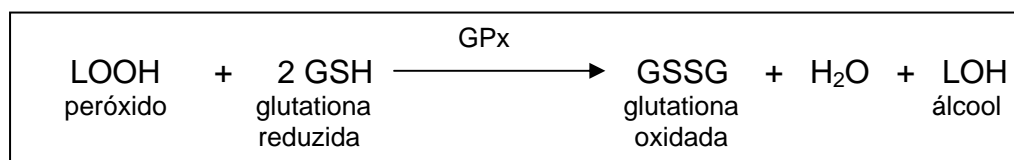


Figura 10. Reação de redução de peróxidos a álcoois, catalisada pela GPx. Adaptado de HALLIWELL E GUTTERIDGE (1999).

A GPx, no entanto, não pode atuar sobre peróxidos de ácidos graxos esterificados a moléculas lipídicas em lipoproteínas ou membranas; estes devem, primeiramente, ser liberados pela ação de lipases.

Existem dois tipos de GPx: uma que utiliza selênio como cofator (encontrada no citosol e na mitocôndria); e outra que não depende de selênio (encontrada no citosol, responsável pela metabolização de hidroperóxidos orgânicos). A primeira apresenta quatro subunidades, cada uma contendo um

átomo de selênio (Se) em seu sítio ativo. O Se está presente no sítio ativo como selenocisteína (cisteína na qual o átomo de enxofre foi substituído por selênio). Daí a importância da ingestão de traços de selênio na dieta, elemento essencial, que irá proporcionar o cofator necessário para a ação dessa GPx.

1.2.3.2 – Antioxidantes não-enzimáticos

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou previnem a oxidação desse substrato. Desse modo, os antioxidantes atuam como protetores contra a oxidação de biomoléculas por radicais livres, impedindo com isso a reação em cadeia desencadeada pelos mesmos (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999; FANG *et al.*, 2002).

1.2.3.2.1 Ácido Ascórbico

Também conhecido como Vitamina C, o ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel essencial, ou seja, deve ser obtida através da dieta porque os humanos, bem como outros animais, não conseguem sintetizá-la (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). Está presente em altas concentrações no sistema nervoso central, tendo inclusive níveis maiores no líquido cefalorraquidiano do que no plasma (LONNROT *et al.*, 1996). Tem como principal função a regeneração do α -tocoferol, atuando também como *scavenger* de radicais livres, incluindo os radicais superóxido, alcóxila, peróxila e hidroxila (HALLIWELL, 2001) e como cofator de enzimas envolvidas na síntese do colágeno.

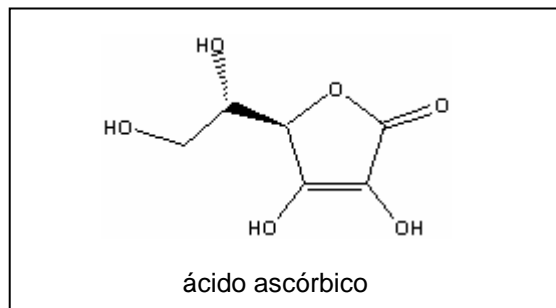


Figura 11. Estrutura química do antioxidante ácido ascórbico (Vitamina C). Adaptado de HALLIWELL E GUTTERIDGE (1999).

1.2.3.2.2 – α -Tocoferol (Vitamina E)

Por ser lipossolúvel, o α -Tocoferol está presente nas membranas celulares, nas mitocôndrias e em lipoproteínas plasmáticas. Quando reage com um radical livre, forma-se o radical tocoferoxil, que pode ser regenerado à α -tocoferol pelo ácido ascórbico ou pela GSH (SOKOL, 1989; WARD E PETERS, 1995; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). É um antioxidante muito potente capaz de inibir as reações em cadeia da lipoperoxidação. Seu grupamento fenólico –OH rapidamente elimina radicais peroxila, convertendo-os em radicais tocoferoxila, que tem capacidade muito menor de continuar a lipoperoxidação, inibindo com isso a propagação dessa reação em cadeia (HALLIWELL, 2001).

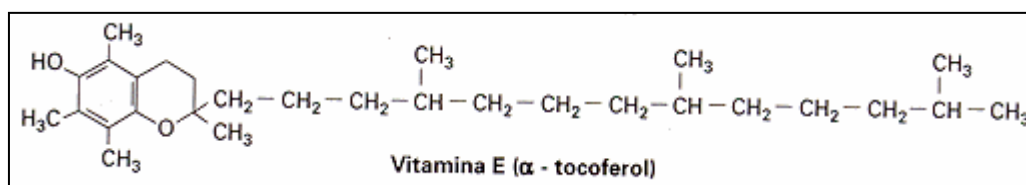


Figura 12. Estrutura química do antioxidante α -tocoferol (Vitamina E). Adaptado de HALLIWELL E GUTTERIDGE (1999).

1.2.3.2.3 – Glutathiona (GSH)

A GSH, um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, é o principal tiol intracelular de baixo peso molecular presente na maioria das células. É um antioxidante endógeno que atua sinergicamente com o α -tocoferol e o ácido ascórbico, sendo fundamental para mantê-los nas suas formas reduzidas. Atua também como um cofator enzimático, sendo particularmente importante na reação catalisada pela GPx, enzima que decompõe peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos. Além disso, desempenha outras funções como a proteção de grupos sulfidrílicos (-SH) de proteínas contra oxidação e a manutenção da comunicação intercelular, além de servir como uma forma atóxica de depósito e armazenamento de cisteína (MEISTER, 1991; ANDERSON, 1998; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). Após ser utilizada para a redução de determinado substrato, a GSH reduzida é convertida à sua forma oxidada (GSSG), também chamada de dissulfeto de glutathiona. No entanto, a razão entre a glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (Figura 13) se mantém continuamente alta, sendo que menos de 5% da glutathiona total está presente na forma oxidada.

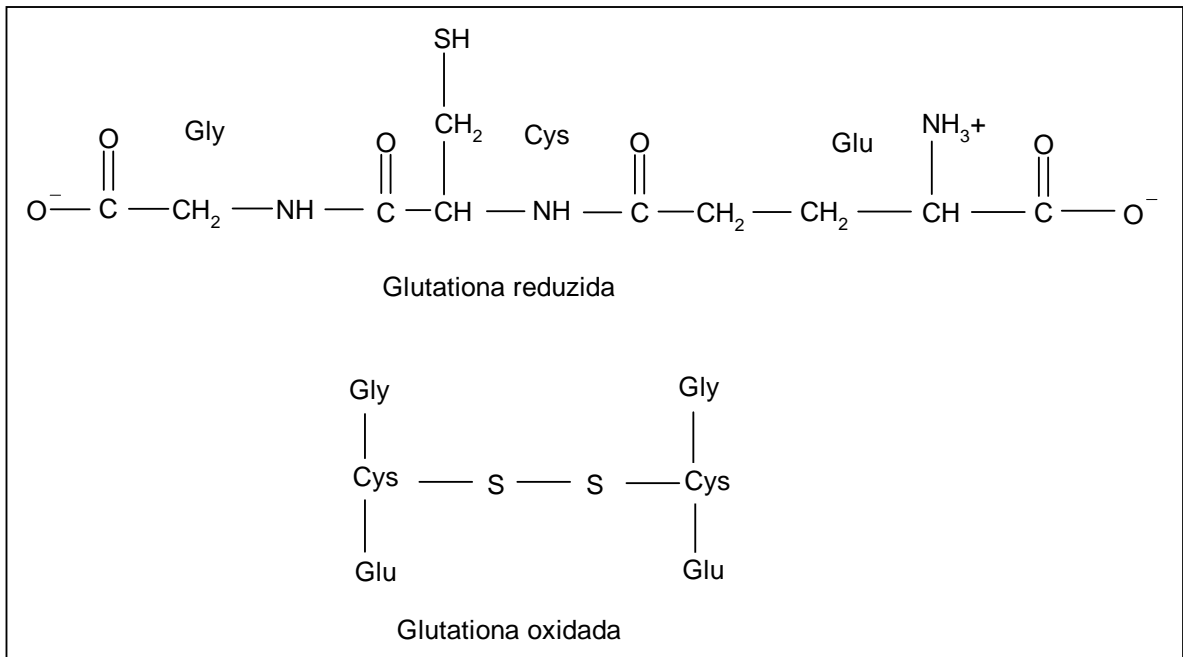


Figura 13. Estruturas das glutationas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Adaptado de HALLIWELL E GUTTERIDGE (1999).

Isso é possível porque a GSH pode ser prontamente regenerada a partir da GSSG através da ação da enzima glutationa redutase (GR) (Figura 14), reação que requer uma molécula de NADPH para regenerar cada molécula de GSH (CHANCE *et al.*, 1979; WARD E PETERS, 1995). Com isso garante-se que a GSH esteja na maior parte em sua forma reduzida, o que é essencial para sua ação como redutora de outras moléculas biológicas.

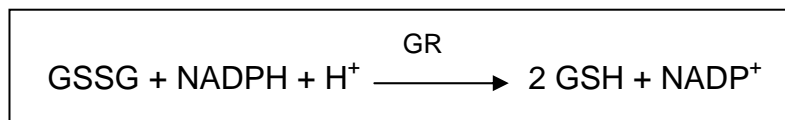


Figura 14. Regeneração da glutationa reduzida (GSH) a partir da glutationa oxidada (GSSG) através da ação da enzima glutationa redutase (GR). Adaptado de HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999.

1.2.4 – Estresse Oxidativo

Em condições normais (organismos saudáveis), a produção de espécies reativas é em sua maior parte balanceada pelos sistemas de defesa antioxidante do organismo. No entanto, em determinadas condições patológicas pode haver um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante, favorecendo com isso a ocorrência de estresse oxidativo.

Assim, o termo “Estresse Oxidativo” é usado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade de reparo 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, injúria ou morte celular:

* *Adaptação*: as células podem geralmente 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.

* *Injúria celular*: o estresse oxidativo pode danificar todos os alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). A resposta à injúria pode ser reversível: a célula entra em um estado de *steady state* 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 glutatona, 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 e 4-hidroxinonenal, 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).

1.2.5 – Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas

Sabe-se que o sistema nervoso central é particularmente suscetível ao estresse oxidativo, especialmente devido: ao seu elevado consumo de oxigênio, já que utiliza uma grande quantidade de O₂ em uma massa de tecido relativamente pequena; ao seu alto conteúdo de ferro, que pode favorecer a lipoperoxidação; ao seu alto conteúdo lipídico em relação aos outros tecidos,

principalmente lipídios de cadeia lateral altamente poliinsaturadas, que são extremamente suscetíveis à lipoperoxidação; e à sua modesta defesa antioxidante, sendo os níveis de catalase particularmente baixos em muitas regiões cerebrais (HALLIWELL, 1996; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999).

Os radicais livres e o estresse oxidativo parecem estar envolvidos na patogênese dos danos neurológicos de várias doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, as escleroses múltipla e amiotrófica lateral, doenças cerebrovasculares, epilepsia, desmielinização e demência, entre outras (RESNICK E PACKER, 1993; MAXWELL, 1995; DELANTY E DICHTER, 1998; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). MOYANO e colaboradores (1997) observaram que os níveis do antioxidante tocoferol se encontram diminuídos em pacientes apresentando alguns erros inatos do metabolismo não tratados. Nesse mesmo estudo, o tratamento com tocoferol corrigiu a deficiência de antioxidantes apresentada nas doenças estudadas. Ainda, diversos estudos realizados em nosso grupo de pesquisa revelaram que o estresse oxidativo também está aumentado em modelos experimentais químicos de alguns erros inatos do metabolismo como hiperprolinemia tipo II (DELWING *et al.*, 2003), hiperargininemia (WYSE *et al.*, 2001) e fenilcetonúria (KIENZLE-HAGEN *et al.*, 2002). Porém, existem ainda incertezas e controvérsias no que diz respeito ao estresse oxidativo ser a causa ou a consequência das doenças nas quais está envolvido (HALLIWELL, 1994).

1.2.6 – Estresse Oxidativo e Deficiências de GS e de GCS

Tem sido postulado que os pacientes com deficiência de GS e deficiência de GCS estariam mais suscetíveis ao estresse oxidativo visto que apresentam níveis reduzidos de GSH, levando com isso a níveis aumentados de radicais livres nos tecidos, o que poderia então estar relacionado ao dano cerebral observado nesses pacientes (LARSSON E ANDERSON, 2001). Ainda, observou-se que as lesões cerebrais de pacientes afetados pela deficiência de GS são similares às aquelas vistas em intoxicações por mercúrio, que estão associadas por sua vez a uma produção aumentada de radicais livres, e portanto tem-se sugerido que o estresse oxidativo possa estar envolvido no dano neurológico que ocorre nessas desordens (MARSTEIN *et al.*, 1981; LARSSON E ANDERSON, 2001). Por outro lado, pacientes com deficiência de 5-oxoprolinase, outro erro inato do metabolismo do ciclo γ -glutamil no qual há acúmulo de PGA sem haver no entanto deficiência de GSH, podem também apresentar disfunção neurológica severa, sugerindo que o PGA por si só pode ser deletério ao sistema nervoso central (LARSSON E ANDERSON, 2001). Portanto, torna-se importante investigar o possível papel do estresse oxidativo na neurotoxicidade do PGA a fim de avaliar sua participação nos mecanismos dos danos cerebrais responsáveis pela disfunção neurológica observada nos pacientes com deficiência de GS e deficiência de GCS.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito *in vitro* do PGA sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e cerebelo de ratos de 14 dias de vida. Dentre esses parâmetros estão o Potencial Antioxidante Total (TRAP) e a Reatividade Antioxidante Total (TAR), que avaliam as defesas antioxidantes não-enzimáticas, e também a quimiluminescência e os níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS), que são índices de lipoperoxidação. Outro parâmetro ainda é a medida da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), utilizado para acessar as defesas antioxidantes enzimáticas do tecido. Com isso, esse trabalho teve por objetivo investigar o possível papel do estresse oxidativo na neurotoxicidade do PGA a fim de avaliar o envolvimento de radicais livres nos mecanismos responsáveis pela disfunção neurológica observada nos pacientes com alguns erros inatos do ciclo γ -glutamil, como a deficiência de GS e a deficiência de GCS.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

L-Pyroglutamic acid reduces the antioxidant capacity of rat brain

Submetido à Experimental Neurology

L-Pyroglutamic acid reduces the antioxidant capacity of rat brain

*Carolina D. Pederzoli, Carla G. Testa, Janaina Araldi, Karina Durigon, Mirian B. Sgarbi, Raquel Bridi, Ângela M. Sgaravatti, Cristina C. Prestes, Clóvis M. D. Wannmacher, Angela T. S. Wyse, Moacir Wajner and Carlos S. Dutra-Filho**

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

***Corresponding Author**

*Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil,*

Phone: +55 51 3316 5573

Fax: +55 51 3316 5535,

E-mail: dutra@ufrgs.br

Abstract

L-pyroglutamic acid (PGA) is a major intermediate in the γ -glutamyl cycle, which is related to the synthesis and breakdown of glutathione. High levels of PGA in cerebrospinal fluid, blood and other tissues, in addition to its high urinary excretion, occur in some inborn metabolic defects involving enzymes of the γ -glutamyl cycle. These disorders are clinically characterized by hemolytic anemia, metabolic acidosis and severe neurological disorders. However, mechanisms of brain damage remain unclear. Various neurotoxic actions have already been attributed to PGA such as excitotoxicity, inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity and brain energy impairment. In the present study, we investigated the possible role of oxidative stress in PGA neurotoxicity. The *in vitro* effect of 0.5 – 3.0 mM PGA was studied on total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), total antioxidant reactivity (TAR), chemiluminescence, thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), and activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) in cerebral cortex and cerebellum of 14-day-old rats. Both TRAP and TAR were significantly reduced in the cerebral structures studied. In contrast, chemiluminescence and TBA-RS were not affected by PGA. The activities of CAT, SOD and GPx were also not altered. These results show that PGA may cause an impairment of non-enzymatic antioxidant defenses in rat brain. Further studies, however, appear to be worthwhile in order to better characterize the role of free radicals in the neurotoxicity of PGA.

Keywords: L-pyroglutamic acid; oxidative stress; brain antioxidant defenses

Introduction

L-pyrroglutamic acid (PGA), also known as 5-oxoproline or pyrrolidone carboxylic acid, is an endogenous molecule structurally derived from L-glutamate, being a major intermediate in the γ -glutamyl cycle, which is related to the synthesis and breakdown of glutathione (GSH) and also to the intracellular transport of free amino acids (Meister, 1991).

High levels of PGA in cerebrospinal fluid, blood and other tissues, in addition to its high urinary excretion, occur in some inborn metabolic defects involving enzymes participating in the γ -glutamyl cycle. Among them, the most common are glutathione synthetase deficiency (GSD) and γ -glutamylcysteine synthetase deficiency (GCSD) (Jellum et al., 1970; Larsson et al., 1985; Larsson and Anderson, 2001). These autosomic recessively inherited disorders are clinically characterized by hemolytic anemia and metabolic acidosis; moreover, about one third of the patients also develop progressive neurological symptoms, including seizures, mental retardation, failure to thrive, ataxia, psychomotor delay, spasticity, demyelination and others (Larsson and Anderson, 2001; Ristoff et al., 2001). These disorders present a heterogeneous clinical phenotype, ranging from mild to severe form. So far, only one gene but more than twenty different mutations were identified in GSD. Most of the mutations are leaky, which means that the patients have considerable residual enzyme activity. It seems likely, however, that complete loss of function of both glutathione synthetase (GS) alleles would probably prove lethal (Dahl et al., 1997; Ristoff et al., 2000; Ristoff and Larsson, 1998). Among the neuropathological findings of GSD and GCSD are selective atrophy of the granule cell layer of the cerebellum, focal lesions in

frontoparietal cortex and bilateral lesions in visual cortex and thalamus (Skullerud et al., 1980; Marstein et al., 1981). However, the mechanisms of brain damage remain unclear.

PGA, the biochemical hallmark in GSD and GCSD, was already shown to be neurotoxic (Rieke et al., 1984; Rieke et al., 1989). Its excitotoxicity was demonstrated; it binds to glutamate receptors (Barone and Spignoli, 1990) and inhibits glutamate uptake by synaptosomes (Bennet et al., 1973). It was found that PGA acts as a competitive inhibitor in the high affinity uptake system of glutamate and also binds to glutamate nerve terminals (Dusticier et al., 1985). Besides, PGA is capable of inhibiting Na⁺,K⁺-ATPase activity, an essential enzyme for cerebral function and development (Escobedo and Cravioto, 1973). It may also promote brain energy impairment, shown by the inhibition of CO₂ production, ATP levels and lipid synthesis, and also by the reduction of complex I + III and complex IV activities in the respiratory chain (Silva et al., 2001). In addition, chronic intrastriatal infusion of PGA produces selective neuron sparing lesions in the rat striatum (Rieke et al., 1984), which has been assumed to be due to glutamate-induced excitotoxic damage (Rothstein et al., 1993).

Moreover, it has been postulated that GSD and GCSD patients would be more susceptible to oxidative stress because they may present reduced GSH levels, leading to enhanced levels of free radicals in the tissues, which could be then related to the cerebral damage observed in the patients (Larsson and Anderson, 2001). Furthermore, it was found that the cerebral lesions of patients affected by GSD resemble those seen in mercury intoxication, which is associated with increased free radical production, and therefore it has been suggested that

oxidative stress may be involved in the neurological damage occurring in these disorders (Marstein et al., 1981; Larsson and Anderson, 2001). Interestingly, patients with 5-oxoprolinase deficiency, a condition where PGA is accumulated without GSH deficiency, present severe neurological dysfunction, suggesting that PGA alone may be deleterious to central nervous system (Larsson and Anderson, 2001).

So, in the present study we investigated the possible role of oxidative stress in PGA neurotoxicity in order to evaluate its participation in the brain damage mechanisms responsible for neurological impairment observed in GSD and GCSD patients. To accomplish that, the *in vitro* effect of PGA was studied on some oxidative stress parameters, namely total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR), which evaluate non-enzymatic antioxidant defenses; chemiluminescence and thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), which are indexes of lipid peroxidation; and activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), to access enzymatic antioxidant defenses, in cerebral cortex and cerebellum of 14-day-old rats.

Materials and Methods

Reagents

All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) except by thiobarbituric acid, which was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) that was purchased from Wako Chemicals (USA).

L-pyroglutamic acid was prepared on the day of the experiment in the incubation medium used for each technique and added to homogenates at final concentrations of 0.5, 1.0 and 3.0 mM.

Animals

Fourteen-day-old Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, were used. Rats were kept with dams until they were sacrificed. The dams had free access to water and 20% (w/w) protein commercial chow (Germani, Porto Alegre, RS, Brazil). They were kept in a room with a 12:12 h light/dark cycle (lights on 07:00-19:00 h) and with air conditioned controlled temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). The "Principles of laboratory animal care" (NIH publication #80-23, revised 1996) were followed in all the experiments.

Tissue preparation and incubation

Rats were sacrificed by decapitation without anesthesia, and the brain was immediately removed and kept on an ice-plate. The olfactory bulb, pons and medulla were discarded and both cerebral cortex and cerebellum were dissected, weighed and kept chilled until homogenization. Cerebral cortex and cerebellum were homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of the appropriate medium. Homogenates were centrifuged at 750 g for 10 min at 4°C to discard nuclei and cell debris (Lesuy et al., 1985; Lissi et al., 1986). The pellet was discarded and the supernatant was separated and immediately used for the measurements.

Cerebral cortex and cerebellum supernatants were incubated for 1 hour at 37°C in the presence of PGA at final concentrations ranging from 0.5 to 3.0 mM.

Controls were incubated only with the medium. After incubation, aliquots were taken to measure chemiluminescence, TBA-RS, TRAP and TAR. To test the action of PGA on the antioxidant enzymes CAT, SOD and GPx, the organic acid was added to the tissue homogenates at the time of assay of each enzyme activity without previous incubation.

Total radical-trapping antioxidant potential (TRAP)

TRAP was determined by measuring the chemiluminescence intensity of luminol induced by 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP) thermolysis (Lissi et al., 1992; Evelson et al., 2001) in a Wallac 1409 Scintillation Counter. Tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. The initial chemiluminescence value was obtained by adding 3 mL of ABAP 10 mM, dissolved in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.4, plus 10 μ L of luminol (5,6 mM) to a glass scintillation vial. Ten μ L of 300 μ M Trolox (water-soluble α -tocopherol analogue) or tissue supernatant were then added to that vial and the chemiluminescence was measured until it achieved the initial levels. The time necessary for the chemiluminescence intensity returns to the initial value is called induction time, which is directly proportional to the antioxidant capacity of the tissue. The induction time of the tissue was compared to that presented by Trolox. Results were reported as nmol Trolox/mg protein.

Total antioxidant reactivity (TAR)

TAR was determined by measuring the luminol chemiluminescence intensity induced by ABAP according to the method of Lissi et al. (1995) using a

Wallac 1409 Scintillation Counter. Cerebral tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 0.1 mM glycine buffer, pH 8.6. The background chemiluminescence was measured by adding 4 mL of 2 mM ABAP, prepared in the same buffer used for homogenization, plus 15 μ L of luminol (4 mM) into a glass scintillation vial. This was considered to be the basal value. Ten μ L of 10 to 100 μ M Trolox (curve calibration) or tissue supernatant was then added and the chemiluminescence was measured during 60 sec. The rapid reduction in luminol intensity is considered as a measure of its TAR capacity. The results were reported as nmol Trolox/mg protein.

Chemiluminescence

Samples were assayed for chemiluminescence in a dark room by the method of Lissi et al. (1986) using a beta liquid scintillation spectrometer Tri-Carb 2100TR. Cerebral tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. Incubation flasks contained 3.5 mL of the medium consisting in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. The background chemiluminescence was measured for 5 min. An aliquot of 0.5 mL of supernatant was added and chemiluminescence was measured for 10 minutes at room temperature. The background chemiluminescence was subtracted from the total value. Chemiluminescence was calculated as cps/mg protein.

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS were measured as described by Esterbauer and Cheeseman (1990) using a Beckman DU[®]640 Spectrophotometer. Cerebral tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. Briefly, 300 μ L of cold 10% trichloroacetic acid were added to 150 μ L of supernatant and centrifuged at 300 *g* for 10 min. Three hundred μ L of the supernatant were transferred to a Pyrex tube and incubated with 300 μ L of 0.67% thiobarbituric acid in 7.1% sodium sulphate in a boiling water bath for 25 min. The mixture was allowed to cool on water for 5 min. The resulting pink stained TBA-RS was determined spectrophotometrically at 535 nm. The organic acid did not produce color when tested without the addition of the supernatant, demonstrating the absence of a direct reaction with thiobarbituric acid. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as standard, being subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS were calculated as nmol TBA-RS/mg protein.

Catalase assay

CAT activity was assayed by the method of Aebi (1984) using a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001). Cerebral tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. This method is based on the disappearance of H₂O₂ 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 0.1-0.3 mg protein/mL. One unit is defined as one μ mol of

hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity is reported as units per mg protein.

Superoxide dismutase assay

The assay of SOD activity was carried out as described by Marklund (1985). Cerebral tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 50 mM tris buffer, pH 8.2, containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). This method is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on O_2^- . The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be then indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm, using a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001). A calibration curve was performed with purified SOD as standard, in order to calculate the activity of SOD present in the samples. Results were reported as units of SOD/mg protein.

Glutathione peroxidase assay

GPx activity was measured according to the method described by Wendel (1981) using *tert*-butyl-hydroperoxide as substrate. Cerebral tissue was homogenized in 100 mM potassium phosphate buffer containing 1 mM EDTA, pH 7.7. NADPH disappearance was monitored at 340 nm using a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001). The medium contained 2 mM glutathione, 0.15 U/mL glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM *tert*-butyl-hydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GPx unit is defined as one

μmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is represented as units per mg protein.

Protein determination

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

Statistical analysis

Statistical analysis were performed by the one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test for multiple comparison when the F value was significant. Linear regression analysis was also performed to verify dose-dependent effects. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Initially, we evaluated the *in vitro* effect of PGA on non-enzymatic antioxidant defenses in rat cerebral cortex and cerebellum. This was achieved by measuring TRAP and TAR, which evaluate non-enzymatic antioxidants quantity and reactivity, respectively, present in the samples. Figure 1 shows that TRAP was significantly reduced by the presence of PGA at the higher concentrations, as compared to controls, in a dose-dependent manner, both in cerebral cortex [$F(3,20)=15.911$; $p<0.001$, $n=6$] [$\beta=-0.79$; $p<0.001$] and cerebellum

[F(3,20)=23.185; $p < 0.001$, $n=6$] [beta=-0.73; $p < 0.001$]. In addition, TAR measurement was markedly reduced at all concentrations tested, also in a dose-dependent way, when cerebral cortex [F(3,20)=53.596; $p < 0.001$, $n=6$] [beta=-0.86; $p < 0.001$] and cerebellum [F(3,20)=37.196; $p < 0.001$, $n=6$] [beta=-0.87; $p < 0.001$] were exposed to PGA (Figure 2). These results indicate that PGA diminishes the antioxidant capacity of both cerebral cortex and cerebellum homogenates, by means of reducing non-enzymatic antioxidants content (TRAP) and also its reactivity (TAR).

Next, we investigated chemiluminescence and TBA-RS as lipid peroxidation parameters. PGA caused no effect on chemiluminescence, as can be seen in Figure 3, in cerebral cortex [F(3,12)=2.144; $p > 0.05$, $n=4$] and cerebellum [F(3,12)=0.582; $p > 0.05$, $n=4$] homogenates. Figure 4 shows that PGA also did not alter TBA-RS levels in cerebral cortex [F(3,12)=3.492, $p > 0.05$, $n=4$] and cerebellum [F(3,12)=0.204, $p > 0.05$, $n=4$]. These findings suggest that lipid peroxidation is not affected by the presence of PGA neither in cerebral cortex nor in cerebellum homogenates.

Finally, the activities of the antioxidant enzymes CAT, SOD and GPx were assayed in the presence of PGA (Table 1). This organic acid caused no effect on the activity of CAT in cerebral cortex [F(3,16)=1.028; $p > 0.05$, $n=5$], as well as in cerebellum [F(3,16)=3.831; $p > 0.05$, $n=5$]. Likewise, the activity of SOD was not altered by PGA in homogenates of cerebral cortex [F(3,20)=2.791; $p > 0.05$, $n=6$] and cerebellum [F(3,20)=1.213; $p > 0.05$, $n=6$]. The activity of GPx was also not affected by PGA both in cerebral cortex [F(3,12)=3.471; $p > 0.05$, $n=4$] and

cerebellum [$F(3,12)=0.189$; $p>0.05$, $n=4$]. These results indicate that PGA may not affect directly the activities of enzymatic antioxidant defenses.

Discussion

The clinical presentation of the human conditions associated with high tissue levels of PGA vary from severe neurological deterioration to no symptoms at all. In spite of having only one gene identified for GS, there seems to be a wide genetic heterogeneity in GSD. It was postulated that missense mutations would account for the phenotype in most patients with severe GSD (Ristoff and Larsson, 1998). Different forms by which the mutations affect the three-dimensional GS structure may also account for the phenotype diversity observed. *In vitro* studies allowed the rough classification of such mutations according to the mode of impairment. Most of the mutations known in GSD affect the K_m and/or the V_{max} value for glycine, with decreased substrate affinity and maximal velocity. One mutation has been shown to decrease the stability of the enzyme. This indicates that different mutations can affect the catalytic capacity of GS by decreasing substrate affinity, maximal velocity or enzyme stability (Njalsson et al., 2000). Many mutations are thought to affect ligand binding or catalysis while others probably affect dimerization or disrupt folding (Polekhina et al., 1999). The mild form of the disease was postulated to be due to a mutation that primarily affected the stability of the enzyme, whereas the severe form was postulated to be due to mutations affecting the catalytic properties of the enzyme (Spielberg et al., 1978).

In spite of the phenotype heterogeneity, it is known that patients affected by GSD and GCSD usually have progressive neurological dysfunction, characterized by mental retardation, ataxia, spasticity, seizures and others, but the underlying mechanisms of brain damage remain unclear.

Since GSH is an endogenous non-enzymatic antioxidant, it is presumed that deficiency of GSH may lead to accumulation of free radicals and peroxides, causing oxidative damage to various tissues including the brain. It has been postulated that patients with GSD may have increased sensitivity to oxidative stress since they present reduced glutathione levels in the brain, probably leading to increased concentrations of free radicals and peroxides in this tissue (Ristoff et al., 2001; Larsson and Anderson, 2001). This mechanism is postulated to explain the neurological symptoms in patients with GSD and the autopsy findings with selective damage to the central nervous system. However, a recent long-term clinical outcome carried out in patients with GSD revealed that both GS activities and GSH levels were similar in patients with or without neurological symptoms. No obvious relation was found among GS activities, GSH levels and clinical symptoms or outcome (Ristoff et al., 2001). Dahl et al. (1997) also found no correlation between the level of enzymatic activity and presence of neurological symptoms. On the other hand, individuals with 5-oxoprolinase deficiency, another inborn disorder of the γ -glutamyl cycle, also have high tissue concentrations of PGA like in GSD and GCSD and may show neurological symptoms, but in contrast do not present reduced glutathione levels (Larsson and Anderson, 2001). Interestingly, GSD has been observed in patients without 5-oxoprolinuria, whose phenotype is only compensated hemolytic anemia without neurological

manifestations (Beutler et al., 1986). Altogether these findings suggest that PGA by itself could have, at least in part, some role in the brain damage observed in the patients.

PGA clearly has some neurotoxic actions, but the mechanisms underlying its toxicity are not well understood. Although being a weak neurotoxin when compared to kainate or other excitotoxic amino acids (Rieke et al., 1989), it is presumed that PGA toxicity may account for the reported neuropathology and progressive signs of organic brain disease in patients with high tissue levels of PGA attributed to heritable errors in the γ -glutamyl cycle (Rieke et al., 1984). It is postulated that the mechanism by which PGA expresses its toxicity may be in part similar to the actions of other excitatory amino acids (excitotoxic hypothesis), since it binds to glutamate receptors and inhibits glutamate uptake (Bennet et al., 1973; Rieke et al., 1989; Barone and Spignoli, 1990). An alternative mechanism might be its direct action as an inhibitor of Na^+, K^+ -ATPase in membrane of both neurons and glial cells (Escobedo and Cravioto, 1973; Rieke et al., 1984). Another mechanism could be the impairment in brain energy production caused by PGA, shown by the reduction of CO_2 production, ATP levels and lipid synthesis, and also by the reduction of complex I + III and complex IV activities in the respiratory chain, probably indicating that exposure to PGA results in true energy deprivation (Silva et al., 2001).

Otherwise, cerebral lesions of patients affected by GSD are similar to those seen in mercury intoxication, which were already associated with increased levels of free radicals (Marstein et al., 1981). Additionally, it is known that excitotoxicity and inhibition of Na^+, K^+ -ATPase, both actions provoked by PGA, were also

previously related to free radicals (Lees, 1993). Altogether, these evidences lead us to investigate, in the present work, the possible role of oxidative stress in PGA neurotoxicity and, indirectly, in the neurological damage occurring in inborn errors of the γ -glutamyl cycle. To accomplish that, the *in vitro* effect of PGA was studied on some oxidative stress parameters.

Firstly, to access non-enzymatic antioxidant defenses, the effect of PGA on TRAP and TAR was studied. It should be stressed that TRAP measures the content of non-enzymatic antioxidant defenses, while TAR reflects the capacity of a given tissue to modulate the damage associated with an increased production of free radicals (Lissi et al., 1995). We demonstrated in the present work that PGA significantly reduced both TRAP and TAR in cerebral cortex and cerebellum of 14-day-old rats. These results show that PGA may reduce both non-enzymatic antioxidant quantity and reactivity, indicating that PGA may cause an impairment of non-enzymatic antioxidant defenses.

We also evaluated chemiluminescence and TBA-RS. Both are indexes of lipid peroxidation, the former measuring the light emitted by peroxidizing lipids resulting from an increase in reactive oxygen and nitrogen species production (Halliwell and Gutteridge, 2001), while the latter reflecting the amount of malondialdehyde produced in lipid breakdown, which is caused by lipid peroxidation (Esterbauer and Cheeseman, 1990). In the present study, it was found that chemiluminescence and TBA-RS were not altered by the presence of PGA in the incubation medium. These findings suggest that lipid peroxidation is not affected by PGA neither in cerebral cortex nor in cerebellum homogenates.

Finally, enzymatic antioxidant defenses were studied by determining the activities of the enzymes CAT, SOD and GPx. CAT dismutates hydrogen peroxide; SOD catalyses the dismutation of the superoxide radical; and GPx catalyses the reduction of hydrogen peroxide and other hydroperoxides with reduced glutathione (Marklund et al., 1984). None of them had their activities altered by PGA added to incubation medium at the moment of measurements without previous incubation. These results indicate that PGA may not affect directly the antioxidant enzyme activities. In spite of accessing in the present study only the direct effect of the organic acid on enzyme activities *in vitro*, our findings were in line with previous work performed in patient fibroblasts where it was found a normal content of the enzymatic scavengers SOD, CAT and GPx (Marklund et al., 1984). In other words, there seemed to be no compensatory increase of alternative cellular scavenger systems in GSH-deficient cells *in vitro*. However, it is important to point out that the lack of evident enzyme induction does not necessarily indicate a lack of oxidative stress as a result of GSH deficiency. Besides, only some cell types and tissues react with enzyme induction upon oxidative stress (Marklund et al., 1984).

Our results clearly indicate that PGA may cause an impairment of non-enzymatic antioxidant defenses in rat brain, as shown by the significant reduction observed in TRAP and TAR measurements, demonstrating another possible mechanism to explain PGA neurotoxicity. This could suggest the involvement of oxidative stress in the neuropathology of inherited disorders of the γ -glutamyl cycle, in which PGA accumulation is the biochemical hallmark. It is possible that, *in vivo*, the deficiency of GSH associated with accumulation of PGA could act

synergistically, enhancing free radical production and decreasing non-enzymatic antioxidant defenses, thus leading to oxidative stress.

Even though the concentrations of PGA used in our assays are similar to those observed in the patients affected by GSD and GCSD (1-5 mM) (Eldjarn et al., 1972; Eldjarn et al., 1973; Meister, 1974; Jain et al., 1994), it is difficult to extrapolate our findings to the human condition. However, if these effects also occur in the brain of patients affected by GSD and GCSD it is possible that they may contribute, at least in part, to the neurological dysfunction characteristic of those diseases. Whether impairment of brain energy production, inhibition of Na^+, K^+ -ATPase, excitotoxicity or oxidative stress is the major underlying mechanism responsible for PGA neurotoxicity in the brain damage of these patients remains to be elucidated. Further studies, however, appear to be worthwhile in order to better characterize the role of oxidative stress in PGA neurotoxicity.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Excellence Nuclei Program (PRONEX), Brazilian National Research Council (CNPq) and PROPESQ/UFRGS.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121-126.
- Barone, D., Spignoli, G., 1990. Investigations on the binding properties of the nootropic agent pyroglutamic acid. *Drugs Exp. Clin. Res.* 16, 85-99.

- Bennet Jr., J.P., Logan, W.J., Snyder, S.H., 1973. Amino acids as central nervous transmitters: the influence of ions, amino acid analogues, and ontogeny on transport systems for L-glutamic and aspartic acids and glycine into central nervous synaptosomes. *J. Neurochem.* 2, 1533-1550.
- Beutler, E., Gelbart, T., Pegelow, C., 1986. Erythrocyte glutathione synthetase deficiency leads not only to glutathione but also to glutathione-S-transferase deficiency. *J. Clin. Invest.* 77, 38-41.
- Dahl, N., Pigg, M., Ristoff, E., Gali, R., Carlsson, B., Mannervik, B., Larsson, A., Board, P., 1997. Missense mutations in the human glutathione synthetase gene result in severe metabolic acidosis, 5-oxoprolinuria, hemolytic anemia and neurological dysfunction. *Human Molecular Genetics* 6, 1147-1152.
- Dusticier, N., Kerkerian, L., Errami, M., Nieoullon, A., 1985. Effects of pyroglutamic acid on corticostriatal glutamatergic transmission. *Neuropharmacology* 24, 903-908.
- Eldjarn, L., Jellum, E., Stokke, O., 1972. Pyroglutamic aciduria: studies on the enzymic block and on the metabolic origin of pyroglutamic acid. *Clin. Chim. Acta* 48, 461-476.
- Eldjarn, L., Jellum, E., Stokke, O., 1973. Pyroglutamic aciduria: rate of formation and degradation of pyroglutamate. *Clin. Chim. Acta* 49, 311-323.
- Escobedo, M., Cravioto, J., 1973. Studies on the malabsorption syndromes. Inhibition of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ of small intestine microvilli by pyrrolidone carboxylic acid. *Clin. Chim. Acta* 49, 147-151.

- Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enzymol.* 186, 407-421.
- Evelson, P., Travacio, M., Repetto, M., Escobar, J., Llesuy, S.F., Lissi, E., 2001. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 261-266.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2001. Detection of free radicals and others reactive species: trapping and fingerprinting. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, pp. 351-425.
- Jain, A., Buist, N.R.M., Kennaway, N.G., Powell, B.R., Auld, P.A., Martensson, J., 1994. Effect of ascorbate or N-acetylcysteine treatment in a patient with hereditary glutathione synthetase deficiency. *J. Pediatr.* 124, 229-233.
- Jellum, E., Kluge, T., Borrensen, H.C., Stokke, O., Eldjarn, I., 1970. Pyroglutamic aciduria: a new inborn error of metabolism. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 26, 327-335.
- Larsson, A., Wachtmeister, L., von Wendt, L., Andersson, R., Hagenfeldt, L., Herrin, K.M., 1985. Ophthalmological, psychometric and therapeutic investigation in two sisters with hereditary glutathione synthetase deficiency (5-oxoprolinuria). *Neuropediatrics* 16, 131-136.
- Larsson, A., Anderson, M.E., 2001. Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the γ -glutamyl cycle. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, pp. 2205-2216.

- Lees, G.J., 1993. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 54, 287-322.
- Lissi, E., Caceres, T., Videla, L.A., 1986. Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. *Free Rad. Biol. Med.* 2, 63-69.
- Lissi, E., Pascual, C., Del Castillo, M.D., 1992. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comm.* 17, 299-311.
- Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., Del Castillo, M.D., 1995. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Rad. Biol. Med.* 18, 153-158.
- Llesuy, S.F., Milei, J., Molina, H., Boveris, A., Milei, S., 1985. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 71, 241-249.
- 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., Midander, J., Westman, G., 1984. CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in glutathione-deficient human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 798, 302-305.
- Marklund, S.L., 1985. Pyrogallol autoxidation. In: *Handbook for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Boca Raton, pp. 243-247.

- Marstein, S., Jellum, E., Nesbakken, R., Perry, T.L., 1981. Biochemical investigations of biopsied brain tissue and autopsied organs from a patient with pyroglutamic acidemia (5-oxoprolinemia). *Clin. Chim. Acta* 111, 219-228.
- Meister, A., 1974. The γ -glutamyl cycle. Diseases associated with specific deficiencies. *Annals Inter. Med.* 81, 247-253.
- Meister, A., 1991. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmac. Ther.* 51, 155-194.
- Njalsson, R., Carlsson, K., Olin, B., Carlsson, B., Whitbread, L., Polekhina, G., Parker, M.W., Norgren, S., Mannervik, B., Board, P.G., Larsson, A., 2000. Kinetic properties of missense mutations in patients with glutathione synthetase deficiency. *Biochem. J.* 349, 275-279.
- Polekhina, G., Board, P.G., Gali, R.R., Rossjohn, J., Parker, M.W., 1999. Molecular basis of glutathione synthetase deficiency and a rare gene permutation event. *Embo J.* 18, 3204-3213.
- Rieke, G.K., Scarfe, A.D., Hunter, J.F., 1984. L-pyroglutamate: an alternate neurotoxin for a rodent model of Huntington's Disease. *Brain Res. Bull.* 13, 443-456.
- Rieke, G.K., Smith, J., Idusuyi, O.B., Semanya, J., Howard, R., 1989. Chronic intrastriatal L-pyroglutamate: neuropathology and neuron sparing like Huntington's Disease. *Exp. Neurol.* 104, 147-154.
- Ristoff, E., Larsson, A., 1998. Patients with genetic defects in the γ -glutamyl cycle. *Chemico-Biological Interactions* 111-112, 113-121.

- Ristoff, E., Augustson, C., Geissler, J., de Rijk, T., Carlsson, K., Luo, J., Andersson, K., Weening, R.S., van Zwieten, S., Larsson, A., Ross, D., 2000. A missense mutation in the heavy subunit of γ -glutamylcysteine synthetase gene causes hemolytic anemia. *Blood* 95, 2193-2197.
- Ristoff, E., Mayatepek, E., Larsson, A., 2001. Long-term clinical outcome in patients with glutathione synthetase deficiency. *J. of Pediatr.* 139, 79-84.
- Rothstein, J.D., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Kunet, R.C.U., 1993. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6591-6595.
- Silva, A.R., Silva, C.G., Ruschel, C., Helegda, C., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., 2001. L-Pyroglutamic acid inhibits energy production and lipid synthesis in cerebral cortex of young rats *in vitro*, *Neurochem. Res.* 26, 1277-1283.
- Spielberg, S.P., Garrik, M.D., Corash, L.M., Butler, J.D., Tietze, F., Gorgers, L.V., Shulman, J.D., 1978. Biochemical heterogeneity in glutathione synthetase deficiency. *J. Clin. Invest.* 61, 1417-1423.
- Skullerud, K., Marstein, S., Schrader, H., Brundet, P.J., Jellum, E., 1980. The cerebral lesions in a patient with generalized glutathione deficiency and pyroglutamic aciduria (5-oxoprolinuria). *Acta Neuropathol.* 52, 235-238.
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* 77, 325-332.

Table 1. *In vitro* effect of L-pyroglutamic acid (PGA) on catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities in cerebral cortex and cerebellum from 14-day-old rats.

Enzyme activities (units/mg protein)	Cerebral cortex			
	L-pyroglutamic acid concentration (mM)			
	0	0.5	1.0	3.0
CAT (n=5)	11.2 ± 0.7	11.3 ± 1.1	11.1 ± 0.5	10.4 ± 1.0
SOD (n=6)	5.8 ± 0.8	5.6 ± 0.7	5.5 ± 0.8	6.6 ± 0.8
GPx (n=4)	18.9 ± 1.1	18.5 ± 1.0	19.7 ± 1.8	17.0 ± 0.9

	Cerebellum			
	L-pyroglutamic acid concentration (mM)			
	0	0.5	1.0	3.0
CAT (n=5)	19.1 ± 1.7	19.6 ± 1.6	17.9 ± 1.9	16.4 ± 1.2
SOD (n=6)	11.9 ± 1.1	11.1 ± 1.3	10.7 ± 1.8	12.1 ± 1.6
GPx (n=4)	29.4 ± 1.9	28.6 ± 2.7	28.6 ± 1.5	29.2 ± 1.7

Results are mean ± SD for four to six independent experiments performed in duplicate, reported as units/mg protein. One CAT unit is defined as one μmol of hydrogen peroxide consumed per minute. One SOD unit is defined as 80% inhibition of pyrogallol autoxidation. One GPx unit is defined as one μmol of NADPH consumed per minute. No significant differences from controls were detected by ANOVA.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. *In vitro* effect of L-pyroglutamic acid (PGA) on total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) in cerebral cortex (1A) and cerebellum (1B) from 14-day-old rats. Results are mean \pm SD for six independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.001$ compared to control (Tukey multiple range test).

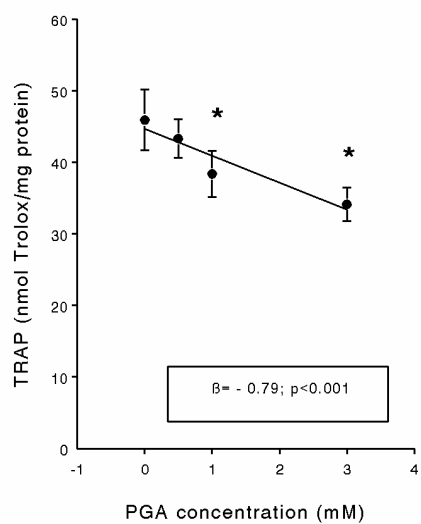
Figure 2. *In vitro* effect of L-pyroglutamic acid (PGA) on total antioxidant reactivity (TAR) in cerebral cortex (2A) and cerebellum (2B) from 14-day-old rats. Results are mean \pm SD for six independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.001$ compared to control (Tukey multiple range test).

Figure 3. *In vitro* effect of L-pyroglutamic acid (PGA) chemiluminescence in cerebral cortex (3A) and cerebellum (3B) from 14-day-old rats. Results are mean \pm SD for four independent experiments performed in duplicate. No significant differences from controls were detected by ANOVA.

Figure 4. *In vitro* effect of L-pyroglutamic acid (PGA) on thiobarbituric-acid reactive substances (TBA-RS) in cerebral cortex (4A) and cerebellum (4B) from 14-day-old rats. Results are mean \pm SD for four independent experiments performed in duplicate. No significant differences from controls were detected by ANOVA.

Figure 1

A



B

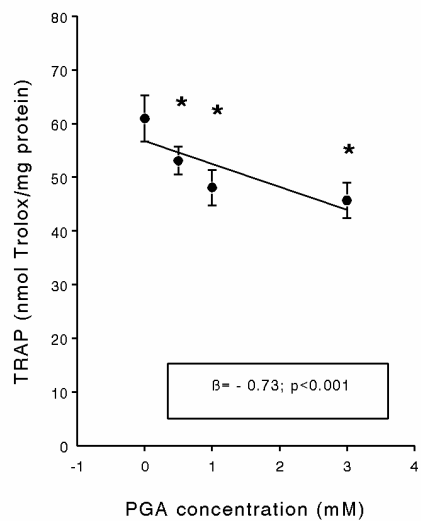
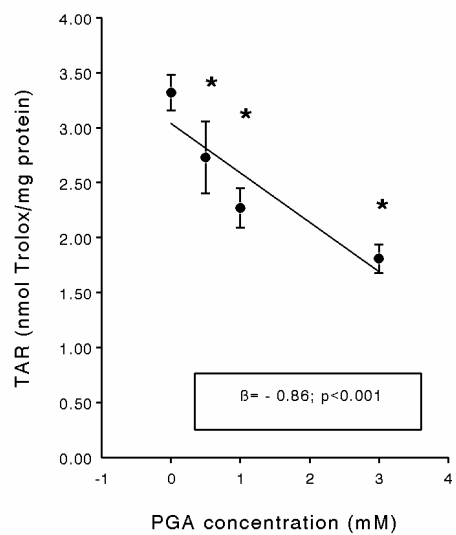


Figure 2

A



B

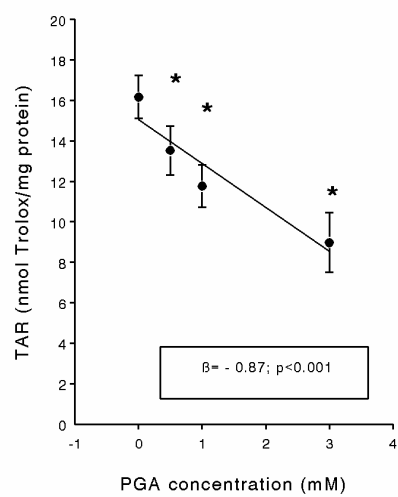


Figure 3

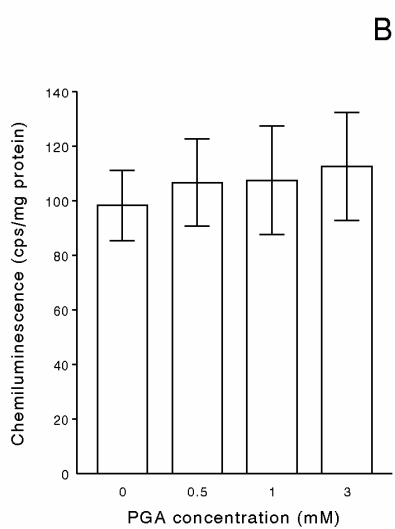
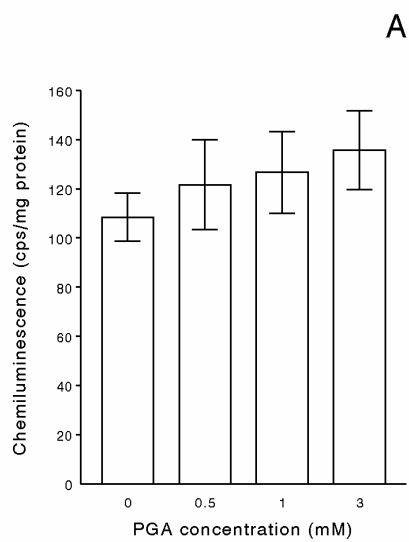
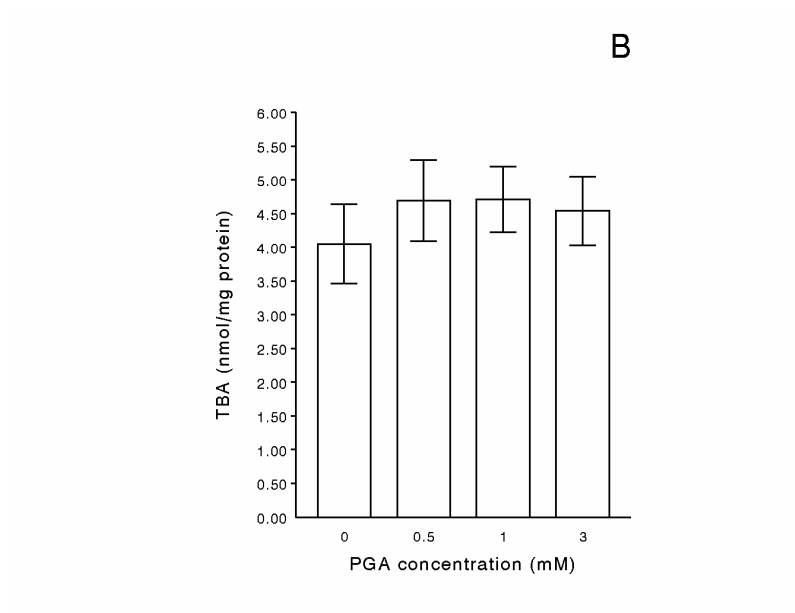
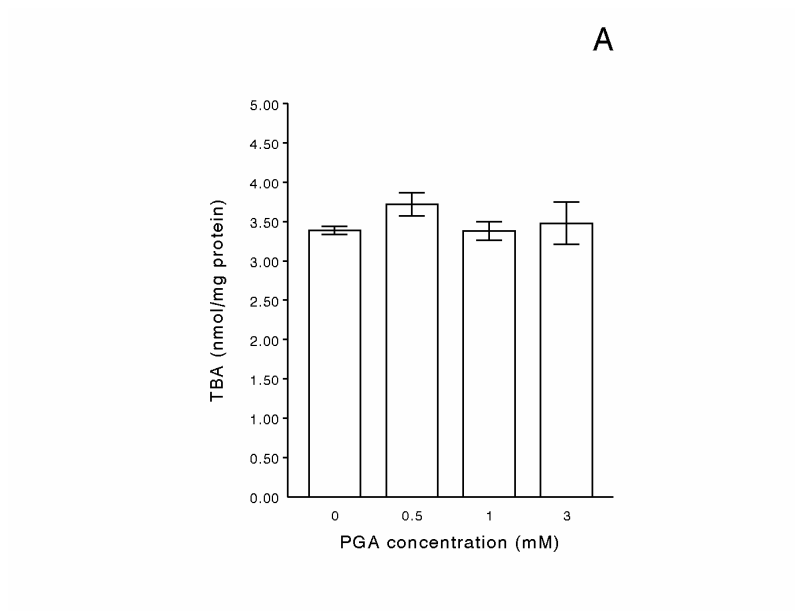


Figure 4



4. DISCUSSÃO

Apesar de apresentarem ampla heterogeneidade genética e fenotípica, os pacientes afetados pelas deficiências de GS e de GCS, nas quais há um acúmulo de PGA, geralmente manifestam um quadro de disfunção neurológica progressiva caracterizada por retardo mental, ataxia e convulsões, entre outros sintomas. No entanto, os mecanismos responsáveis pelo dano cerebral permanecem ainda não esclarecidos.

Sabe-se que esses pacientes apresentam, além de altos níveis de PGA, níveis diminuídos de GSH no cérebro. Em condições normais, além de atuar como *scavenger* de radicais livres a GSH participa de diversas outras funções fundamentais como as reações redox, a formação de desoxirribonucleotídeos, o metabolismo de xenobióticos, a biossíntese de leucotrienos e o transporte intracelular de aminoácidos (LARSSON E ANDERSON, 2001). Considerando sua atividade como importante antioxidante não-enzimático endógeno, presume-se que sua deficiência possa promover o acúmulo de ERO, causando dano oxidativo a vários tecidos, inclusive ao cérebro, que é particularmente suscetível ao estresse oxidativo devido ao seu alto consumo de oxigênio, alto conteúdo lipídico e modesta defesa antioxidante (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). Dessa forma, tem sido postulado que pacientes com deficiência de GS poderiam ter uma

sensibilidade aumentada ao estresse oxidativo, uma vez que os mesmos apresentam níveis diminuídos de glutathiona no cérebro, provavelmente levando a concentrações aumentadas de radicais livres e peróxidos nesse tecido (RISTOFF *et al.*, 2001; LARSSON E ANDERSON, 2001). O dano cerebral pode também ser devido à apoptose excessiva causada pela deficiência de GSH. Presume-se que baixos níveis de GSH sejam capazes de desencadear apoptose devido à alteração do potencial redox intracelular (HALL, 1999). Uma diminuição nos níveis de GSH, e conseqüentemente na capacidade de resistir ao estresse oxidativo, pode aumentar os níveis de moléculas excitotóxicas. Ambos podem iniciar eventos que culminam com morte celular por apoptose em certas regiões cerebrais (BAINS E SHAW, 1997).

A hipótese da deficiência de GSH como responsável pelos danos cerebrais nesses pacientes é a mais adotada até então para explicar a ocorrência de manifestações neurológicas severas e alterações neuropatológicas características das deficiências de GS e de GCS. No entanto, estudos recentes realizados em paciente afetados por essas desordens revelaram não haver correlação entre a atividade GS, os níveis de GSH e a presença ou ausência de sintomas neurológicos (DAHL *et al.*, 1997; RISTOFF *et al.*, 2001), não tendo sido avaliados os níveis sanguíneos de PGA em nenhum dos estudos. É interessante observar que indivíduos com deficiência de 5-oxoprolinase, que constitui outro erro inato do ciclo γ -glutamil, não apresentam níveis diminuídos de GSH mas apenas altas concentrações teciduais de PGA, e ainda assim podem apresentar sintomas neurológicos severos (LARSSON E ANDERSON, 2001). Por outro lado, existem

alguns pacientes com deficiência de GS que não apresentam 5-oxoprolinúria, sendo uma anemia hemolítica sua única manifestação clínica, com ausência de sintomas neurológicos, ou seja, tais pacientes não têm níveis de PGA aumentados mas no entanto tem níveis reduzidos de GSH, e ainda assim não apresentam disfunção neurológica (LARSSON E ANDERSON, 2001). Com base nessas evidências, pode-se postular que talvez os níveis reduzidos de GSH isoladamente não sejam os únicos determinantes do aparecimento da neurodegeneração. Considerando que o PGA tem ações nitidamente neurotóxicas, é possível que o PGA por si só tenha, ao menos em parte, algum papel no dano cerebral observado nesses pacientes. No entanto, os mecanismos responsáveis pela sua toxicidade não foram ainda bem esclarecidos.

Apesar de ser uma neurotoxina fraca quando comparado ao ácido caínico ou outros aminoácidos excitotóxicos (RIEKE *et al.*, 1989), presume-se que a toxicidade do PGA possa contribuir para a neuropatologia de doenças nas quais o mesmo está aumentado, como ocorre em alguns erros inatos do ciclo γ -glutamil (RIEKE *et al.*, 1984). Postula-se que o mecanismo pelo qual o PGA expressa sua toxicidade possa ser em parte similar às ações de outros aminoácidos excitatórios (hipótese excitotóxica), visto que o PGA se liga a receptores glutamatérgicos e inibe a captação do mesmo (BENNET *et al.*, 1973; RIEKE *et al.*, 1984; BARONE E SPIGNOLI, 1990). O PGA atuaria então como uma excitotoxina, termo usado para designar compostos que agem como agonistas de receptores glutamatérgicos no cérebro ou que promovem um aumento da concentração extracelular de glutamato, o que pode provocar morte neuronal (OLNEY, 1990). Cabe salientar

que o mecanismo de excitotoxicidade por si só já foi relacionado a radicais livres, os quais estimulam a liberação de aminoácidos excitatórios excitotóxicos (PELLEGRINI-GIAMPIETRO *et al.*, 1990; LEES, 1993), sendo por isso possível que a excitotoxicidade do PGA seja mediada pela produção de radicais livres. Um mecanismo alternativo ao da excitotoxicidade poderia ser a ação direta do PGA como inibidor da Na^+, K^+ -ATPase tanto em neurônios quanto em células gliais (ESCOBETO E CRAVIOTO, 1973; RIEKE *et al.*, 1984). A Na^+, K^+ -ATPase é uma enzima de fundamental importância para o cérebro, visto que apresenta a função de manter e restaurar o gradiente iônico de Na^+ e K^+ através das membranas das células nervosas, sendo importante para manter o volume celular, a excitabilidade da membrana e a terminação da ação de vários neurotransmissores via mecanismo de recaptação (STAHL, 1984; LEES, 1991). É importante ressaltar que os radicais livres podem causar uma inibição irreversível da Na^+, K^+ -ATPase (HEXUM E FRIED, 1979; KUKREJA *et al.*, 1990), podendo o mecanismo de inibição dessa enzima pelo PGA ser também mediado por radicais livres. Outro mecanismo para explicar a neurotoxicidade do PGA poderia ser a disfunção no metabolismo energético cerebral por ele promovida, visto que o mesmo reduz a produção de CO_2 , os níveis de ATP e a síntese de lipídios, além de reduzir a atividade dos complexos I + III e complexo IV da cadeia respiratória, provavelmente indicando que a exposição ao PGA resulta em uma real privação de energia (SILVA *et al.*, 2001). Cabe salientar aqui que um dano mitocondrial, como o causado pelo PGA através da inibição de complexos da cadeia respiratória, além de poder diminuir a produção de ATP, pode provocar a desorganização da cadeia respiratória, permitindo com isso que elétrons possam

escapar mais facilmente, podendo então levar à formação aumentada de radicais superóxido por haver uma redução incompleta do O_2 a H_2O (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999; MILATOVIC *et al.*, 2001; GUPTA *et al.*, 2002). Portanto, a produção desses radicais superóxido, bem como de peróxido de hidrogênio, é exacerbada por uma eficiência diminuída do transporte de elétrons devido à formação deficiente ou inibição dos complexos transportadores de elétrons (BANDY E DAVISON, 1990; CLEETER *et al.*, 1992), como a causada pelo PGA nos complexos I + III e no complexo IV da cadeia respiratória. Em muitas doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, por exemplo, tanto defeitos mitocondriais quanto dano oxidativo parecem coexistir. A formação excessiva de espécies reativas pode danificar a mitocôndria, e por outro lado uma mitocôndria danificada pode produzir mais espécies reativas, resultando em um círculo vicioso (HALLIWELL, 2001).

Todas essas evidências apontam para um possível envolvimento do estresse oxidativo na neurotoxicidade do PGA. Aliado a todas elas está o fato de que foram observadas, em pacientes com deficiência de GS, alterações neuropatológicas muito semelhantes às aquelas observadas nos casos de intoxicação por mercúrio, na qual o envolvimento de uma produção aumentada de radicais livres já foi também demonstrado (MARSTEIN *et al.*, 1981). Em conjunto, as evidências analisadas nos levaram a investigar o possível papel do estresse oxidativo nos mecanismos de neurotoxicidade do PGA e, indiretamente, no dano neurológico observado em erros inatos do ciclo γ -glutamil. Para isso, foram avaliados alguns parâmetros de estresse oxidativo na presença de PGA,

medindo-se indicativos de lipoperoxidação, e defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas de córtex cerebral e cerebelo de ratos de 14 dias de vida.

Para acessar as defesas antioxidantes não-enzimáticas, estudou-se o efeito *in vitro* do PGA sobre o TRAP e o TAR. O TRAP é uma medida do conteúdo de defesas antioxidantes não-enzimáticas, sendo por isso um parâmetro quantitativo. Já o TAR, por sua vez, reflete a capacidade de um certo tecido modular o dano associado a uma produção aumentada de radicais livres, sendo então uma medida qualitativa que representa a reatividade antioxidante do tecido em estudo (LISSI *et al.*, 1995). Foi possível observar no presente trabalho uma redução significativa e de forma dose-dependente tanto do TRAP quanto do TAR em córtex cerebral e cerebelo de ratos causada pelo PGA. Assim, esses resultados mostram que o mesmo pode reduzir tanto a quantidade quanto a reatividade dos antioxidantes não-enzimáticos, indicando que o PGA pode prejudicar as defesas antioxidantes não-enzimáticas do tecido.

Também foram avaliados dois índices de lipoperoxidação, a quimiluminescência e o TBA-RS. A quimiluminescência mede a luz emitida pelos lipídios peroxidados resultantes de um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2001), enquanto o TBA-RS reflete a quantidade de malondialdeído formado na degradação de lipídios promovida pela lipoperoxidação (ESTERBAUER E CHEESEMAN, 1990). Observou-se que a quimiluminescência e o TBA-RS não foram alterados pela presença do PGA no meio de incubação. Esses resultados sugerem que, apesar de a ação

dos antioxidantes não-enzimáticos ser prejudicada, a lipoperoxidação não é afetada pelo PGA em homogeneizados de córtex cerebral ou de cerebelo. Cabe lembrar, no entanto, que nem toda ERO é capaz de iniciar a lipoperoxidação. Portanto, a hipótese de uma produção aumentada de radicais livres pelo PGA não deve ser descartada. Se o PGA estiver de fato gerando algum radical livre, é possível que o mesmo não seja um iniciador da reação em cadeia da lipoperoxidação.

Finalmente foram também determinadas as atividades das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx. A CAT dismuta o peróxido de hidrogênio; a SOD catalisa a dismutação do radical superóxido; e a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos com a glutathiona reduzida (MARKLUND *et al.*, 1984). Diferentemente dos experimentos anteriores, nos quais o homogeneizado era incubado na presença de PGA por 1 hora a 37°C antes das determinações, nessa etapa o PGA era adicionado ao homogeneizado apenas no momento da medida das atividades enzimáticas, ou seja, sem incubação prévia. Nenhuma das enzimas estudadas teve sua atividade alterada pelo PGA. Os resultados obtidos indicam que o PGA não deve estar afetando diretamente a atividade das enzimas antioxidantes. Apesar de acessar nesse trabalho apenas o efeito direto do ácido orgânico sobre as atividades enzimáticas *in vitro*, os resultados estão de acordo com um trabalho prévio realizado em fibroblastos de pacientes, no qual foi encontrado um conteúdo normal dos *scavengers* enzimáticos SOD, CAT e GPx (MARKLUND *et al.*, 1984).

Os resultados obtidos indicam que o PGA pode prejudicar as defesas antioxidantes não-enzimáticas em cérebro de ratos, visto que foram observadas diminuições significativas e dose-dependentes tanto nas medidas de TRAP quanto de TAR, demonstrando mais um possível mecanismo para explicar a neurotoxicidade do PGA. Com isso pode-se sugerir o envolvimento do estresse oxidativo na neuropatologia das desordens hereditárias do ciclo γ -glutamil, nas quais o acúmulo de PGA é a principal característica bioquímica. *In vivo*, é possível que haja um sinergismo entre o acúmulo de PGA e a deficiência de GSH, aumentando a produção de radicais livres e diminuindo as defesas antioxidantes não-enzimáticas, levando assim ao estresse oxidativo.

As concentrações de PGA utilizadas nesse trabalho eram similares às observadas no plasma e líquido cefalorraquidiano dos pacientes afetados pelas deficiências de GS e de GCS (1-5 mM) (ELDJARN et al., 1972; ELDJARN et al., 1973; MEISTER, 1974; JAIN et al., 1994). No entanto, é muito difícil extrapolar nossos achados para a condição humana. Porém, se esses efeitos também ocorrerem no cérebro dos pacientes afetados é possível que possam contribuir, ao menos em parte, para a disfunção neurológica observada nessas doenças. Não foi esclarecido ainda qual o principal mecanismo responsável pela neurotoxicidade do PGA no dano cerebral desses pacientes, podendo estar envolvidos o dano à produção energética cerebral, a inibição da Na^+, K^+ -ATPase, a excitotoxicidade, o estresse oxidativo ou uma combinação de quaisquer desses fatores. Estudos futuros, portanto, parecem válidos a fim de melhor caracterizar o papel do estresse oxidativo na neurotoxicidade do PGA.

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi possível observar que o PGA reduziu significativamente e de forma dose-dependente, *in vitro*, o TRAP e o TAR tanto em homogeneizados de córtex cerebral quanto de cerebelo de ratos de 14 dias de vida.

Ainda, o PGA não alterou *in vitro* as medidas de quimiluminescência e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em nenhuma das estruturas estudadas.

Por fim, as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) também não foram alteradas *in vitro* pela presença do PGA em homogeneizados de córtex cerebral ou cerebelo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSSON, T.; BRANDT, U.; MARKLUND, S.L.; SJOQVIST, P.O. Vascular bound recombinant extracellular superoxide dismutase type C protects against the detrimental effects of superoxide radicals on endothelium-dependent arterial relaxation. **Circ. Res.** 70: 264-271, 1992.
- ANDERSON, M.E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chemico-Biological Interactions** 111-112: 1-14, 1998.
- BAINS, J.S.; SHAW, C.A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal cell death. **Brain Res. Rev.** 25 (3): 335-358, 1997.
- BANDY, B.; DAVISON, A.J. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and ageing? **Free Rad. Biol. Med.** 8: 523-539, 1990.
- BARONE, D.; SPIGNOLI, G. Investigations on the binding properties of the nootropic agent pyroglutamic acid. **Drugs Exp. Clin. Res.** 16: 85-99, 1990.
- BENNET JR., J.P.; LOGAN, W.J.; SNYDER, S.H. Amino acids as central nervous transmitters: the influence of ions, amino acid analogues, and ontogeny on transport systems for L-glutamic and aspartic acids and glycine into central nervous synaptosomes. **J. Neurochem.** 2: 1533-1550, 1973.
- BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, v.65, p. 1865-1874, 1999.
- BONDY, S.C.; LE BEL, C.P. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Free Rad. Biol. Med.** 14: 633-642, 1993.
- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina (Buenos Aires)**, 58: 350-356, 1998.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem. J.** 134: 707-716, 1973.

- BOXER, L.A.; OLIVER, J.M.; SPIELBERG, S.P.; ALLEN, J.M.; SCHULMAN, J.D. Protection of granulocytes by vitamin E in glutathione synthetase deficiency. **New Engl. J. Med.** 301: 901-905, 1979.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.** 59: 527-605, 1979.
- CLEETER, M.W.J.; COOPER, J.M.; SCHAPIRA, A.H.V. Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. **J. Neurochem.** 58: 786-789, 1992.
- COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann. Intern. Med.** 111: 918-931, 1989.
- DAHL, N.; PIGG, M.; RISTOFF, E.; GALI, R.; CARLSSON, B.; MANNERVIK, B.; LARSSON, A.; BOARD, P. Missense mutations in the human glutathione synthetase gene result in severe metabolic acidosis, 5-oxoprolinuria, hemolytic anemia and neurological dysfunction. **Human Molecular Genetics** 6: 1147-1152, 1997.
- DELANTY, N.; DICHTER, M. A. Oxidative injury in the nervous system. **Acta Neurol. Scand.** 98: 145-153, 1998.
- DELWING, D.; BAVARESCO, C.S.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T.S. Proline induces oxidative stress in cerebral cortex of rats. **Int. J. Dev. Neurosci.** 21: 105-110, 2003.
- DUSTICIER, N.; KERKERIAN, L.; ERRAMI, M.; NIEOULLON, A. Effects of pyroglutamic acid on corticostriatal glutamatergic transmission. **Neuropharmacology** 24: 903-908, 1985.
- ELDJARN, L.; JELLUM, E.; STOKKE, O. Pyroglutamic aciduria: studies on the enzymic block and on the metabolic origin of pyroglutamic acid. **Clin. Chim. Acta** 48: 461-476, 1972.
- ELDJARN, L.; JELLUM, E.; STOKKE, O. Pyroglutamic aciduria: rate of formation and degradation of pyroglutamate. **Clin. Chim. Acta** 49: 311-323, 1973.
- ERASMUS, E.; MIENIE, L.J.; DE VRIES, W.N.; DE WET, W.J.; CARLSSON, B.; LARSSON, A. Prenatal analysis in two suspected cases of glutathione synthetase deficiency. **J. Inherit. Metab. Dis.** 16: 837-843, 1993.
- ESCOBEDO, M.; CRAVIOTO, J., 1973. Studies on the malabsorption syndromes. Inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase of small intestine microvilli by pyrrolidone carboxylic acid. **Clin. Chim. Acta** 49: 147-151, 1973.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Meth. Enzymol.** 186: 407-421, 1990.

- FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G.W. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition** 18: 872-879, 2002.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.** 43: 61-68, 1997.
- FRIDOVICH, I.; MCCORD, J.M. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte superoxide dismutase (hemocuprein). **J. Biol. Chem.** 244: 6049-6055, 1969.
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Ann. Rev. Biochem.** 44: 147-157, 1975.
- FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Ann. Rev. Biochem.** 64: 97-112, 1995.
- GUPTA, R.C.; MILATOVIC, D.; DETTBARN, W.D. Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus: protection by antioxidants. **Neurotoxicology** 22: 271-282, 2002.
- HALL, A.G. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. **Eur. J. Clin. Invest.** 29 (3): 238-245, 1999.
- HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? **Lancet** 344: 721-724, 1994.
- HALLIWELL, B. Free radicals, protein and DNA: oxidative damage versus redox regulation. **Biochem. Soc. Trans.** 24: 1023-1027, 1996.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3^a ed. New York: Oxford University Press Inc., 1999.
- HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs & Aging** 18(9): 685-716, 2001.
- HEXUM, T. D.; FRIED, R. Effects of superoxide radicals on transport (Na⁺,K⁺) adenosine triphosphatase and protection by superoxide dismutase. **Neurochem. Res.** 4: 73-82, 1979.
- HOFFMANN, G.; ARAMAKI, S.; BLUM-HOFFMANN, E.; NYHAN, W.L.; SWEETMAN, L. Quantitative analysis for organic acids in biological samples: batch isolation followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. **Clin. Chem.** 35: 587-595, 1989.
- JAIN, A.; BUIST, N.R.M.; KENNAWAY, N.G.; POWELL, B.R.; AULD, P.A.; MARTENSSON, J. Effect of ascorbate or N-acetylcysteine treatment in a patient with hereditary glutathione synthetase deficiency. **J. Pediatr.** 124: 229-233, 1994.

- JELLUM, E.; KLUGE, T.; BORRENSEN, H.C.; STOKKE, O.; ELDJARN, I. Pyroglutamic aciduria: a new inborn error of metabolism. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** 26: 327-335, 1970.
- KIENZLE-HAGEN, M.E.; PEDERZOLLI, C.D.; SGARAVATTI, A.M.; BRIDI, R.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WYSE, A.T.S.; DUTRA-FILHO, C.S. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. **Biochim. Biophys. Acta** 1586: 344-352, 2002.
- KUKREJA, R.C.; WEAVER, A.B.; HESS, M.L. Sarcolemmal Na⁺,K⁺-ATPase: inactivation by neutrophil-derived free radicals and oxidants. **Int. J. Physiol.** 259: H133-H136, 1990.
- LARSSON, A.; WACHTMEISTER, L.; VON WENDT, L.; ANDERSSON, R.; HAGENFELDT, L.; HERRIN, K.M. Ophthalmological, psychometric and therapeutic investigation in two sisters with hereditary glutathione synthetase deficiency (5-oxoprolinuria). **Neuropediatrics** 16: 131-136, 1985.
- LARSSON, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the γ -glutamyl cycle. In: SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D. (Editores). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill, 2001. Cap. 96, p. 2205-2216.
- LEES, G.J. Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. **Brain Res. Rev.** 16: 283-300, 1991.
- LEES, G.J. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. **Neuroscience** 54: 287-322, 1993.
- LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Rad. Biol. Med.** 18: 153-158, 1995.
- LONNROT, K.; METSA-KETELA, T.; MOLNAR, G.; AHONEN, J.P.; LATVALA, M.; PELTOLA, J.; PIETILA, T.; ALHO, H. The effect of ascorbate and ubiquinone supplementation on plasma and CSF total antioxidant capacity. **Free Rad. Biol. Med.** 21: 211-217, 1996.
- MANNING, N.J.; DAVIES, N.P.; OLPIN, S.E.; CARPENTER, K.H.; SMITH, M.F.; POLLITT, R.J.; DUNCAN, S.L.; LARSSON, A.; CARLSSON, B. Prenatal diagnosis of glutathione synthetase deficiency. **Prenat. Diagn.** 14: 475-478, 1994.
- MARKLUND, S.L.; MIDANDER, J.; WESTMAN, G. CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in glutathione-deficient human fibroblasts. **Biochim. Biophys. Acta** 798: 302-305, 1984.

- MARKS, D.B.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. **Basic Medical Biochemistry: a clinical approach**. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. P. 143.
- MARSTEIN, S.; JELLUM, E.; NESBAKKEN, R.; PERRY, T.L. Biochemical investigations of biopsied brain tissue and autopsied organs from a patient with pyroglutamic acidemia (5-oxoprolinemia). **Clin. Chim. Acta** 111: 219-228, 1981.
- MAXWELL, S.R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs** 49: 345-361, 1995.
- MEISTER, A. The γ -glutamyl cycle. Diseases associated with specific deficiencies. **Annals Inter. Med.** 81: 247-253, 1974.
- MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. **Pharmac. Ther.** 51: 155-194, 1991.
- MILATOVIC, D.; ZIVIN, M.; GUPTA, R.C.; DETTBARN, W.D. Alterations in cytochrome c oxidase activity and energy metabolites in response to kainic acid-induced status epilepticus. **Brain Res.** 31: 67-78, 2001.
- MOYANO, D.; VILASECA, M.A.; PINEDA, M.; CAMPISTOL, J.; VERNET, A.; PÓO, P.; ARTUCH, R.; SIERRA, C. Tocoferol in inborn errors of intermediary metabolism. **Clin. Chim. Acta**, 263: 147-155, 1997.
- NIKI, E. Antioxidant defenses in eukariotic cells: an overview. In: POLI, G.; ALBANO, E.; DIANZANI, M.U. (Editores). **Free Radicals: From Basic Science to Medicine**. Basel: Birkäuser Verlag, 1993. P. 365-373.
- NJALSSON, R.; CARLSSON, K.; OLIN, B.; CARLSSON, B.; WHITBREAD, L.; POLEKHINA, G.; PARKER, M.W.; NORNGREN, S.; MANNERVIK, B.; BOARD, P.G.; LARSSON, A. Kinetic properties of missense mutations in patients with glutathione synthetase deficiency. **Biochem. J.** 349: 275-279, 2000.
- OLNEY, J.W. Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. **A. Rev. Pharmac. Toxicol.** 30: 47-71, 1990.
- PACKER, L. Prevention of free radical damage in the brain: protection by α -lipoic acid. In: PACKER, L.; HIRAMATSU, H.; YOSHIKAWA, T. (Editores). **Free Radicals in Brain Physiology and Disorders**. San Diego: Academic Press, Inc., 1996. Cap. 2, p. 19-34.
- PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E.; CHERICI, G.; ALESIANI, M.; CARLA, V.; MORONI, F. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. **J. Neurosci.** 10: 1035-1041, 1990.

- POLEKHINA, G.; BOARD, P.G.; GALI, R.R.; ROSSJOHN, J.; PARKER, M.W. Molecular basis of glutathione synthetase deficiency and a rare gene permutation event. **Embo J.** 18: 3204-3213, 1999.
- RESNICK, A.Z.; PACKER, L. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: POLI, G.; ALBANO, E.; DIANZANI, M.U. (Editores). **Free Radicals: from Basic Science to Medicine**. Basel: Birkäuser Verlag, 1993. P. 425-437.
- RIEKE, G.K.; SCARFE, A.D.; HUNTER, J.F. L-pyroglutamate: an alternate neurotoxin for a rodent model of Huntington's Disease. **Brain Res. Bull.** 13: 443-456, 1984.
- RIEKE, G.K.; SMITH, J.; IDUSUYI, O.B.; SEMENYA, J.; HOWARD, R. Chronic intraatrial L-pyroglutamate: neuropathology and neuron sparing like Huntington's Disease. **Exp. Neurol.** 104: 147-154, 1989.
- RISTOFF, E.; LARSSON, A. Patients with genetic defects in the γ -glutamyl cycle. **Chemico-Biological Interactions** 111-112: 113-121, 1998.
- RISTOFF, E.; AUGUSTSON, C.; GEISLER, J.; DE RIJK, T.; CARLSSON, K.; LUO, J.; ANDERSSON, K.; WEENING, R.S.; VAN ZWIETEN, S.; LARSSON, A.; ROSS, D. A missense mutation in the heavy subunit of γ -glutamylcysteine synthetase gene causes hemolytic anemia. **Blood** 95: 2193-2197, 2000.
- RISTOFF, E.; MAYATEPEK, E.; LARSSON, A. Long-term clinical outcome in patients with glutathione synthetase deficiency. **J. Pediatr.** 139: 79-84, 2001.
- RISTOFF, E. **Inborn Errors in the Metabolism of Glutathione**. Tese de doutorado apresentada ao Department of Clinical Science, Division of Pediatrics, Karolinska Institutet, Huddinge University Hospital, Stockholm, Sweden, 2002.
- ROBERTSON, P.L.; BUCHANAN, D.N.; MUENZER, J. 5-oxoprolinuria in an adolescent with chronic metabolic acidosis, mental retardation and psychosis. **J. Pediatr.** 118 (1): 92-95, 1991.
- ROTHSTEIN, J.D.; JIN, L.; DYKES-HOBERG, M.; KUNET, R.C.U. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 6591-6595, 1993.
- SEVANIAN, A.; KIM, E. Pholipase A2 dependent release of fatty acids from peroxidized membranes **J. Free Rad. Biol. Med.** 1(4): 263-271, 1985.
- SILVA, A.R.; SILVA, C.G.; RUSCHEL, C.; HELEGDA, C.; WYSE, A.T.S.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. L-Pyroglutamic acid inhibits energy production and lipid synthesis in cerebral cortex of young rats *in vitro*. **Neurochem. Res.** 26: 1277-1283, 2001.

- SKULLERUD, K.; MARSTEIN, S.; SCHRADER, H.; BRUNDELET, P.J.; JELLUM, E. The cerebral lesions in a patient with generalized glutathione deficiency and pyroglutamic aciduria (5-oxoprolinuria). **Acta Neuropathol.** 52: 235-238, 1980.
- SOKOL, R.J. Vitamin E and neurologic function in man. **Free Rad. Biol. Med.** 6: 189-207, 1989.
- SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. **Mayo Clin. Proc.** 63: 381-389, 1988.
- SPIELBERG, S.P.; GARRIK, M.D.; CORASH, L.M.; BUTLER, J.D.; TIETZE, F.; GORGERS, L.V.; SHULMAN, J.D. Biochemical heterogeneity in glutathione synthetase deficiency. **J. Clin. Invest.** 61: 1417-1423, 1978.
- STAHL, W. L. Na⁺,K⁺-ATPase: function, structure and conformations. **Ann. Neurol.** 16: S121-S127, 1984.
- STEINBRECHER, U.P.; ZHANG, H.; LONGHEED, M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. **Free Rad. Biol. Med.** 9 (2):155-168, 1990.
- WARD, R.J.; PETERS, T.J. Free Radicals. In: MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K. (Editores). **Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects.** New York: Churchill Livingstone, 1995. P. 765-777.
- WENDEL, A . Glutathione peroxidase. **Meth. Enzymol.** 77: 325-332, 1981.
- WYSE, A.T.S.; BAVARESCO, C.S.; KIENZLE-HAGEN, M.E.; DELWING, D.; WANNMACHER, C.M.D.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M. *In vitro* stimulation of oxidative stress in cerebral cortex of rats by the guanidino compounds accumulating in hyperargininemia. **Brain Res.** 923: 50-57, 2001.