

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**EFEITO *IN VITRO* DO ÁCIDO γ -HIDROXIBUTÍRICO SOBRE
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS**

Dissertação

Ângela Malysz Sgaravatti

Porto Alegre, 2004

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

ÂNGELA MALYSZ SGARAVATTI

EFEITO *IN VITRO* DO ÁCIDO γ -HIDROXIBUTÍRICO SOBRE
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Carlos Severo Dutra Filho

PORTO ALEGRE

2004

“Ainda que eu falasse a língua dos
homens e dos anjos e não tivesse amor,
seria como o metal que soa,
ou como o sino que tine.

Ainda que eu tivesse o dom de profecia,
e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência,
e ainda que tivesse toda a fé,
de maneira tal que transportasse os montes,
e não tivesse amor, nada seria”.

I Cor 13, 1-2.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlos Severo Dutra Filho, pela orientação e amizade.

Aos demais professores do Grupo de Erros Inatos do Metabolismo, Moacir Wajner, Clóvis Wannmacher e Ângela T. S. Wyse, pelas críticas construtivas e sugestões.

Aos amigos dos laboratórios 34, 36 e 38, pela colaboração constante.

Aos bolsistas de iniciação científica, pela dedicação e interesse.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Aos meus pais, Sandro (*in memoriam*) e Elza, por tudo.

Aos meus irmãos, especialmente ao Flávio, pela confiança e incentivo.

Ao Fabiano, pelo companheirismo, admiração e amor.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 DEFICIÊNCIA DA SEMIALDEÍDO SUCCÍNICO DESIDROGENASE (OU ACIDÚRIA γ -HIDROXIBUTÍRICA)	12
1.1.1 Histórico	14
1.1.2 Características Clínicas	14
1.1.3 Características Bioquímicas	15
1.1.4 Características Genéticas	17
1.1.5 Diagnóstico	17
1.1.6 Tratamento	18
1.2 EFEITOS DO ÁCIDO γ -HIDROXIBUTÍRICO	19
1.3 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO	20
1.3.1 Aspectos Gerais	20
1.3.2 Defesas Antioxidantes	24
1.3.2.1 Defesas Antioxidantes Enzimáticas	24
1.3.2.1.1 Superóxido dismutase	24
1.3.2.1.2 Catalase	25
1.3.2.1.3 Glutathione peroxidase	26
1.3.2.2 Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas	27
1.3.2.2.1 Glutathione	27
1.3.2.2.2 α -Tocoferol	27
1.3.2.2.3 Ácido ascórbico	28

1.3.3 Estresse Oxidativo	28
1.3.4 Estresse Oxidativo e Sistema Nervoso Central	29
2 OBJETIVOS	31
3 ARTIGO CIENTÍFICO	32
4 DISCUSSÃO	58
5 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo do GABA e a sua relação com a deficiência da semialdeído succínico desidrogenase 13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características clínicas dos pacientes com deficiência da semialdeído succínico desidrogenase	15
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT Catalase

ERN Espécies reativas de nitrogênio

ERO Espécies reativas de oxigênio

Fe⁺² Íon ferroso

Fe⁺³ Íon férrico

GABA Ácido γ -aminobutírico

GPX Glutaciona peroxidase

GR Glutaciona redutase

GSH Glutaciona reduzida

GSSG Glutaciona oxidada

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

LOOH Hidroperóxido orgânico

NADP⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NO[•] Óxido nítrico

O₂^{•-} Radical superóxido

OH[•] Radical hidroxila

ONOO⁻ Peroxinitrito

ONOOH Ácido peroxinitroso

SOD Superóxido dismutase

TAR Reatividade antioxidante total

TBA-RS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRAP Potencial antioxidante total

RESUMO

A deficiência da semialdeído succínico desidrogenase, ou acidúria γ -hidroxibutírica, é um erro inato do metabolismo do ácido γ -aminobutírico. Bioquimicamente, é caracterizada pelo acúmulo de elevadas concentrações do ácido γ -hidroxibutírico nos tecidos, líquido cefalorraquidiano, sangue e urina dos pacientes. As manifestações clínicas descritas nesses pacientes são muito variadas e inespecíficas, mas observa-se que os principais sintomas e sinais clínicos são neurológicos. Entretanto, os mecanismos responsáveis pela disfunção neurológica desses pacientes são pouco conhecidos. Neste trabalho, o efeito *in vitro* do ácido γ -hidroxibutírico foi investigado sobre a quimiluminescência, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), o potencial antioxidante total (TRAP), a reatividade antioxidante total (TAR) e as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens com o intuito de esclarecer, ao menos em parte, a etiopatogenia dos sintomas neurológicos característicos dessa doença. O ácido γ -hidroxibutírico aumentou significativamente a quimiluminescência e os níveis de TBA-RS, enquanto que o TRAP e o TAR foram marcadamente reduzidos. No entanto, as atividades das enzimas antioxidantes não foram alteradas pelo ácido γ -hidroxibutírico. Esses resultados indicam que o ácido γ -hidroxibutírico estimula a lipoperoxidação e reduz as defesas antioxidantes não-enzimáticas, sugerindo a participação do estresse oxidativo na neuropatologia da deficiência da semialdeído succínico desidrogenase. Porém, esses achados devem ser confirmados em pacientes afetados por essa doença.

Palavras-chave: deficiência da semialdeído succínico desidrogenase; ácido γ -hidroxibutírico; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency, or γ -hydroxybutyric aciduria, is a neurometabolic inherited disorder caused by an enzyme deficiency in γ -aminobutyric acid degradation. It is biochemically characterized by increased concentrations of γ -hydroxybutyric acid in cerebrospinal fluid, blood, tissues and urine of affected patients. Clinical manifestations are variable, ranging from mild retardation of mental, motor, and language development to more severe neurological defects associated with hypotonia, ataxia and seizures. However, the underlying mechanisms of the neuropathology of SSADH deficiency are practically unknown. In the present study, the *in vitro* effect of 0.1-1.0 mM γ -hydroxybutyric acid was studied on chemiluminescence, thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), total antioxidant reactivity (TAR), and the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) in cerebral cortex homogenates of young rats. γ -Hydroxybutyric acid significantly increased chemiluminescence and TBA-RS levels while TRAP and TAR measurements were markedly diminished. However, the activities of the antioxidant enzymes were not altered by γ -hydroxybutyric acid. The results indicate that γ -hydroxybutyric acid induces lipid peroxidation and reduces the non-enzymatic antioxidants defenses, strongly suggesting the participation of oxidative stress in the neuropathology of SSADH deficiency. If these effects also occur in humans, it is possible that they might contribute to the brain damage of SSADH-deficient patients

Keywords: succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, γ -hydroxybutyric acid, oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFICIÊNCIA DA SEMIALDEÍDO SUCCÍNICO DESIDROGENASE (OU ACIDÚRIA γ -HIDROXIBUTÍRICA)

A deficiência da semialdeído succínico desidrogenase, ou acidúria γ -hidroxibutírica, é um erro inato do metabolismo do ácido γ -aminobutírico (GABA). As enzimas GABA transaminase e semialdeído succínico desidrogenase convertem o GABA em ácido succínico, que pode ser utilizado como fonte de energia através de sua entrada no ciclo de Krebs. Entretanto, quando a atividade da enzima semialdeído succínico desidrogenase está deficiente, o semialdeído succínico se acumula e é reduzido a ácido γ -hidroxibutírico (Figura 1). Conseqüentemente, ocorre um aumento das concentrações do ácido γ -hidroxibutírico nos tecidos e fluidos fisiológicos dos pacientes afetados por essa doença (GIBSON & JAKOBS, 2001).

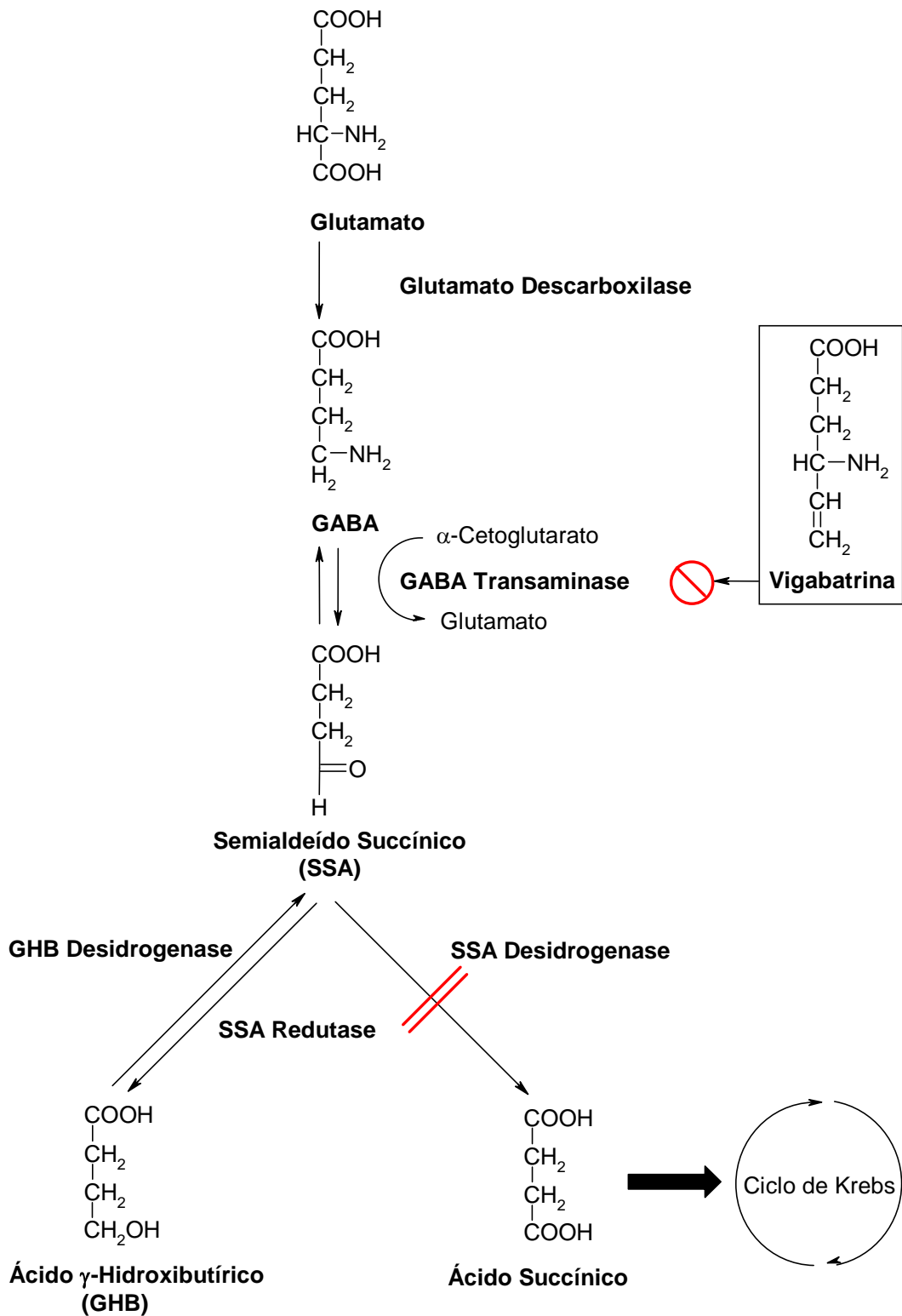


Figura 1. Metabolismo do GABA e a sua relação com a deficiência da semialdeído succínico desidrogenase. Fonte: GROPMAN, 2003.

1.1.1 Histórico

JAKOBS *et al.* (1981) identificaram o primeiro caso da deficiência da semialdeído succínico desidrogenase em um menino turco que apresentava retardo no desenvolvimento motor e mental, ataxia não-progressiva e hipotonia muscular. A presença de elevadas concentrações do ácido γ -hidroxibutírico nos fluidos fisiológicos (líquido cefalorraquidiano, sangue e urina) e do semialdeído succínico na urina desse paciente fez com que esses pesquisadores propusessem a deficiência da semialdeído succínico desidrogenase como causa desses achados visto que, em condições fisiológicas, o ácido γ -hidroxibutírico é encontrado em pequenas quantidades e o semialdeído succínico não é detectado como metabólito endógeno do sistema nervoso central. Algum tempo depois, a hipótese de JAKOBS *et al.* (1981) foi confirmada com a comprovação da deficiência da semialdeído succínico desidrogenase em lisados de linfócitos (GIBSON *et al.*, 1984).

1.1.2 Características Clínicas

As características clínicas descritas em pacientes com a deficiência da semialdeído succínico desidrogenase são muito variadas e inespecíficas (Tabela 1), porém observa-se que os principais sintomas e sinais clínicos são neurológicos.

Além dos sintomas clínicos heterogêneos, os pacientes afetados pela deficiência da semialdeído succínico desidrogenase não desenvolvem alterações metabólicas, tais como acidose, hiperamonemia, hipoglicemia e retardo no crescimento, comuns em outros erros inatos do metabolismo (JAKOBS *et al.*, 1993; GIBSON *et al.* 1997).

Tabela 1. Principais características clínicas dos pacientes com deficiência da semialdeído succínico desidrogenase.

Característica clínica	Freqüência (n=60)
Retardo	
• mental	50 (83%)
• fala	49 (82%)
• motor	45 (75%)
Hipotonia	48 (80%)
Convulsões	38 (63%)
Problemas de comportamento	30 (50%)
Ataxia	29 (48%)
Hiporreflexia	27 (45%)
Problemas oculares	15 (25%)
Sintomas gastrointestinais	13 (22%)
Problemas neonatais	08 (13%)

Adaptada de PEARL *et al.*, 2003.

1.1.3 Características Bioquímicas

A principal alteração bioquímica encontrada nos pacientes com a deficiência da semialdeído succínico desidrogenase é o acúmulo do ácido γ -hidroxibutírico nos fluidos fisiológicos. A concentração do ácido γ -hidroxibutírico pode atingir 0,6 mM no líquido cefalorraquidiano, 1,0 mM no sangue e 2,5 mM na urina desses pacientes (JAKOBS *et al.*, 1981; GIBSON *et al.*, 1984; GIBSON & JAKOBS, 2001).

Além do ácido γ -hidroxibutírico, o GABA e o ácido homovanílico foram detectados em elevadas concentrações no líquido cefalorraquidiano de alguns pacientes (GIBSON & JAKOBS, 2001; ISHIGURO *et al.*, 2001; GIBSON *et al.*, 2003; PEARL *et al.*, 2003).

A excreção urinária dos ácidos 3,4-diidroxibutírico, 3-ceto-4-hidroxibutírico e glicólico indica que o excesso do ácido γ -hidroxibutírico é metabolizado por β -oxidação. A conversão do ácido glicólico em glicina pode explicar, em parte, o aumento dos níveis de glicina nos fluidos fisiológicos dos pacientes (GIBSON & JAKOBS, 2001).

A α -oxidação do ácido γ -hidroxibutírico é representada pela eliminação dos ácidos 2,4-diidroxibutírico e 3-hidroxipropiônico na urina dos pacientes. O ácido 3-hidroxipropiônico e a acidúria dicarboxílica, que ocorre secundariamente à inibição da β -oxidação mitocondrial, podem interferir no diagnóstico da deficiência da semialdeído succínico desidrogenase, porque refletem desordens do metabolismo do propionil-CoA e acil-CoA, respectivamente (GIBSON & JAKOBS, 2001).

A presença dos ácidos treo- e eritro-4,5-diidroxihexanóico (e suas lactonas correspondentes) na urina de alguns pacientes é extremamente relevante, porque esses compostos não foram identificados em outros erros inatos do metabolismo. Portanto, esses ácidos orgânicos podem ser considerados marcadores específicos para a deficiência da semialdeído succínico desidrogenase, além do ácido γ -hidroxibutírico. BROWN *et al.* (1987) sugeriram que o ácido 4,5-diidroxihexanóico e seus derivados são produtos da condensação do semialdeído succínico com intermediários de dois carbonos do metabolismo do piruvato.

1.1.4 Características Genéticas

A deficiência da semialdeído succínico desidrogenase apresenta um padrão de herança autossômico recessivo. Diversas mutações no gen da semialdeído succínico desidrogenase, cuja localização é o cromossomo 6p22, foram identificadas, indicando que esse polimorfismo é suficientemente importante para permitir uma variação da atividade enzimática entre os indivíduos afetados (BLASI *et al.*, 2002; AKABOSHI *et al.*, 2003).

1.1.5 Diagnóstico

Devido à heterogeneidade dos sintomas, o diagnóstico da deficiência da semialdeído succínico desidrogenase não pode ser feito baseado nas manifestações clínicas. Entretanto, a identificação e a quantificação do ácido γ -hidroxibutírico através de métodos cromatográficos nos fluidos fisiológicos, principalmente na urina, é de crucial importância para a confirmação diagnóstica, além de avaliar a deficiência da semialdeído succínico desidrogenase em leucócitos e/ou fibroblastos dos pacientes (GIBSON & JAKOBS, 2001).

O diagnóstico pré-natal é realizado pela determinação da atividade da semialdeído succínico desidrogenase em punção de cordão umbilical (coleta de sangue fetal) ou amniocentese juntamente com a análise do ácido γ -hidroxibutírico no líquido amniótico (THORBURN *et al.*, 1993) e de mutações em cultura de leucócitos ou linfoblastos (HOGEMA *et al.*, 2001).

1.1.6 Tratamento

As estratégias terapêuticas têm tido como finalidade diminuir a formação do ácido γ -hidroxibutírico, uma vez que o aumento dos níveis desse ácido está associado às manifestações clínicas encontradas nos pacientes com a deficiência da semialdeído succínico desidrogenase.

Embora não exista um tratamento eficaz para a deficiência da semialdeído succínico desidrogenase, o anticonvulsivante vigabatrina, inibidor irreversível da GABA transaminase, é amplamente utilizado (GIBSON & JAKOBS, 2001). Teoricamente, a vigabatrina deveria suprimir a formação do semialdeído succínico e do ácido γ -hidroxibutírico com concomitante aumento das concentrações cerebrais do GABA. Porém, a redução dos níveis do ácido γ -hidroxibutírico no líquido cefalorraquidiano foi insignificante nos pacientes tratados com vigabatrina, favorecendo a idéia de que ocorre um suprimento periférico do ácido γ -hidroxibutírico (HOWELLS *et al.*, 1992). Além disso, os resultados clínicos variaram de melhoras no comportamento e ataxia em alguns casos, até exacerbação, ou mesmo indução, de crises convulsivas em outros (GIBSON & JAKOBS, 2001; GROPMAN, 2003).

Outros anticonvulsivantes usados no tratamento da deficiência da semialdeído succínico desidrogenase são a carbamazepina e a lamotrigina. No entanto, os agentes terapêuticos promissores são os antagonistas dos receptores do ácido γ -hidroxibutírico (NCS-382) ou GABAérgicos (CPG 35348) (GIBSON & JAKOBS, 2001; GROPMAN, 2003; PEARL *et al.*, 2003).

Manifestações clínicas como, por exemplo, agressividade, alucinações, ansiedade e hipercinesia têm sido tratadas com medicações específicas para esses sintomas (PEARL *et al.*, 2003).

1.2 EFEITOS DO ÁCIDO γ -HIDROXIBUTÍRICO

O ácido γ -hidroxibutírico é um constituinte endógeno do sistema nervoso central sintetizado a partir do GABA através das enzimas GABA transaminase e semialdeído succínico redutase em neurônios GABAérgicos ou naqueles neurônios capazes de formar GABA (MAITRE, 1997).

A sua localização sinaptossomal, a presença de mecanismos próprios de liberação e recaptação, e a distribuição cerebral heterogênea dos receptores do ácido γ -hidroxibutírico de baixa e alta afinidade sugerem que o ácido γ -hidroxibutírico atue como um neurotransmissor ou neuromodulador (MAITRE, 1997).

A administração exógena do ácido γ -hidroxibutírico causa alterações eletrofisiológicas, bioquímicas e comportamentais de forma dose-dependente. Estudos eletrofisiológicos sobre o efeito farmacológico de baixas e altas doses do ácido γ -hidroxibutírico indicaram a existência de uma resposta mediada por receptores do ácido γ -hidroxibutírico e GABAérgicos, respectivamente. Essa ação GABAérgica poderia ser induzida pelo controle do ácido γ -hidroxibutírico sobre a liberação do GABA ou através da síntese do GABA a partir do ácido γ -hidroxibutírico (MAITRE, 1997).

Achados bioquímicos mostram que o ácido γ -hidroxibutírico influencia a atividade de diferentes neurotransmissores. Os efeitos desse ácido sobre a atividade do sistema dopaminérgico estão entre os mais estudados. A administração de baixas doses de ácido γ -hidroxibutírico hiperpolariza as estruturas dopaminérgicas, causando uma redução na liberação de dopamina, enquanto que doses maiores estimulam a síntese e o acúmulo tecidual de dopamina com subsequente aumento de sua liberação. Mesmo assim, é importante salientar que o ácido γ -hidroxibutírico

não inibe as enzimas responsáveis pela degradação da dopamina - monoamino oxidase e catecol-o-metil-transferase (MAMELAK, 1989; CASH, 1994; MAITRE, 1997).

Aliado a isso, experimentos *in vitro* demonstraram que 1,0 mM do ácido γ -hidroxibutírico não só aumentou a liberação de dopamina após uma inibição inicial (HECHLER *et al.*, 1991), mas também comprometeu o metabolismo energético mitocondrial através da diminuição da produção de CO₂ e, como consequência, inibiu a síntese lipídica (SILVA *et al.*, 1999).

Além disso, a administração do ácido γ -hidroxibutírico em animais provocou modificações comportamentais e eletroencefalográficas semelhantes às aquelas comumente observadas nas convulsões de ausência. De fato, o ácido γ -hidroxibutírico apresenta propriedades sedativas e, por isso, foi usado como adjuvante em anestésias gerais. Atualmente, o ácido γ -hidroxibutírico tem sido utilizado no tratamento de pacientes narcolépticos, catalépticos e viciados em drogas, apesar de também ser usado como droga de abuso (MAMELAK, 1989; CASH, 1994; MAITRE, 1997; WONG *et al.*, 2004).

1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

1.3.1 Aspectos Gerais

O termo espécies reativas do oxigênio (ERO) refere-se aos radicais livres dele derivados e aos outros estados do oxigênio, como o oxigênio “singlet” e o peróxido de hidrogênio. Um radical livre é definido como qualquer espécie química capaz de ter existência independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Os radicais livres são formados em um cenário de oxirredução ou

se, no rompimento de uma ligação covalente, cada um dos átomos envolvidos ficar com um elétron (fissão homolítica) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, pelo menos 95% do oxigênio molecular sofre redução tetravalente, resultando na geração de água. Durante esse processo, os radicais superóxido, hidroperoxila e hidroxila, e o peróxido de hidrogênio são produzidos em pequenas quantidades na mitocôndria (cadeia respiratória) (COHEN, 1989). Outras fontes celulares de ERO são o retículo endoplasmático, a membrana nuclear, a membrana plasmática (lipoxigenase, prostaglandina sintetase) e algumas substâncias encontradas no citosol (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Além de ser formado durante a respiração celular, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pode ser produzido em reações de auto-oxidação e por certas enzimas, como a xantina oxidase (FRIDOVICH, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Apesar de não causar, diretamente, danos ao DNA, proteínas e lipídios, a citotoxicidade do $O_2^{\bullet-}$ está relacionada a sua capacidade de gerar outras ERO. Contudo, em concentrações elevadas, o $O_2^{\bullet-}$ tem condições de mobilizar pequenas quantidades de ferro da proteína ferritina (BOLANN & ULVIK, 1990), além de atacar o sítio ativo de enzimas que contenham centros ferro-enxofre, causando a liberação do ferro e a inativação das mesmas (LIOCHEV, 1996).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser formado pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ (FRIDOVICH, 1997) ou por outras reações (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL, 2001). O H_2O_2 é pouco reativo e parece ser incapaz de oxidar o DNA, lipídios e proteínas, exceto aquelas proteínas que possuem grupos tiólicos hiper-reativos e resíduos de metionina (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; LEVINE *et al.*, 1999; BORUTAITE & BROWN, 2001). Essa baixa reatividade do H_2O_2 pode ser

vantajosa, se considerarmos que essa ERO é gerada em processos inflamatórios e está presente no ar exalado, na urina e na maioria das bebidas quentes que consumimos (café solúvel, por exemplo) (HALLIWELL *et al.*, 2000). Porém, em níveis milimolares, o H_2O_2 pode promover a liberação de íons ferro das hemeproteínas, como a mioglobina e os citocromos (PUPPO & HALLIWELL, 1988; HAREL *et al.*, 1988).

O ferro, por sua vez, pode converter o H_2O_2 em radical hidroxila (OH^\bullet) através das reações de Fenton e Haber-Weiss devido a sua habilidade de transferir um único elétron (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Por essa razão, qualquer agente redutor capaz de transformar o íon férrico (Fe^{+3}) em ferroso (Fe^{+2}), como o radical superóxido, pode ser responsável pela continuidade dessas reações.

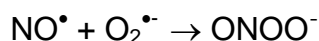
O radical OH^\bullet reage com DNA, carboidratos, proteínas e lipídios, danificando-os. Assim, se o OH^\bullet for produzido próximo ao DNA, poderão ocorrer modificações de bases nitrogenadas e resíduos de açúcar, levando à inativação ou mutação do DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL, 2001). Além disso, o OH^\bullet não só compromete a atividade biológica das proteínas ao oxidá-las (DEAN *et al.*, 1997), mas também induz a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL, 2001). Os efeitos da lipoperoxidação sobre as membranas podem ser de quatro tipos:

1. Mudanças no microambiente lipídico;
2. Formação de novos canais de membrana, alterando a sua permeabilidade;

3. Formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolipídios, inativando-os irreversivelmente;
4. Oxidação de grupos sulfidrilas nos sítios ativos de enzimas ligadas à membrana, acarretando a perda de suas propriedades funcionais.

Dependendo da intensidade desses efeitos, a lipoperoxidação pode causar desde pequenas alterações na permeabilidade das membranas afetadas até morte celular (MEERSON *et al.*, 1982; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

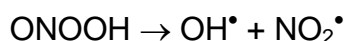
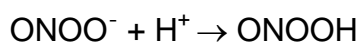
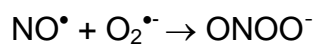
Além das ERO, as espécies reativas de nitrogênio (ERN) desempenham um papel importante na fisiologia e patologia humana (BREDT, 1999; HOBBS *et al.*, 1999). O óxido nítrico (NO[•]), por exemplo, é um radical livre pouco reativo que, em excesso, inibe a enzima mitocondrial citocromo oxidase e, conseqüentemente, aumenta a formação do O₂^{•-} (FORFIA *et al.*, 1999). O NO[•] pode reagir com o O₂^{•-}, gerando o peroxinitrito (ONOO⁻) (BECKMAN & KOPPENOL, 1996):



O ONOO⁻ é protonado em pH fisiológico e o ácido peroxinitroso (ONOOH) formado favorece a produção de agentes citotóxicos com capacidade de nitração, hidroxilação e oxidação (BECKMAN & KOPPENOL, 1996; HALLIWELL *et al.*, 1999). Por essa razão, a geração *in vivo* do ONOO⁻ contribui para a oxidação e nitração de lipídios, DNA e proteínas (BECKMAN & KOPPENOL, 1996; ISCHIROPOULOS, 1998; HALLIWELL *et al.*, 1999).

Diversos estudos sugerem que a decomposição do ONOO⁻ consiste em um mecanismo independente de metais de transição para formar o OH[•] (HALLIWELL

et al., 1999). Porém, a participação do OH^\bullet na toxicidade desse radical é pequena, visto que a sua forma protonada é, por si só, muito mais reativa (HALLIWELL, 2001).



1.3.2 Defesas Antioxidantes

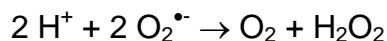
Os seres vivos dispõem de mecanismos protetores para retardar e/ou prevenir o acúmulo de espécies reativas e seus efeitos deletérios. Os sistemas de defesa podem ser enzimáticos ou não. As principais enzimas que exercem esse papel são a superóxido dismutase, a catalase e a glutaciona peroxidase. Essas enzimas evitam o acúmulo de radical hidroxila, contra o qual não existe nenhum sistema enzimático de defesa. As defesas não-enzimáticas incluem antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e hidrofílicos (glutaciona, ácido ascórbico, indóis e catecóis) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; FANG *et al.*, 2002).

1.3.2.1 Defesas Antioxidantes Enzimáticas

1.3.2.1.1 Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) catalisa a reação de dismutação do radical superóxido até peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, diminui a formação

das ERO e ERN dele derivadas, assim como qualquer dano direto por ele causado (FRIDOVICH, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

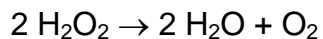


Existem duas formas de superóxido dismutase nas células eucarióticas: a manganês-SOD (Mn-SOD) e a cobre-zinco-SOD (CuZn-SOD). A importância da Mn-SOD, presente na matriz mitocondrial (FRIDOVICH, 1997; WARD & PETERS, 1995), foi demonstrada em estudos onde camundongos geneticamente modificados não a sintetizavam e morriam precocemente com danos mitocondriais severos (LI *et al.*, 1995; LEBOVITZ *et al.*, 1996; MELOV *et al.*, 1999). A CuZn-SOD está localizada no citosol, mas também pode ser encontrada nos lisossomas, núcleo celular, espaço intermembrana da mitocôndria, peroxissomas e fluido extracelular (EC-SOD) (ABRAHAMSSON *et al.*, 1992; FRIDOVICH, 1997; WARD & PETERS, 1995).

Embora a remoção do $\text{O}_2^{\bullet-}$ previna a formação de ERO e ERN, o H_2O_2 produzido pela SOD deve ser eliminado pelas enzimas catalase e glutatona peroxidase para impedi-lo de reagir com metais de transição e gerar o OH^{\bullet} (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; CADENAS & DAVIES, 2000).

1.3.2.1.2 Catalase

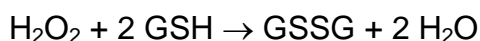
A catalase (CAT) é uma heme proteína que acelera a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (CHANCE *et al.*, 1979; WARD & PETERS, 1995).



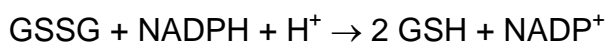
A catalase é encontrada na maioria das células humanas, principalmente nos peroxissomas (CHANCE *et al.*, 1979). Alguns órgãos como o coração, o músculo esquelético e o cérebro, contêm menor quantidade e atividade de catalase que o fígado, o que os tornam mais vulneráveis a ação das ERO e ERN (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

1.3.2.1.3 Glutathione peroxidase

A glutathione peroxidase (GPX) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (LOOH) para seus álcoois correspondentes às custas da conversão da glutathione reduzida (GSH) a dissulfeto de glutathione (GSSG) (CHANCE *et al.*, 1979; SHAN *et al.*, 1990).



A glutathione reductase (GR), que regenera a GSH a partir do GSSG, é uma flavoproteína dependente de NADPH e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses (CHANCE *et al.*, 1979; GILBERT, 1990).



A GPX e a GR estão presentes em diversos compartimentos celulares, inclusive na mitocôndria (CHANCE *et al.*, 1979; LASH *et al.*, 1998; ESPOSITO *et al.*, 2000).

1.3.2.2 Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas

1.3.2.2.1 Glutathiona

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo formado pelos resíduos de glicina, glutamato e cisteína. A capacidade redutora da GSH é determinada pela presença do grupamento tiólico (-SH) da cisteína. Na maioria das células, a GSH é encontrada em elevadas concentrações (mM) no meio intracelular e atua como transportadora e reservatório de cisteína, além de participar da detoxificação de ERO, ERN e produtos da lipoperoxidação. A GSH, ainda, é requerida para a síntese de DNA, proteínas e algumas prostaglandinas (DENEKE & FANBURG, 1989; ANDERSON, 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

1.3.2.2.2 α -Tocoferol

Os tocoferóis (α , β , γ , δ) e os tocotrienos (α , β , γ , δ) provenientes da dieta são os responsáveis pela atividade da vitamina E. A forma biologicamente ativa, o α -tocoferol, é selecionada pelo fígado, incorporada nas lipoproteínas plasmáticas e distribuída pelo organismo, enquanto que os outros tocoferóis são eliminados na bile (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL, 2001). O α -tocoferol confere proteção à membrana celular por reagir com as ERO produzidas durante a lipoperoxidação e o

radical α -tocoferil formado pode ser regenerado pelo ácido ascórbico, ubiquinol ou por mecanismos enzimáticos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

1.3.2.2.3 Ácido ascórbico

Os seres humanos são incapazes de sintetizar o ácido ascórbico (vitamina C) e devem obtê-lo a partir da dieta (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O ácido ascórbico reage diretamente com várias espécies reativas (oxigênio “singlet”, $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , LO^{\bullet} , LOO^{\bullet} , NOO^{\bullet}) e regenera o α -tocoferol a partir do radical α -tocoferil. Contudo, o ácido ascórbico pode agir como pró-oxidante na presença de metais de transição e estimular danos oxidativos às biomoléculas através da formação do OH^{\bullet} (HALLIWELL, 1999). Além disso, o ácido ascórbico está envolvido em algumas reações de hidroxilação, como aquelas necessárias para a síntese do colágeno, onde atua como cofator. Por esse motivo, a deficiência prolongada de ácido ascórbico pode levar a uma condição patológica denominada escorbuto, em que a incapacidade de sintetizar o colágeno de forma adequada reflete-se no aparecimento de edema e sangramento (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

1.3.3 Estresse Oxidativo

Os sistemas de defesa antioxidante controlam os níveis de espécies reativas, mas não as eliminam e, conseqüentemente, o dano oxidativo às biomoléculas não é completamente evitado. Deste modo, os sistemas de reparo são fundamentais para prevenir o acúmulo de biomoléculas danificadas oxidativamente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O termo estresse oxidativo refere-se a qualquer situação em que a geração de espécies reativas excede as defesas antioxidantes e a capacidade de reparo do organismo. Portanto, o estresse oxidativo pode resultar da:

1. Produção excessiva de espécies reativas;
2. Diminuição das defesas antioxidantes;
3. Liberação de metais de transição;
4. Combinação dos fatores mencionados anteriormente.

As células expostas ao estresse oxidativo podem se adaptar através de um aumento das defesas antioxidantes e/ou do sistema de reparo, tornando-se mais resistentes às injúrias subseqüentes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Além da adaptação celular, o estresse oxidativo pode ocasionar a morte da célula. O comprometimento da função mitocondrial, por exemplo, é capaz de liberar citocromo c, ativar caspases e desencadear a apoptose. Entretanto, o estresse oxidativo severo pode inativar as caspases por oxidação e inibir a apoptose. Nessa situação, provavelmente ocorreria a necrose celular, o que iria resultar na liberação de agentes tóxicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL, 2001).

1.3.4 Estresse Oxidativo e o Sistema Nervoso Central

A susceptibilidade do sistema nervoso central ao estresse oxidativo se deve a diversos fatores. Dentre esses, cinco merecem destaque. Primeiro, a grande dependência do metabolismo energético oxidativo faz com que pequenas alterações na função mitocondrial aumentem a formação de radicais superóxido. Segundo, os

íons ferro encontram-se em altas concentrações em certas áreas cerebrais e, quando liberados, são capazes de catalisar reações de produção de radicais livres. Terceiro, vários neurotransmissores, como a dopamina, são moléculas auto-oxidáveis e podem reagir com o oxigênio molecular, gerando ERO. Quarto, o cérebro apresenta um conteúdo lipídico alto em relação aos outros tecidos, principalmente quanto ao nível de ácidos graxos poliinsaturados, que são especialmente sensíveis ao ataque de radicais livres. E quinto, os baixos níveis de enzimas antioxidantes e sua localização nas células gliais fazem com que os neurônios estejam menos protegidos contra os oxidantes presentes no cérebro (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O estresse oxidativo parece estar envolvido em várias doenças ou alterações patológicas que afetam o sistema nervoso central. Entre elas, destacam-se as doenças neurodegenerativas, esclerose múltipla, convulsões, desordens acompanhadas de desmielinização, demência e síndrome de Down (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL, 2001). Ainda, diversos estudos têm demonstrado o envolvimento do estresse oxidativo em modelos animais de diferentes erros inatos do metabolismo (WYSE *et al.*, 2001; KIENZLE-HAGEN *et al.*, 2002; DELWING *et al.*, 2003).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do ácido γ -hidroxibutírico sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizados de córtex cerebral de ratos Wistar de 15 dias a fim de melhor compreender a etiopatogenia dos sintomas neurológicos dessa doença. Para tanto, o efeito *in vitro* do ácido γ -hidroxibutírico foi investigado sobre os seguintes aspectos bioquímicos do sistema nervoso central:

1. Lipoperoxidação (quimiluminescência e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico);
2. Defesas antioxidantes não-enzimáticas (potencial antioxidante total e reatividade antioxidante total);
3. Defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

***“In vitro* γ -hydroxybutyric acid induces oxidative stress
in cerebral cortex of young rats”**

Ângela M. Sgaravatti, Carolina D. Pederzolli, Cristina C. Prestes, Mirian B. Sgarbi,
Carla G. Testa, Karina Durigon, Angela T. S. Wyse, Clóvis M. D. Wannmacher,
Moacir Wajner and Carlos Severo Dutra-Filho^{CA}

Submetido à publicação na revista “Journal of Neurochemistry”.

***In vitro* [[gamma]]-hydroxybutyric acid induces oxidative stress
in cerebral cortex of young rats**

Ângela M. Sgaravatti, Carolina D. Pederzoli, Cristina C. Prestes, Mirian B. Sgarbi,
Carla G. Testa, Karina Durigon, Angela T. S. Wyse, Clóvis M. D. Wannmacher,
Moacir Wajner and Carlos Severo Dutra-Filho^{CA}

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

^{CA} Corresponding Author:

Carlos Severo Dutra-Filho

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

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

γ -Hydroxybutyric aciduria is a neurometabolic inherited disorder caused by deficiency of succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) activity. It is biochemically characterized by increased concentrations of γ -hydroxybutyric acid (GHB) in tissues, cerebrospinal fluid, blood and urine of affected patients. Clinical manifestations are psychomotor retardation, hypotonia, ataxia, speech delay, seizures and a variable degree of mental retardation. However, the underlying mechanisms of the neuropathology of γ -hydroxybutyric aciduria are practically unknown. In the present study, we investigated the *in vitro* effect of GHB on some parameters of oxidative stress in cerebral cortex of 15-day-old Wistar rats. We evaluated chemiluminescence, thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), total antioxidant reactivity (TAR) and the activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD). GHB significantly increased chemiluminescence and TBA-RS levels while TRAP and TAR measurements were markedly diminished. The activities of the antioxidant enzymes were not altered by GHB. The results indicate that GHB induces lipid peroxidation and reduces the non-enzymatic antioxidants defenses, strongly suggesting the participation of oxidative stress in the neuropathology of γ -hydroxybutyric aciduria. If these effects also occur in humans, it is possible that they might contribute to the brain damage of SSADH-deficient patients.

Keywords: γ -Hydroxybutyric aciduria; γ -hydroxybutyric acid; oxidative stress.

Abbreviations: ABAP, 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane); CAT, catalase; CSF, cerebrospinal fluid; GABA, [[gamma]]-aminobutyric acid; GHB, [[gamma]]-hydroxybutyric acid or 4-hydroxybutyric acid; GPX, glutathione peroxidase; GSH, glutathione; SOD, superoxide dismutase; SSA, succinic semialdehyde; SSADH, succinic semialdehyde dehydrogenase; TAR, total antioxidant reactivity; TBA-RS, thiobarbituric acid-reactive substances; TRAP, total radical-trapping antioxidant potential.

[[gamma]]-Hydroxybutyric aciduria is an autosomal-recessively inherited metabolic disorder caused by deficiency of succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH; EC 1.2.1.24) activity. The enzymatic defect blocks the oxidation of succinic semialdehyde (SSA) to succinic acid, resulting in conversion of SSA to [[gamma]]-hydroxybutyric acid (GHB), which accumulates in tissues, cerebrospinal fluid (CSF), blood and is excreted in high amounts in urine of affected patients (Gibson & Jakobs, 2001). In addition to GHB, CSF and serum levels of [[gamma]]-aminobutyric acid (GABA) are increased in these patients (Ishiguro *et al.*, 2001; Gibson & Jakobs, 2001; Pearl *et al.*, 2003).

Clinical manifestations of [[gamma]]-hydroxybutyric aciduria are variable including mild to severe retardation of intellectual, motor, speech, and language development. Many patients also present with hypotonia and nonprogressive ataxia, whereas others succumb to a fatal outcome, despite the fact that there is no metabolic acidosis, hyperammonemia, hypoglycemia, or other signs of clinical decompensation with vomiting and/or lethargy (Jakobs *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1997; Gibson & Jakobs, 2001). Vigabatrin, an irreversible GABA transaminase inhibitor, remains the most widely used drug in [[gamma]]-hydroxybutyric aciduria (Gibson & Jakobs, 2001). The lack of a therapeutic efficacy of this antiepileptic drug for all patients reflects heterogeneity at the genetic or enzymatic level (Gibson *et al.*, 1997). On the other hand, Howells and coworkers (1992) have suggested that vigabatrin has limited use in [[gamma]]-hydroxybutyric aciduria because of differential effects on organ specific GABA transaminases. These investigators postulated that, although vigabatrin effectively inhibits brain GABA transaminase, limited inhibition of peripheral organ transaminases could lead to resupply of GHB across the blood-brain barrier, thereby decreasing clinical efficacy of therapeutic intervention in the central

nervous system. Therefore, long-term clinical efficacy has been questioned (Gibson *et al.*, 1995).

Although neurological symptoms predominate in SSADH-deficient patients, the mechanisms underlying the neurological dysfunction are poorly known. However, there are increasing evidence correlating high GHB levels to some neurological features seen in mutant mice and in humans with SSADH deficiency (Hogema *et al.*, 2001; Gibson *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2003; Pearl *et al.*, 2003). In this context, we have previously shown that GHB decreases lipid synthesis *in vitro* in developing rat brain probably due to its inhibitory action on energy production (Silva *et al.*, 1999), indicating that GHB may disturb myelination and other important events. Furthermore, GHB administration induces behavioral responses including sedation and eventually anesthesia accompanied with electroencephalographic abnormalities similar to those seen in human petit mal epilepsy (Cash, 1994; Maitre, 1997). Similarly, individuals affected by SSADH deficiency also present absence or tonic-clonic seizures (Pearl *et al.*, 2003). On the other hand, it has been postulated that some of the effects of GHB may be exerted via its transformation to GABA, and that GABAergic besides cholinergic, dopaminergic and serotonergic systems may be involved in the neurological effects of GHB (Cash, 1994; Maitre, 1997). In this context, an increase in brain dopamine concentrations after GHB administration has been reported (Cash, 1994; Maitre, 1997; Wong *et al.*, 2003). In addition, an enhanced catecholamines turnover related to high GHB levels in SSADH-deficient mice and in various SSADH-deficient unrelated patients has been demonstrated (Gibson & Jakobs, 2001; Gupta *et al.*, 2003; Pearl *et al.*, 2003).

Therefore, considering increased dopamine levels and decreased energy metabolism are related to free radical generation, in the present study we

investigated the *in vitro* effect of GHB on some parameters of oxidative stress in cerebral cortex homogenates of young Wistar rats. We evaluated the influence of this organic acid on lipid peroxidation, by measuring chemiluminescence and thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), as well as on the brain antioxidant defenses, by determining the total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), the total antioxidant reactivity (TAR) and the activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD).

Material and Methods

Reagents

All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) except by thiobarbituric acid and 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) (ABAP), which were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and Wako Chemicals (Richmond, VA, USA), respectively. GHB was prepared on the day of the experiment in the incubation medium of each technique and the pH was adjusted when necessary.

Animals

Fifteen-day-old Wistar rats obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS were used. The animals were maintained on a 12:12 h light/dark cycle in air-conditioned constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) colony room, with free access to water and to a standard commercial chow. 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 rapidly removed. The olfactory bulb, pons and medulla were discarded and the cerebral cortex was isolated, weighed and kept chilled until homogenization. Cerebral cortex was homogenized (1:10 w/v) in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 140 mM KCl for chemiluminescence, TBA-RS, TRAP and TAR. For the antioxidant enzyme activity determinations, cerebral cortex was homogenized (1:10 w/v) in the incubation medium used for each technique. Homogenates were centrifuged at 750 g for 10 min at 4°C to remove nuclei and cell debris (Llesuy *et al.*, 1985). The pellet was discarded and the supernatant, a suspension of mixed and preserved organelles including mitochondria, was separated and immediately used for analyses.

Cerebral cortex supernatants were incubated in the absence (controls) or presence of GHB (at final concentrations ranging from 0.1 to 1.0 mM) at 37 °C for 1 hour. After incubation, aliquots were taken to measure chemiluminescence, TBA-RS, TRAP and TAR. To test the effect of GHB on the activity of the antioxidant enzymes (CAT, SOD and GPX), the organic acid was added to the cerebral cortex homogenates without previous incubation.

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. Incubation flasks contained 3.5 mL of the medium, and 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 determined according to the method described by Esterbauer & Chessemann (1990) using a Beckman Du[®]640 Spectrophotometer. Briefly, 300 μ L of cold 10% (w/v) 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% (w/v) thiobarbituric acid in 7.1% (w/v) 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 in a spectrophotometer at 532 nm. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane. TBA-RS were calculated as nmol TBA-RS /mg protein.

Total radical-trapping antioxidant potential (TRAP)

TRAP was determined by measuring the chemiluminescence intensity of luminol induced by ABAP according to the method of Evelson *et al.* (2001) using a Wallac 1409 Scintillation Counter. The reaction mixtures contained 3 mL of 10 mM ABAP and 10 μ L of 4 mM luminol dissolved in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and 0.1 M NaOH, respectively. Incubation of these mixtures generates an almost constant light intensity at room temperature. Ten μ L of 300 μ M Trolox (water-soluble α -tocopherol analogue) or tissue supernatant was added and at this point, the luminescence intensity is practically abolished. The time required to consume the active antioxidants present in brain tissue was evaluated by observing

the return of the luminescence and this was compared to those obtained employing Trolox under identical experimental conditions. TRAP values were calculated 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. The background chemiluminescence was measured by adding 4 mL of 2 mM ABAP into a glass scintillation vial. Fifteen $[\mu]$ L of 4 mM luminol were added to each vial and the chemiluminescence was measured. This was considered the basal value. Ten $[\mu]$ L of 10-100 $[\mu]$ M Trolox (curve calibration) or tissue supernatant was added and the chemiluminescence was measured during 60 sec. The rapid reduction of luminol intensity is considered as a measure of the antioxidant reactivity of the tissue and was calculated as nmol Trolox/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). Brain tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. This method is based on the disappearance of H_2O_2 at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H_2O_2 , 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), and 0.1-0.3 mg protein/mL. One CAT unit is defined as one $[\mu]$ mol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is represented as units per mg protein.

Glutathione peroxidase

GPX activity was measured by the method of Wendel (1981), using *tert*-butyl hydroperoxide as substrate. Tissue was homogenized 1:10 (w/v) 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 reaction 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 μ mol of NADPH consumed per minute and specific activity is represented as units per mg protein.

Superoxide dismutase

The assay of SOD activity was determined by the method of Marklund (1985). Cerebral tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 50 mM Tris-HCl buffer containing 1 mM EDTA (pH 8.2). This method is based on capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide radical. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be 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. A 50% inhibition of pyrogallol autoxidation is defined as one unit of SOD and the specific activity is represented as units per mg protein.

Protein determination

Protein concentrations were determined in cerebral cortex supernatants by the method of Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA followed by the Tukey test when the F-value was significant. Linear regression analysis was also used to test 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

GHB-induced lipid peroxidation

Lipid peroxidation was investigated by measuring chemiluminescence and TBA-RS levels in rat cerebral cortex. Figure 1 shows that GHB at the higher concentrations strongly increased chemiluminescence [$F(3,16)=33.38$; $p < 0.001$] in a dose-dependent way ($\beta=0.92$; $p < 0.001$). In addition, TBA-RS levels were significantly increased by 1.0 mM GHB [$F(3,12)=13.51$; $p < 0.01$] and this effect was dose dependent ($\beta=0.88$; $p < 0.001$) (Figure 2). These results show that GHB stimulates *in vitro* lipid peroxidation in cerebral cortex homogenates.

Non-enzymatic antioxidants defenses are decreased by GHB

Next, the antioxidant capacity of cerebral cortex homogenates was studied by determining TRAP and TAR, which represent non-enzymatic antioxidant quantity and reactivity, respectively. It can be observed in Figure 3 that 0.5 and 1.0 mM GHB markedly decreased TRAP [$F(3,12)=12.374$; $p < 0.001$] in a concentration-dependent way ($\beta=-0.80$; $p < 0.001$). Similarly, TAR measurement was significantly reduced in a dose-related fashion when cerebral cortex was exposed to GHB [$F(3,16)=8.86$; $p < 0.001$] ($\beta=-0.73$; $p < 0.001$) (Figure 4). These results suggest that the

non-enzymatic antioxidants defenses of the cerebral cortex were significantly reduced by GHB in brain.

GHB does not alter the activity of antioxidant enzymes

Finally, the activities of the antioxidant enzymes CAT, SOD and GPX were assayed in the presence of GHB (Table 1). GHB did not alter the activities of CAT [F(3,24)=0.64; $p>0.05$], GPX [F(3,8)=1.59; $p>0.05$] and SOD [F(3,8)=1.4; $p>0.05$]. These results indicate that GHB does not directly affect the activities of enzymatic antioxidant defenses.

Discussion

The understanding of the exact biochemical alterations in brain of SSADH-deficient patients may contribute to a better therapeutic management since the current therapy with vigabatrin is not uniformly successful (Gibson & Jakobs, 2001).

Recently, Gupta *et al.* (2003) observed that SSADH-knockout mice present elevated levels of homovanilic acid, a product of dopamine metabolism, suggesting that oxidative stress may be involved of in SSADH deficiency. Therefore, to test this hypothesis and to better comprehend the mechanisms of GHB neurotoxicity, we evaluated the *in vitro* effect of GHB on some parameters of oxidative stress in cerebral cortex of young rats.

We initially investigated the influence of GHB on lipid peroxidation by measuring chemiluminescence and TBA-RS levels. We demonstrated that this organic acid, at concentrations similar to those found in CSF and blood of patients with γ -hydroxybutyric aciduria, significantly increased chemiluminescence and TBA-RS levels in cerebral cortex of young rats. Considering that the light emitted

in chemiluminescence assay arises from peroxidizing lipids (Halliwell & Gutteridge, 1999) and that TBA-RS reflects the content of malondialdehyde, the most abundant individual aldehyde resulting from lipid peroxidation (Esterbauer & Cheeseman, 1990), our present findings indicate that GHB strongly induces lipid peroxidation probably due to an increase in reactive oxygen or nitrogen species production.

The next experiments were performed to study the effect of GHB on the brain non-enzymatic antioxidant defenses by determining TRAP and TAR. We observed a significant reduction in TRAP measurement by GHB, indicating a decrease of the non-enzymatic components responsible for the antioxidant defenses in brain. Furthermore, as TRAP values in brain are mainly correlated to GSH levels (Evelson *et al.*, 2001), it is feasible that GSH is consumed due to generation of reactive species elicited directly or indirectly by GHB. Since, dopamine turnover is increased in SSADH deficiency (Gupta *et al.*, 2003), we cannot exclude an alternative mechanism due to the formation of catecholamine-thiol conjugates leading to GSH depletion (Spencer *et al.*, 1998). Another interesting observation is that GSH depletion in rats causes marked degeneration of brain mitochondria (Jain *et al.*, 1991), which can secondarily lead to increased formation of reactive oxygen species that may result in a vicious cycle. TAR, which considers not only the quantity of antioxidants (given by TRAP) but also their quality (given by its reactivity), was also markedly diminished by GHB, demonstrating a deficient capacity of brain tissue to modulate the damage associated with an enhanced production of free radicals. These observations strongly indicate that GHB reduces non-enzymatic antioxidant defenses of brain tissue.

We finally observed the effect of GHB on the activities of enzymes CAT, GPX and SOD, which are considered the main enzymatic defenses of brain against

oxidative damage. The antioxidant enzyme activities were not directly affected by GHB indicating no apparent interaction between GHB and these enzymes. We cannot, however, exclude that longer or chronic exposure of brain supernatants to GHB would alter these enzyme activities, which become enhanced in situations of increased free radical generation. In this context, it seems desirable to measure oxidative stress parameters in the SSADH-deficient murine models.

It is considering that oxidative stress can result from distinct situations, such as generation of reactive species at an abnormally high rate, insufficient antioxidant defenses, releasing of transition metal ions or due to a combination of these conditions (Halliwell, 2001). Therefore, our data clearly demonstrate that GHB induces oxidative stress by stimulating lipid peroxidation and by decreasing the non-enzymatic antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. This conclusion is strengthened by a significantly inverse correlation between chemiluminescence and TRAP (Pearson correlation=-0.834; $p < 0.001$) as illustrated in Figure 5.

On the other hand, it should be emphasized that the brain is highly sensitive to oxidative stress due to its high oxygen consumption, its high iron and lipid contents, especially polyunsaturated fatty acids, the fact that many neurotransmitters are autoxidisable molecules, and the modest antioxidant defenses (Halliwell, 2001). In fact, the damaging consequences of oxidative stress have been implicated in a variety of human disorders including neurodegenerative diseases, such as tardive dyskinesia, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Friedreich's ataxia and Down's syndrome (Halliwell, 2001). This may be particularly interesting in Huntington's disease because high levels of GHB were detected post-mortem in brain obtained from patients with this disorder (Ando *et al.*, 1979).

Although the concentrations of GHB used in our experiments are comparable to those found in physiological fluids of patients affected by γ -hydroxybutyric aciduria, it seems simplistic to extrapolate our findings to the human condition. However, if this is the case it is possible that oxidative stress may contribute, at least in part, to the neurological dysfunction characteristic of SSADH deficiency. Further experiments performed in brain of the SSADH deficient murine model should be carried out to confirm our results. In case similar findings are achieved, it is proposed that administration of antioxidants should be considered as an adjuvant therapy for patients affected by γ -hydroxybutyric aciduria.

Acknowledgements

This research was supported by grants from CNPq, PRONEX and PROPESQ/UFRGS.

References

- Aebi H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* **105**, 121-126.
- Ando N., Gold B. I., Bird E. D. and Roth R. H. (1979) Regional brain levels of γ -hydroxybutyrate in Huntington's disease. *J. Neurochem.* **32**, 617-622.
- Cash C. D. (1994) Gammahydroxybutyrate: an overview of the pros and cons for it being a neurotransmitter and/or a useful therapeutic agent. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **18**, 291-304.
- Esterbauer H. and Cheeseman K. H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* **186**, 407-421.

- Evelson P., Travacio M., Repetto M., Escobar J., Liesuy S. and Lissi E. A. (2001) Evaluation of total reactive antioxidant potencial (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* **388**, 261-266.
- Gibson K. M., Jakobs C., Ogier H., Hagenfeldt L., Eeg-Olofsson K. E., Eeg-Olofsson O., Aksu F., Weber H. P., Rossier E., Vollmer B. and Lehnert W. (1995) Vigabatrin therapy in six patients with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **18**, 143-146.
- Gibson K. M., Christensen E., Jakobs C., Fowler B., Clarke M. A., Hammersen G., *et al.* (1997) The clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria): case reports of 23 new patients. *Pediatrics* **99**, 567-574.
- Gibson K. M. and Jakobs C. (2001) Disorders of beta- and gamma-amino acids in free and peptide-linked forms, in: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, (Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S. and Valle D., eds.), Vol. II, 2079-2105. McGraw-Hill, New York.
- Gibson K. M., Schor D. S. M., Gupta M., Guerand W. S., Senephansiri H., Burlingame T. G., Bartels H., Hogema B. M., Bottiglieri T., Froestl W., Snead O. C., Grompe M. and Jakobs C. (2002) Focal neurometabolic alterations in mice deficient for succinate semialdehyde dehydrogenase. *J. Neurochem.* **81**, 71-79.
- Gupta M., Hogema B. M., Grompe M., Bottiglieri T. G., Concas A., Biggio G., Sogliano C., Rigamonti A. E., Pearl P. L., Snead III O. C., Jakobs C. and Gibson K. M. (2003) Murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Ann. Neurol.* **54**, S81-S90.
- Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. (1999) Detection of free radicals and others reactive species: trapping and fingerprinting, in: *Free Radicals in Biology and*

Medicine, (Halliwell B. and Gutteridge J. M. C., eds.), Oxford University Press, Oxford, 1999, pp. 351-425.

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

Hogema B. M., Gupta M., Senephansiri H., Burlingame T. G., Taylor M., Jakobs C., Schutgens R. B., Froestl W., Snead O. C., Diaz-Arrastia R., Bottiglieri T., Grompe M and Gibson K. M. (2001) Pharmacologic rescue of lethal seizures in mice deficient in succinate semialdehyde dehydrogenase. *Nat. Genet.* **29**, 212-216.

Howells D., Jakobs C., Kok R. M., Wrennall J. and Thompson G. N. (1992) Vigabatrin therapy in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Mol. Neuropharmacol.* **2**, 181-184.

Ishiguro Y., Kajita M., Aoshima T., Watanabe K., Kimura M. and Yamaguchi S. (2001) The first case of 4-hydroxybutyric aciduria in Japan. *Brain Dev.* **23**, 128-130.

Jain A., Martensson J., Stole E., Auld P. A. M. and Meister A. (1991) Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1913-1917.

Jakobs C., Jaeken J. and Gibson K. M. (1993) Inherited disorders of GABA metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* **16**, 704-715.

Lissi E., Caceres T. and Videla L. A. (1986) Visible chemiluminescence from rat homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. *J. Free. Radic. Biol. Med.* **2**, 63-69.

Lissi E., Salim-Hanna M., Pascual C. and Del Castillo M.D. (1995) Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-

- enhanced chemiluminescence measurements. *Free. Radic. Biol. Med.* **18**, 153-158.
- Llesuy S. F., Milei J., Molina H., Boveris A. and 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., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Maitre M. (1997) The [[gamma]]-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog. Neurobiol.* **51**, 337-361.
- Marklund S. L. (1985) Pyrogallol autoxidation, In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, (Greenwald, R. A., ed.), pp. 243-247, CRC Press, Boca Raton.
- Pearl P. L., Novotny E. J., Acosta M. T., Jakobs C. And Gibson K. M. (2003) Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency In Children And Adults. *Ann. Neurol.* **54**, S73-S80.
- Silva A. R., Ruschel C., Helegda C., Brusque A. M., Wannmacher C. M. D., Wajner M. and Dutra-Filho C. S. (1999) Inhibition of rat brain lipid synthesis *in vitro* by 4-hydroxybutyric acid. *Metab. Brain Dis.* **14**, 157-164.
- Spencer J. P. E., Jenner P., Daniel S. E., Lees A. J., Marsden D. C. and Halliwell B. (1998) Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J. Neurochem.* **71**, 2112-2122.
- Wendel A. (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **77**, 325-332.
- Wong C. G. T., Bottiglieri T. and Snead O. C. (2003) GABA, [[gamma]]-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann. Neurol.* **54**, S3-S12.

Table 1. Effect of γ -hydroxybutyric acid on antioxidant enzyme activities in cerebral cortex from 15-day-old rats.

Antioxidant enzyme activity (U/mg protein)	γ -Hydroxybutyric Acid (mM)			
	0	0.1	0.5	1.0
CAT (n=7)	12.30 \pm 1.90	11.52 \pm 1.92	11.10 \pm 1.45	11.34 \pm 1.54
GPX (n=3)	18.91 \pm 2.34	19.91 \pm 0.51	17.65 \pm 0.95	19.50 \pm 0.82
SOD (n=3)	4.87 \pm 0.37	5.84 \pm 0.46	5.16 \pm 0.87	5.29 \pm 0.63

Data are expressed as mean \pm SD for experiments performed in duplicate. CAT, catalase; GPX, glutathione peroxidase; SOD, superoxide dismutase. One CAT unit is defined as one μ mol of H₂O₂ consumed per minute. One GPX unit is defined as one μ mol of NADPH consumed per minute. One SOD unit is defined as 50% inhibition of pyrogallol autoxidation.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Effect of [[gamma]]-hydroxybutyric acid on chemiluminescence in cerebral cortex of rats. Data are expressed as mean \pm SD for five independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.01$ compared to control (Tukey test).

Figure 2. Effect of [[gamma]]-hydroxybutyric acid on thiobarbituric-acid reactive substances (TBA-RS) in cerebral cortex of rats. Data are expressed as mean \pm SD for four independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.01$ compared to control (Tukey test).

Figure 3. Effect of [[gamma]]-hydroxybutyric acid on total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) in cerebral cortex of rats. Data are expressed as mean \pm SD for four independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.01$ compared to control (Tukey test).

Figure 4. Effect of [[gamma]]-hydroxybutyric acid on total antioxidant reactivity (TAR) in cerebral cortex of rats. Data are expressed as mean \pm SD for five independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.01$ compared to control (Tukey test).

Figure 5. Correlation between chemiluminescence and total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) in cerebral cortex of rats. Data were taken from experiments on the *in vitro* effect of GHB (Figures 1 and 3).

FIGURE 1

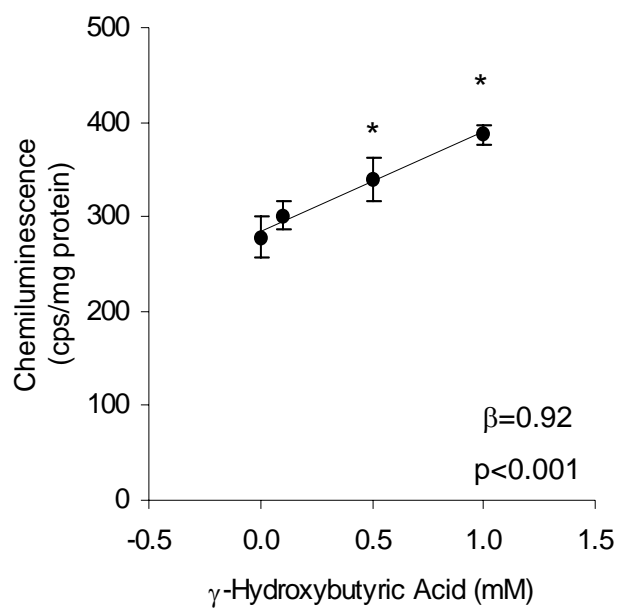


FIGURE 2

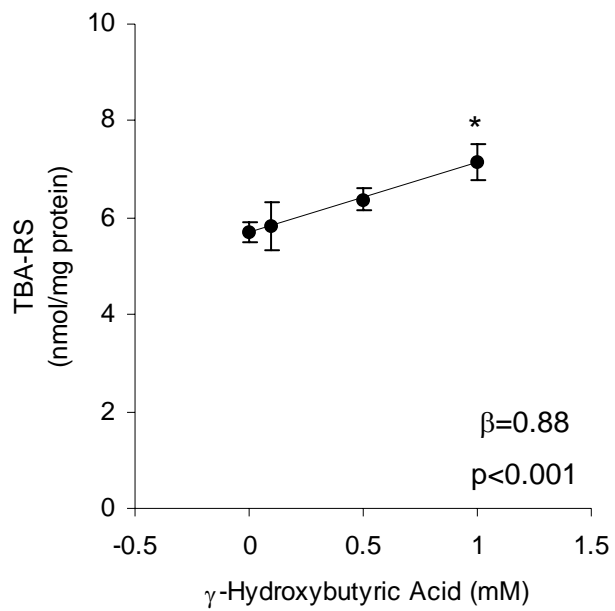


FIGURE 3

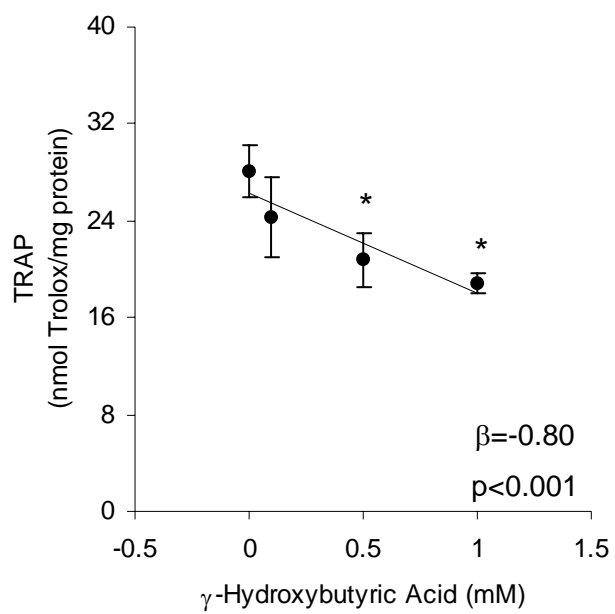


FIGURE 4

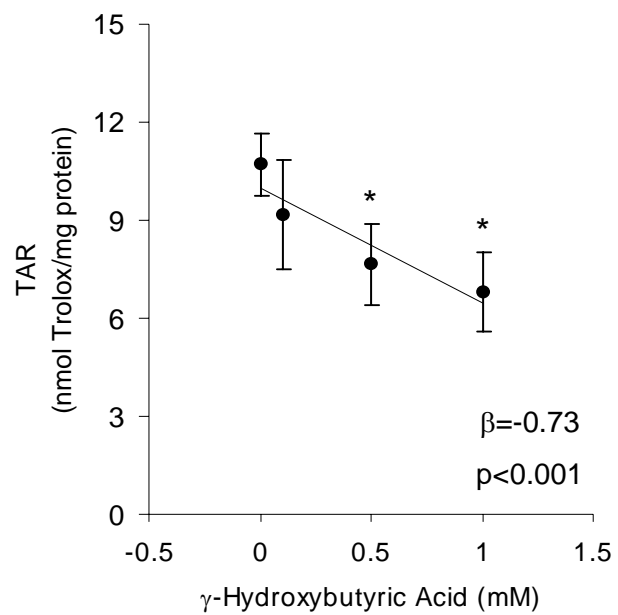
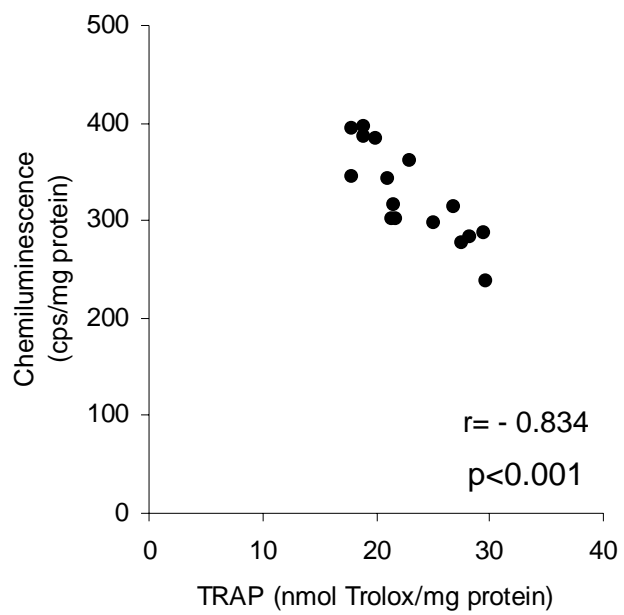


FIGURE 5



4 DISCUSSÃO

A presença de sintomas neurológicos e de elevadas concentrações do ácido γ -hidroxibutírico nos fluidos fisiológicos, especialmente no líquido cefalorraquidiano dos pacientes, sugere que o ácido γ -hidroxibutírico pode ser o agente neurotóxico primário da deficiência da semialdeído succínico desidrogenase. Por essa razão, a compreensão das alterações bioquímicas no sistema nervoso central desses pacientes poderá contribuir para um melhor controle terapêutico da deficiência da semialdeído succínico desidrogenase, visto que o tratamento atual não é, na maioria das vezes, satisfatório.

Recentemente, GUPTA *et al.* (2003) observaram um aumento nos níveis do ácido homovanílico, um produto do metabolismo da dopamina, em camundongos geneticamente modificados e sugeriram o envolvimento do estresse oxidativo na deficiência da semialdeído succínico desidrogenase. Diante disso, o efeito *in vitro* do ácido γ -hidroxibutírico sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens foi avaliado para testar essa hipótese e melhor entender os mecanismos neurotóxicos desse ácido orgânico.

Inicialmente, a influência do ácido γ -hidroxibutírico sobre a lipoperoxidação foi investigada através da medida da quimiluminescência e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). O ácido γ -hidroxibutírico, em concentrações semelhantes às encontradas nos fluidos fisiológicos dos pacientes afetados pela deficiência da semialdeído succínico desidrogenase, aumentou significativamente os dois parâmetros estudados. Considerando que a quimiluminescência é um processo

no qual ocorre a emissão de luz visível quando espécies excitadas (oxigênio “singlet” e carbonilas excitadas) geradas durante a lipoperoxidação retornam ao seu estado fundamental (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999) e que o TBA-RS reflete o conteúdo de malondialdeído formado através da decomposição de hidroperóxidos lipídicos (ESTERBAUER & CHEESEMAN, 1990), os resultados anteriormente citados sugerem que o ácido γ -hidroxibutírico induz a lipoperoxidação em córtex cerebral de ratos por aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio.

A etapa seguinte foi estudar o efeito do ácido γ -hidroxibutírico sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas cerebrais através da determinação do potencial antioxidante total (TRAP) e da reatividade antioxidante total (TAR). Verificou-se uma redução significativa do TRAP, indicando que houve um decréscimo dos componentes não-enzimáticos responsáveis pela defesa antioxidante cerebral. Além disso, como os valores do TRAP estão relacionados, principalmente, com os níveis de GSH em cérebro de ratos (EVELSON *et al.*, 2001), é provável que a GSH seja consumida em resposta ao aumento da formação de espécies reativas provocadas direta ou indiretamente pelo ácido γ -hidroxibutírico. Apesar da glicina ser um dos aminoácidos requerido para a biossíntese de GSH (ANDERSON, 1998) e dos níveis desse aminoácido estarem aumentados nos fluidos fisiológicos dos pacientes com a deficiência da semialdeído succínico desidrogenase (GIBSON & JAKOBS, 2001), é possível que ocorra uma redução do TRAP nesses indivíduos. A explicação para tal hipótese é o fato de que o aminoácido limitante para a formação desse antioxidante é a cisteína (ANDERSON, 1998) e, conseqüentemente, o aumento de glicina nesses pacientes não irá interferir na biossíntese de GSH. TAR avalia tanto a quantidade quanto a qualidade (reatividade) dos antioxidantes através da medida da velocidade com que esses compostos são

capazes de neutralizar os radicais livres (LISSI *et al.*, 1995). Esse parâmetro também foi marcadamente diminuído pelo ácido γ -hidroxibutírico, demonstrando que o tecido cerebral apresenta uma pequena capacidade de modular os danos associados ao aumento da produção de radicais livres. Essas observações mostram que o ácido γ -hidroxibutírico reduz as defesas antioxidantes não-enzimáticas do tecido cerebral de ratos.

Finalmente, o efeito do ácido γ -hidroxibutírico sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase foi avaliado. As atividades das enzimas antioxidantes não foram diretamente afetadas pelo ácido γ -hidroxibutírico, indicando que não existe interação aparente entre o ácido γ -hidroxibutírico e essas enzimas. Porém, não se pode excluir que uma exposição maior ou crônica do tecido cerebral ao ácido γ -hidroxibutírico poderia alterar a atividade dessas enzimas por aumentar a síntese e/ou a atividade das mesmas em situações em que o estresse oxidativo esteja bem caracterizado (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Neste sentido, parece interessante medir alguns parâmetros de estresse oxidativo em modelos animais da deficiência da semialdeído succínico desidrogenase.

Como o estresse oxidativo pode resultar da produção excessiva de espécies reativas, diminuição das defesas antioxidantes, liberação de metais de transição ou pela combinação dos fatores acima mencionados (HALLIWELL, 2001), os resultados obtidos nesse trabalho sugerem claramente que o ácido γ -hidroxibutírico pode causar o estresse oxidativo por estimular a lipoperoxidação e diminuir as defesas antioxidantes não-enzimáticas em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens. Essa conclusão é reforçada pela correlação negativa (correlação de Pearson=-0.834; $p<0.001$) entre a quimiluminescência e o TRAP, mostrando que o

aumento da medida da quimiluminescência está intimamente relacionado com uma diminuição do TRAP como ilustrado na Figura 5 do artigo científico.

Além disso, é importante enfatizar que o sistema nervoso central é particularmente sensível ao estresse oxidativo e que as conseqüências deletérias desse processo estão envolvidas em várias doenças neurodegenerativas como, por exemplo, na doença de Parkinson, na doença de Alzheimer, na doença de Huntington e na síndrome de Down (HALLIWELL, 2001). Isso é particularmente interessante na doença de Huntington em que níveis elevados do ácido γ -hidroxibutírico foram detectados *post-mortem* no cérebro de alguns indivíduos com essa doença (ANDO *et al.*, 1979).

Apesar das concentrações do ácido γ -hidroxibutírico usadas nesses experimentos serem compatíveis com as encontradas nos fluidos fisiológicos dos pacientes afetados pela deficiência da semialdeído succínico desidrogenase, é difícil extrapolar esses resultados para a condição humana. Porém, se for esse o caso, é possível que o estresse oxidativo possa contribuir para as disfunções neurológicas peculiares da deficiência da semialdeído succínico desidrogenase. Entretanto, experimentos adicionais deverão ser realizados *in vivo* através da administração do ácido γ -hidroxibutírico e em modelos animais da deficiência da semialdeído succínico desidrogenase para confirmar esses dados. Além disso, vários parâmetros de estresse oxidativo poderão ser avaliados em pacientes com esse distúrbio. Portanto, se os resultados forem semelhantes aos encontrados nesse trabalho, a administração de antioxidantes deveria ser testada como uma terapia adjuvante no tratamento dos pacientes afetados pela deficiência da semialdeído succínico desidrogenase.

5 CONCLUSÃO

O ácido γ -hidroxibutírico aumentou significativamente a medida de quimiluminescência e os níveis de TBA-RS, enquanto que o TRAP e o TAR foram marcadamente reduzidos. No entanto, as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX não foram alteradas pelo ácido γ -hidroxibutírico. Esses resultados indicam que *in vitro* o ácido γ -hidroxibutírico induz o estresse oxidativo por estimular a lipoperoxidação e reduzir as defesas antioxidantes não-enzimáticas em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

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, p. 264-271, 1992.

AKABOSHI, S.; HOGEMA, B. M.; NOVELLETTO, A.; MALASPINA, P.; SALOMONS, G. S.; MAROPOULOS, G. D.; JAKOBS, C.; GROMPE, M.; GIBSON, K. M. Mutational spectrum of the succinate semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A1) gene and functional analysis of 27 novel disease-causing mutations in patients with SSADH deficiency. **Human. Mutat.**, 22, abstract, 2003.

ANDERSON, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chem. Biol. Interact.**, 111-112, p. 1-14, 1998.

ANDO, N.; GOLD, B. I.; BIRD, E. D.; ROTH, R. H. Regional brain levels of γ -hydroxybutyrate in Huntington's disease. **J. Neurochem.**, 32, p. 617-622, 1979.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am. J. Physiol.**, 271, p. C1424-1437, 1996.

BLASI, P.; BOYL, P. P.; LEDDA, M.; NOVELLETTO, A.; GIBSON, K. M.; JAKOBS, C.; HOGEMA, B.; AKABOSHI, S.; LORENI, F.; MALASPINA, P. Structure of human succinic semialdehyde dehydrogenase gene: identification of promoter region and alternatively processed isoforms. **Mol. Genet. Metab.**, 76, p. 348-362, 2002.

BOLANN, B. J.; ULVIK, R. J. On the limited ability of superoxide to release iron from ferritin. **Eur. J. Biochem.**, 193, p. 899-904, 1990.

BORUTAITE, V.; BROWN, G. C. Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide. **FEBS Lett.**, 500, p. 114-118, 2001.

BREDT, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radic. Res.**, 31, p. 577-596, 1999.

BROWN, G. K.; CROMBY, C. H.; MANNING, N. J.; POLLITT, R. J. Urinary organic acids in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: evidence of α -oxidation of 4-hydroxybutyric, interaction of succinic semialdehyde with pyruvate dehydrogenase and possible secondary inhibition of mitochondrial β -oxidation. **J. Inher. Metab. Dis.**, 10, p. 367-375, 1987.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Rad. Biol. Med.**, 29, p. 222-230, 2000.

CASH, C. D. Gammahydroxybutyrate: an overview of the pros and cons for it being a neurotransmitter and/or a useful therapeutic agent. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 18, p. 291-304, 1994.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, 59, p. 527-605, 1979.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? **Ann. Inter. Med.**, 111, p. 918-931, 1989.

DEAN, R. T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem. J.**, 324, p. 1-18, 1997.

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, p. 105-110, 2003.

DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **Am. J. Physiol.**, 257, p. L163-173, 1989.

ESPOSITO, L. A.; KOKOSZKA, J. E.; WAYMIRE, K. G.; COTTRELL, B.; MACGREGOR, G. R.; WALLACE, D. C. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. **Free Radic. Biol. Med.**, 28, p. 754-766, 2000.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol.**, 186, p. 407-421, 1990.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S.; LISSI, E. A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Arch. Biochem. Biophys.**, 388, p. 261-266, 2001.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. W. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, 18, p. 872-879, 2002.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. **J. Biol. Chem.**, 272, p.18515-18517, 1997.

FORFIA, P. R.; HINTZE, T. H.; WOLIN, M. S.; KALEY, G. Role of nitric oxide in the control of mitochondrial function. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 471, p. 381-388, 1999.

GIBSON, K. M.; JANNSEN, I.; SWEETMAN, L.; NYHAN, W. L.; RATING, D.; JAKOBS, C.; DIVRY, P. 4-Hydroxybutyric aciduria: a new inborn error of metabolism. III. Enzymology and Inheritance. **J. Inherit. Metab. Dis.**, 7, p. 95-96, 1984.

GIBSON, K. M.; CHRISTENSEN, E.; JAKOBS, C.; *et al.* The clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria): case reports of 23 new patients. **Pediatrics**, 99, p. 567-574, 1997.

GIBSON, K. M.; JAKOBS, C. Disorders of beta- and gamma-amino acids in free and peptide-linked forms. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. (org.). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 2079-2105.

GIBSON, K. M.; GUPTA, M.; PEARL, P. L.; TUCHMAN, M.; VEZINA, L. G.; SNEAD III, O. C.; SMIT, L. M. E.; JAKOBS, C. Significant behavioral disturbances in succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency (gamma-hydroxybutyric aciduria). **Biol. Psychiatry**, 51, p. 763-768, 2003.

GILBERT, H. F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, 63, p. 69-172, 1990.

GROPMAN, A. Vigabatrin and newer interventions in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. **Ann. Neurol.**, 54, p. S66-S72, 2003.

GUPTA, M.; HOGEMA, B. M.; GROMPE, M.; BOTTIGLIERI, T. G.; CONCAS, A.; BIGGIO, G.; SOGLIANO, C.; RIGAMONTI, A. E.; PEARL, P. L.; SNEAD III, O. C.; JAKOBS, C.; GIBSON, K. M. Murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency. **Ann. Neurol.**, 54, p. S81-S90, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.**, 219, p. 1-14, 1984.

HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea?
Trends Biochem. Sci., 24, p. 255-259, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford:
Oxford University Press, 1999, p. 351-425.

HALLIWELL, B.; ZHAO, K.; WHITEMAN, M. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. **Free Radic. Res.**, 31, p. 651-669, 1999.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body.
FEBS Lett., 486, p. 10-13, 2000.

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

HAREL, S.; SALAN, M. A.; KANNER, J. Iron release from metmyoglobin, methaemoglobin and cytochrome c by a system generating hydrogen peroxide.
Free Radic. Res. Commun., 5, p. 11-19, 1988.

HECHLER, V.; GOBAILLE, S.; BOURGUIGNON, J. J.; MAITRE, M. Extracellular events induced by γ -hydroxybutyrate in striatum: a microdialysis study. **J. Neurochem.**, 56, p. 938-944, 1991.

HOBBS, A. J.; HIGGS, A.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 39, p. 191-220, 1999.

HOGEMA, B. M.; AKABOSHI, S.; TAYLOR, M.; SALOMONS, G. S.; JAKOBS, C.; SCHUTGENS, R. B.; WILCKEN, B.; WORTHINGTON, S.; MAROPOULOS, G.; GROMPE, M.; GIBSON, K. M. Prenatal diagnosis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: increased accuracy employing DNA, enzyme, and metabolite analyses. **Mol. Genet. Metab.**, 72, p. 218-222, 2001.

HOWELLS, D.; JAKOBS, C.; KOK, R. M.; WRENNALL, J.; THOMPSON, G. N. Vigabatrin therapy in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. **Mol. Neuropharmacol.**, 2, p. 181-184, 1992.

ISCHIROPOULOS, H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. **Arch. Biochem. Biophys.**, 356, p. 1-11, 1998.

ISHIGURO, Y.; KAJITA, M.; AOSHIMA, T.; WATANABE, K.; KIMURA, M.; YAMAGUCHI, S. The first case of 4-hydroxybutyric aciduria in Japan. **Brain Dev.**, 23, p. 128-130, 2001.

JAKOBS, C.; BOJASCH, M.; MÖENCH, E.; RATING, D.; SIEMES, H.; HANEFELD, F. Urinary excretion of gamma-hydroxybutyric acid in a patient with neurological abnormalities: the probability of a new inborn error of metabolism. **Clin. Chim. Acta**, 111, p. 169-178, 1981.

JAKOBS, C.; JAEKEN, J.; GIBSON, K. M. Inherited disorders of GABA metabolism. **J. Inherit. Metab. Dis.**, 16, p. 704-715, 1993.

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, p. 344-352, 2002.

LASH, L. H.; VISARIUS, T. M.; SALL, J. M.; QIAN, W.; TOKARZ, J. J. Cellular and subcellular heterogeneity of glutathione metabolism and transport in rat kidney cells. **Toxicology**, 130, p. 1-15, 1998.

LEBOVITZ, R. M.; ZHANG, H.; VOGEL, H.; CARTWRIGHT, J. JR.; DIONNE, L.; LU, N.; HUANG, S.; MATZUK, M. M. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93, p. 9782-9787, 1996.

LEVINE, R. L.; BERLETT, B. S.; MOSKOVITZ, J.; MOSONI, L.; STADTMAN, E. R. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. **Mech. Ageing Dev.**, 107, p. 323-332, 1999.

LI, Y.; HUANG, T. T.; CARLSON, E. J.; MELOV, S.; URSELL, P. C.; OLSON, J. L.; NOBLE, L. J.; YOSHIMURA, M. P.; BERGER, C.; CHAN, P. H.; *et al.* Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nat. Genet.**, 11, p. 376-381, 1995.

LIOCHEV, S. L. The role of iron-sulfur clusters in in vivo hydroxyl radical production. **Free Radic. Res.**, 25, p. 369-384, 1996.

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. Radic. Biol. Med.**, 18, p.153-158, 1995.

MAITRE, M. The γ -hydroxybutyrate signaling system in brain: organization and functional implications. **Prog. Neurobiol.**, 51, p. 337-361, 1997.

MAMELAK, M. Gammahydroxybutyrate: an endogenous regulator of energy metabolism. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 13, p. 187-189, 1989.

MEERSON, F. Z.; KAGAN, V. E.; KOSLOV, Y. P.; BELKINA, L. M.; ARKIPENKO, Y. V. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of damage and antioxidant protection of the heart. **Basic. Res. Cardiol.**, 77, p. 465-485, 1982.

MELOV, S.; COSKUN, P.; PATEL, M.; TUINSTRA, R.; COTTRELL, B.; JUN, A. S.; ZASTAWNY, T. H.; DIZDAROGLU, M.; GOODMAN, S. I.; HUANG, T. T.; MIZIORKO, H.; EPSTEIN, C. J.; WALLACE, D. C. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96, p. 846-851, 1999.

PEARL, P. L.; NOVOTNY, E. J.; ACOSTA, M. T.; JAKOBS, C.; GIBSON, K. M. Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency in children and adults. **Ann. Neurol.**, 54, p. S73-S80, 2003

PUPPO, A.; HALLIWELL, B. Formation of hydroxyl radicals in biological systems. Does myoglobin stimulate hydroxyl radical formation from hydrogen peroxide? **Free Radic. Res. Commun.**, 4, p. 415-422, 1988.

SHAN, X. O., AW, T. Y., JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol. Ther.**, 47, p. 61-71, 1990.

SILVA, A. R., RUSCHEL, C., HELEGDA, C., BRUSQUE, A. M., WANNMACHER, C. M. D., WAJNER, M., DUTRA-FILHO, C. S. Inhibition of rat brain lipid synthesis in vitro by 4-hydroxybutyric acid. **Metab. Brain Dis.**, 14, p. 157-164, 1999.

THORBURN, D. R., THOMPSON, G. N., HOWELLS, D. W. A fluorimetric assay for succinic semialdehyde dehydrogenase activity suitable for prenatal diagnosis of the enzyme. **J. Inherit. Metab. Dis.**, 16, p. 942-949, 1993.

WARD, R. J. & PETERS, T. J. Free Radicals. In: MARSHALL, W. J., BANGERT, S. K. (org). **Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects**. New York: Churchill Livingstone, 1995. p. 765-777.

WONG, C. G. T., GIBSON, K. M., SNEAD III, O. C. From the street to the brain: neurobiology of the recreational drug γ -hydroxybutyric acid. **Trends Pharmacol. Sci.**, 25, p. 29-34, 2004.

WYSE, A. T. S., BAVARESCO, C. S., BANDINELLI, C., STRECK, E. L., FRANZON, R., DUTRA-FILHO, C. S., WAJNER, M. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na^+, K^+ -ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. **Neurochem. Res.**, 26, p. 515-520, 2001.