

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Rafaela Martins Alvariz

**Efeito *in vitro* do metabólito
acumulado, globotriaosilceramida,
na doença de Fabry sobre os
complexos da cadeia transportadora
de elétrons e parâmetros redox**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2017**

Rafaela Martins Alvariz

**Efeito *in vitro* do metabólito
acumulado, globotriaosilceramida,
na doença de Fabry sobre os
complexos da cadeia transportadora
de elétrons e parâmetros redox**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do
grau de Mestre

Orientador: Dra. Alethéa Gatto Barschak

**Porto Alegre
2017**

Catálogo na Publicação

Alvariz, Rafaela Martins

Efeito in vitro do metabólito acumulado, globotriaosilceramida, na doença de Fabry sobre os complexos da cadeia transportadora de elétrons e parâmetros redox / Rafaela Martins Alvariz. -- 2017. 60 f. : il., graf. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2017.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Alethéa Gatto Barschak.

1. Doença Lisossômica de Depósito. 2. Doença de Fabry. 3. Cadeia Transportadora de Elétrons. 4. Espécies reativas. 5. Estresse Oxidativo. I. Título.

**Dedico este trabalho à minha família,
por todo apoio e ao meu noivo
pelo incentivo, compreensão e amor.**

**“Se não puderes ser um pinheiro,
no topo de uma colina,
Sê um arbusto no vale mas sê
O melhor arbusto à margem do regato.
Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.
Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva
E dá alegria a algum caminho.
Se não puderes ser uma estrada,
Sê apenas uma senda,
Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...
Mas sê o melhor no que quer que sejas.”**

(Douglas Malloch)

Agradecimento:

À querida orientadora e amiga Alethéa Barschak pela confiança, presença constante, ensinamentos, apoio e carinho com que orientou este trabalho.

Às colegas Ana, Camila, Gabriela, Isabel, Michele e Monice pela amizade, apoio e por tornarem meus dias mais divertidos.

Às bolsistas Isabel e Maria Eduarda pela ajuda e companheirismo nas longas jornadas no laboratório.

Aos colegas do laboratório de Toxicologia Analítica por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Aos funcionários da pós-graduação Camila e Giuliano por todo apoio a este projeto.

Aos professores Cabral e Maria pela compreensão e por aceitarem minhas ausências.

Aos meus pais Rosângela e Edison por me incentivarem sempre e acreditarem nos meus sonhos.

Ao meu noivo Reginaldo pelo carinho, amor, incentivo e principalmente pela compreensão.

A DEUS, por permitir que eu alcançasse mais esta vitória

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Erros inatos do metabolismo	1
1.2. Doenças lisossômicas de depósito	2
1.2.1. A doença de Fabry	3
1.3. A cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa.....	9
1.3.1 Complexo I (NADH-coenzima Q-oxidoreductase).....	9
1.3.2 Complexo II (Succinato-coenzima Q-oxidoreductase).....	10
1.3.3 Complexo III (Coenzima Q-citocromo c-oxidoreductase).....	10
1.3.4 Complexo IV (Citocromo c-oxidase).....	11
1.3.5 Transferência sequencial de elétrons.....	11
1.4. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	13
1.5. Sistema de defesa antioxidante.....	15
1.6. Estresse oxidativo.....	16
1.7. Referências bibliográficas.....	19
2. Objetivos.....	25
2.1 Gerais	25
2.2 Específicos	25
3. Artigo científico redigido em inglês.....	26
4. Considerações finais	48
5. Anexos	49

Lista de abreviaturas utilizadas

- ATP: Adenosina 5'-trifosfato
- CTE: Cadeia transportadora de elétrons
- CAT: Catalase
- CoQ: Coenzima Q
- COX: Citocromo oxidase
- CuZn-SOD: Cobre-zinco superóxido dismutase
- DCF: *2,7-dichlorofluorescein*
- DF: Doença de Fabry
- DLD: Doença lisossômica de depósito
- ECT: *Electron transport chain*
- EIM: Erro inato do metabolismo
- ERN: Espécie reativa de oxigênio
- ERO: Espécie reativa de nitrogênio
- FD: *Fabry disease*
- FAD: Flaviana adenina dinucleotídeo
- Fe²⁺: Íon ferroso
- Fe³⁺: Íon férrico
- Fe-S: Centros ferro-enxofre
- Fe-SOD: Ferro superóxido dismutase
- GB3: Globotriaosilceramida
- GR: Glutaciona redutase
- GSH: Glutaciona (forma reduzida)
- GSH-Px: Glutaciona peroxidase

GSSG: Glutathiona (forma oxidada)

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

MDA: *Malondialdehyde*

Mn-SOD: Manganês superóxido dismutase

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NO: Óxido nítrico

NO[•]: Nitroxila

NO⁺: Nitrosônio

ONOO⁻: Ânion peroxinitrito

O₂: Oxigênio molecular

O₂^{•-}: Ânion superóxido

O₂²⁻: Íon peróxido

OH[•]: Radical hidroxila

OH⁻: Ânion hidroxila

RNS: *Reactive nitrogen species*

ROS: *Reactive oxygen species*

TBARS: *Thiobarbituric acid-reactive species*

TRE: Terapia de reposição enzimática

Resumo da Dissertação

Introdução:

As doenças lisossômicas de depósito (DLD) são uma família de mais de 50 doenças genéticas distintas sendo cada uma o resultado de um defeito na função de uma enzima lisossomal específica. A doença de Fabry (DF) é de herança ligada ao X e ocorre devido a mutações no gene *GLA*, que codifica a enzima α -galactosidase A. Trata-se de uma enzima lisossomal, o que torna também a DF uma DLD. Como consequência, os substratos da enzima acumulam-se nos mais variados líquidos biológicos e tecidos. O resultado é a diminuição ou não capacidade de catabolizar lipídeos com resíduos terminais de α -galactosil, em especial o globotriaosilceramida (GB3), havendo acúmulo progressivo destes nos lisossomos de diferentes tecidos.

Objetivos:

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* do metabólito GB3 sobre os complexos da cadeia transportadora de elétrons e os parâmetros redox (enzimas antioxidantes, lipoperoxidação e formação de espécies reativas).

Materiais e métodos:

Os parâmetros avaliados neste trabalho foram determinados no homogeneizado (córtex cerebral e rim) de ratos Wistar pré-incubado por 60 minutos a 37°C na ausência (grupo controle) ou na presença (grupo teste) do GB3 nas concentrações de 3, 6, 9 e 12 mg/L.

Resultados:

Nossos resultados mostraram uma diminuição da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no córtex cerebral, bem como um

aumento na formação do malondialdeído (MDA), na presença do GB3. Verificamos ainda que o GB3 *in vitro* foi capaz de provocar um aumento na atividade dos complexos II e IV da cadeia transportadora de elétrons (CTE), um aumento da produção de espécies reativas e um aumento na atividade da SOD no homogeneizado do rim dos ratos.

Conclusões:

Enfim, nossos resultados sugerem que o principal metabólito acumulado na DF, o GB3, parece contribuir para o desequilíbrio energético e o redox celular, e o que pode estar relacionado às manifestações renais e cerebrais graves observadas na doença. Entretanto, mais estudos envolvendo a avaliação da CTE em amostras de pacientes ou em cultura celular poderão auxiliar no melhor entendimento destes resultados.

Palavras-Chave:

Doença de Fabry, Globotriaosilceramida, GB3, cadeia transportadora de elétrons, redox celular, estresse oxidativo.

1. Introdução

1.1. Erros inatos do metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios de natureza genética que comumente correspondem a um defeito enzimático capaz de causar a interrupção de uma via metabólica. Ocasionalmente, deste modo, alguma falha de síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas no organismo (Husny e cols., 2006).

Sinclair (1982) classificou os EIM em quatro grandes grupos de acordo com o tipo de função exercida pela proteína defeituosa e o tecido envolvido:

- Desordens de transporte: afetam o transporte renal ou intestinal de moléculas orgânicas ou inorgânicas;
- Desordens de síntese: envolvem a síntese anormal ou incompleta de proteínas com funções hormonais, de defesa imunológica, entre outras;
- Desordens do metabolismo intermediário: envolvem deficiências enzimáticas das rotas de metabolização de moléculas pequenas, tais como aminoácidos, glicídios e neurotransmissores, que podem comprometer rotas importantes, como os ciclos dos ácidos tricarboxílicos e da uréia, ou rotas relacionadas a estas;
- Desordens de armazenamento, degradação e secreção: envolvem proteínas relacionadas com o complexo de Golgi ou, na sua grande maioria, lisossomos, provocando acúmulo de macromoléculas em determinados tecidos, como as doenças lisossômicas de depósito (DLD).

1.2. Doenças lisossômicas de depósito

DLD são um grupo de doenças hereditárias que, devido à deficiência de uma determinada enzima lisossômica (como hidrolases, proteínas da membrana e proteínas acessórias do lisossomo) provocam a interrupção de vias catabólicas lisossomais específicas e armazenamento de substratos não degradados. Esse acúmulo de substratos não degradados no lisossomo prejudica suas funções celulares relevantes, como a autofagia e o tráfego de vesículas, levando ao acúmulo de organelas disfuncionais e à ativação das cascatas secundárias que podem afetar vários processos metabólicos (Platt e cols., 2012).

O acúmulo de substratos ocorre em múltiplos órgãos, acarretando alterações viscerais, neurológicas, esqueléticas, hematológicas e oculares, com um espectro fenotípico que varia com a idade de início. Frequentemente estes fatores estão fortemente relacionados nas DLD, pois, quanto mais precoce são as manifestações, maior é o comprometimento fenotípico (Biffi, 2016).

As DLD são uma família de mais de 50 doenças genéticas distintas, sendo cada uma o resultado de um defeito na função de uma enzima lisossomal específica (Meikle e Hopwood, 2003).

As DLD são doenças crônicas, multissistêmicas e progressivas, com uma prevalência combinada estimada de 1: 8.000 nascidos vivos. Quase dois terços dos pacientes possuem alterações neurológicas, colocando o grupo das DLD entre as principais causas de neurodegeneração (Verity e cols., 2010).

1.2.1. A Doença de Fabry

A DF foi primeiramente descrita em 1898 pelos dermatologistas Johannes Fabry e William Anderson, que a chamaram de "angioqueratoma corporis diffusum". Ela foi reconhecida inicialmente como uma doença vascular sistêmica e posteriormente como um distúrbio de armazenamento lipídico. Em 1963, o acúmulo dos glicolipídios, chamados globotriaosilceramida (GB3 ou GL-3) e galabiosilceramida, foi identificado em diferentes tipos de células (Schiffmann e Ries, 2016).

A DF é um EIM de herança ligada ao X que ocorre devido a mutações no gene *GLA*, que codifica a enzima α -galactosidase A (α -gal A, EC 3.2.1.22) (Figura 1). Por tratar-se de uma enzima lisossomal, a DF é classificada como uma DLD e, como consequência, os substratos da enzima acumulam-se nos mais variados líquidos biológicos e tecidos (Desnick e cols., 2001).

Os defeitos do produto do gene *GLA*, causados na maior parte por substituições simples de aminoácidos, conduzem a uma degradação adiantada da enzima dentro do retículo endoplasmático e proíbem o tráfego intracelular desta à organela de destino, o lisossomo (Verity e cols., 2010). A enzima possui dois domínios, sendo que o domínio 1 contém o sítio ativo (Figura 1).

O acúmulo progressivo do glicolipídio no endotélio vascular leva às principais manifestações clínicas nos hemizigotos masculinos. Os primeiros sinais clínicos comumente surgem na infância e na adolescência. Tais manifestações precoces envolvem dor nas extremidades (acroparestesias), aparecimento de lesões cutâneas (angioqueratomas) e hipoidrose. Em alguns casos, os sinais e sintomas podem ser mais tardios, surgindo somente após a segunda ou terceira década de vida (Desnick e cols., 2001).

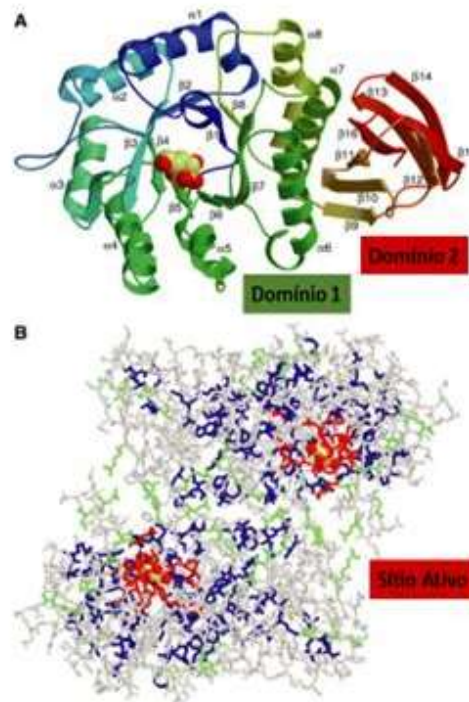


Figura 1. Estrutura da α -galactosidase A (α -Gal A). (A) Estrutura do monômero. A extremidade N-terminal está colorida de azul e a C-terminal, de vermelho. (B) Dímero da α -Gal A humana. As ligações em vermelho, azul e verde indicam os locais de mutação que perturbam diretamente o sítio ativo da enzima (adaptado de Garman e Garboczi, 2004).

A DF é rara, sendo sua incidência estimada de cerca de 1: 40.000 nascidos vivos (Kuech e cols., 2016). Entretanto, pesquisas recentes de triagem neonatal sugerem que esta possa ser muito mais elevada, chegando até 1 caso para cada 3.100 nascidos vivos. Em Taiwan, a incidência de uma mutação relativamente leve (IVS919G) é de 1:875 nascidos vivos do sexo masculino e 1:399 do feminino. Esses dados sugerem uma alta incidência no momento do nascimento. No entanto, como a natureza das complicações da DF não são específicas, é provável que muitos pacientes não sejam diagnosticados (Chien, 2012).

Os homens apresentam a forma clássica da doença com acometimento cutâneo, caracterizado pelos angioqueratomas (conglomerados de pequenas

lesões violáceas e queratinizadas) com localização preferencial nas nádegas e na região das coxas (zona do calção); acometimento do sistema nervoso periférico e central, com acroparestesias (dor nas extremidades) e acidentes vasculares cerebrais (AVCs) precoces; hipohidrose (sudorese diminuída) e intolerância ao calor; alterações oculares, como cornea verticillata (depósitos nas córneas); hipertrofia miocárdica; arritmias; comprometimento renal e alterações gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia (German, 2010).

As mulheres, apesar de heterozigotas, também podem ser acometidas, inclusive com manifestações cardíacas, renais e cerebrais graves. Nas células da mulher, apenas um cromossomo X está ativado, existindo uma inativação aleatória dos mesmos. Portanto, as manifestações clínicas dependeriam da quantidade de células com cromossomo X alterado ativo presente na paciente (Wilcox e cols., 2008).

Na idade adulta, a ocorrência de AVC dá-se em média aos 34 anos de idade em hemizigotos e aos 40 em heterozigotas. O mesmo se deve, principalmente, à oclusão da microvasculatura. A doença cerebrovascular e a afecção cardiovascular estão entre as maiores causas de morte desses indivíduos. Outras manifestações neurológicas incluem alterações auditivas, sensoriais e vestibulares (como vertigem e zumbidos) (Linhart e cols., 2007).

O envolvimento renal ocorre devido ao acúmulo do GB3 em praticamente todos os tipos de células renais, como nas células endoteliais, mesangiais, podocitárias e tubulares. Portanto, os pacientes podem apresentar distúrbios das funções glomerulares e tubulares. O comprometimento da função renal é considerado uma das principais causas de morte na DF (German, 2010). A albuminúria aparece entre a segunda e a terceira década de vida, contribuindo

para a progressão da doença renal. No entanto, estudos têm sugerido que a podocitúria antecede a albuminúria (Trimarchi e cols., 2015). Fall e cols. (2016) demonstraram que doentes com DF com excreção urinária normal de albumina e outras proteínas possuem duas vezes mais perda de podócitos urinários em comparação com indivíduos saudáveis.

A insuficiência renal crônica adiantada com necessidade de diálise ocorre entre a quarta e a quinta décadas de vida, quando os pacientes não são tratados com a terapia de reposição enzimática (TRE) (Abensur e Reis, 2016).

Além dos sintomas clínicos, o diagnóstico definitivo da DF é realizado através da determinação da atividade da enzima α -galactosidase A, que está reduzida nos leucócitos dos pacientes acometidos. Porém, desde a década passada, o diagnóstico através de marcadores moleculares tem aumentado a acurácia do mesmo (Desnick e cols., 2001).

Devido ao modo de herança ligada ao X, o sequenciamento genético no sexo feminino é a única ferramenta válida para diagnosticar a DF, uma vez que a atividade enzimática dos pacientes pode estar no intervalo normal em um número elevado de heterozigotos femininos, mesmo naqueles severamente afetados. Estima-se que dois terços de todos os pacientes com DF sejam do sexo feminino (Neumann e cols., 2014).

Com o advento da espectrometria de massa, Kruger e cols. (2010) desenvolveram e validaram um protocolo para a quantificação de GB3 que demonstrou ser útil para o diagnóstico e o monitoramento de pacientes com DF. A concentração plasmática média de GB3 em amostras de pacientes do sexo masculino foi de 6,6 mg/L com valores que variaram de 2,9 a 13,3 mg/L. A

mediana para amostras de heterozigotos do sexo feminino foi de 4,1 mg/L, com concentrações que variaram de 2,4 a 5,7 mg/L (Kruger e cols., 2010).

A dosagem dos substratos GB3 e Lyso-Gb3 no plasma, urina e tecidos também podem ajudar no diagnóstico. Porém, estas são mais úteis na estimativa da resposta dos pacientes frente ao tratamento (Abensur e Reis, 2016). Lukas e cols. (2013) demonstraram que o aumento dos níveis de Lyso-Gb3 é superior ao aumento de GB3 em doentes com DF. Embora o lyso-Gb3 possa ser usado como um biomarcador para a doença, ele é apenas confiável para o monitoramento da mesma, pois não foi descrita correlação absoluta entre a natureza da mutação e os níveis de lyso-Gb3 (Lukas e cols., 2013). Outra dosagem urinária que tem sido amplamente estudada é a de podócitos em pacientes com fenótipo clássico. Estudos recentes demonstraram que a quantificação da podocitúria pode ser bastante sensível no monitoramento e na predição de doença renal, mesmo antes da observação de outros achados urinários (Trimarchi e cols., 2015; Pereira e cols., 2016; Fall e cols., 2016).

A TRE é o primeiro tratamento específico para a DF. Existem duas formas de α -galactosidase A para TRE aprovadas atualmente pelas autoridades reguladoras, sendo estas: a agalsidase alfa (Replagal®; Shire Human Genetic Therapies,) e a agalsidase beta (Fabrazyme®, Genzyme Corporation), que são produzidas por expressão do gene da α -galactosidase A em fibroblastos humanos modificados e em células de ovário de hamster chinês (CHO), respectivamente (Schiffmann e Ries, 2016). Ambas são administradas em quantidade corrigida pela massa corporal do paciente e as doses recomendadas são de, respectivamente, 0,2 e 1,0 mg/Kg. As mesmas são administradas a cada duas semanas (Eng e cols., 2001).

A TRE com a enzima recombinante é disponível para a DF, sendo que muitos pacientes foram tratados com sucesso quando a terapia foi iniciada nos estágios iniciais da doença. No entanto, existem relatos de que a clivagem do GB3 e a melhoria da histologia após a administração de uma enzima recombinante diferem de acordo com o tipo de célula (Thurberg e cols., 2002; Tondel e cols., 2013; Beck e cols., 2015).

Os fatores que podem estar associados à falha da resposta terapêutica da TRE ainda não são bem elucidados. Porém, citou-se a produção de anticorpos neutralizantes contra a enzima recombinante. Os anticorpos foram observados com maior frequência nos doentes tratados com a agalsidase beta na dose de 1,0 mg/kg do que naqueles que receberam agalsidase alfa na dose de 0,2 mg/kg, possivelmente, devido ao fato da primeira ser obtida a partir da expressão gênica de células de ovário de hamster, enquanto que a última provém da cultura de fibroblastos humanos (Vedder e cols., 2008).

Além da TRE, o tratamento com chaperonas farmacológicas tem demonstrado ser eficaz para pacientes que possuem mutações específicas que resultam em alterações conformacionais. As chaperonas específicas podem ser administradas oralmente e atuam como um modelo de dobragem no retículo endoplasmático. O uso da chaperona *1-deoxygalactojirimycin hydrochloride* já demonstrou aumento da atividade residual da α -galactosidase A e redução dos níveis urinários do GB3 (Germain e Fan, 2009).

1.3. A cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa

A cadeia transportadora de elétrons (CTE) é constituída pelos complexos I, II, III e IV, sendo eles, respectivamente, NADH desidrogenase, succinato desidrogenase, citocromo b-c₁ e citocromo oxidase. Além desses complexos, a CTE apresenta a coenzima Q e o citocromo c como elementos móveis entre os complexos (Nelson e Cox, 2014) (Figura 2).

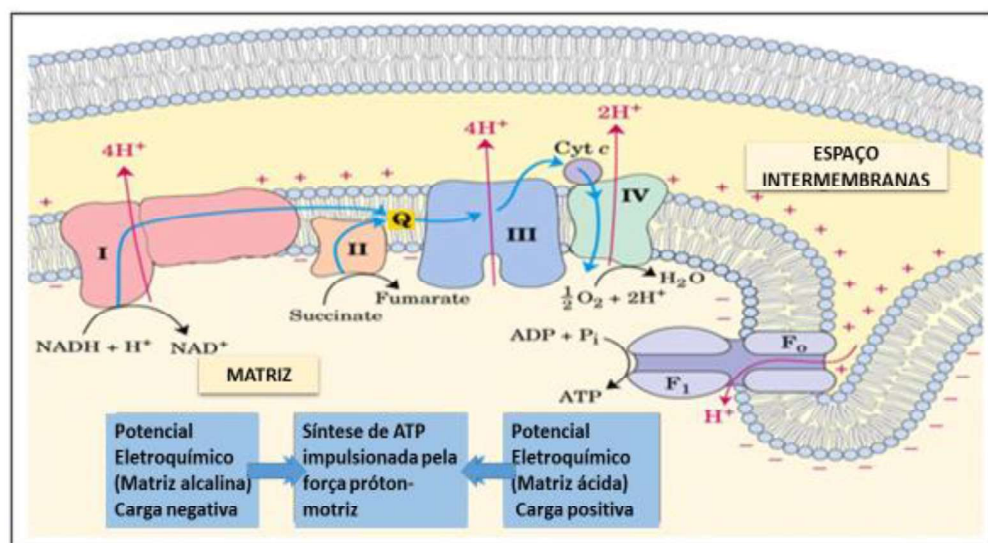


Figura 2. Fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia transportadora de elétrons (adaptado de Nelson e Cox, 2014).

1.3.1. Complexo I (NADH-coenzima Q-oxidoreductase)

O complexo I, que transfere elétrons a partir do NADH para a coenzima Q (CoQ), é o maior complexo proteico na membrana mitocondrial interna. Ele contém flavina mononucleotídeo (FMN) e centros ferro-enxofre (Fe-S). A FMN recebe elétrons do NADH e é capaz de transferi-los aos centros Fe-S. O NADH é reoxidado a NAD⁺, o qual retorna para o ciclo de Krebs ou a outras rotas metabólicas para receber elétrons (Lieberman e Marks, 2008).

1.3.2. Complexo II (succinato-coenzima Q-oxidoreductase)

O complexo II, que contém a enzima do ciclo do ácido cítrico succinato-desidrogenase (SDH) e três outras pequenas subunidades hidrofóbicas, transfere elétrons do succinato à CoQ (Voet e cols., 2014). Ligado à SDH, o FAD recebe 2 elétrons e é reduzido a FADH₂. Este transfere seus elétrons para os centros Fe-S da enzima, que então doa esses elétrons para a CoQ (Lieberman e Marks, 2008).

Os complexos I e II não operam em série, mas ambos transferem seus elétrons à CoQ, que se difunde na membrana lipídica entre os complexos respiratórios, servindo, portanto, como um ponto de captação de elétrons (Voet e cols., 2014).

1.3.3. Complexo III (Coenzima Q-citocromo c-oxidoreductase)

Também conhecido como citocromo bc₁, o complexo III transfere elétrons da CoQ reduzida para o citocromo c. Este complexo contém dois citocromos tipo b, um citocromo c₁ e um centro 2Fe-2S (Voet e cols., 2014).

O transporte dos elétrons ocorre entre os citocromos no sentido do citocromo de menor potencial redox para o de maior. Os átomos de ferro nos citocromos encontram-se no estado de Fe³⁺. Quando este recebe um elétron, ele é reduzido para Fe²⁺ e, ao passar este elétron para o próximo componente da cadeia (o citocromo c), o ferro é reoxidado a Fe³⁺ (Lieberman e Marks, 2008).

O complexo de membrana b-c₁, formado pelos citocromos b e c₁, transfere os elétrons para o citocromo c, que é uma pequena proteína localizada na face

externa da membrana mitocondrial interna e, assim como a CoQ, é um transportador móvel de elétrons que os transfere do complexo b-c₁ para a citocromo oxidase (complexo IV) (Lieberman e Marks, 2008).

1.3.4. Complexo IV (Citocromo c-oxidase)

A citocromo oxidase (COX), último complexo da cadeia respiratória, transfere elétrons do citocromo c para o O₂. Da mesma forma que os demais complexos respiratórios, a COX é parte integrante da membrana mitocondrial interna e contém os citocromos a e a₃, além de dois íons de Cu²⁺.

Os íons cobre são aceptores intermediários e estão posicionados entre os dois citocromos do tipo a. Os citocromos a e a₃ formam juntos o complexo citocromo-oxidase, que é posteriormente oxidado pelo oxigênio, sendo este reduzido à água (Lieberman e Marks, 2008).

1.3.5. Transferência sequencial de elétrons

Um resumo geral das reações de oxidação e redução da cadeia transportadora de elétrons é que o NADH transfere os elétrons à CoQ (complexo I), assim como o FADH₂ (Complexo II). Essa primeira etapa de transporte de elétrons é uma das três reações responsáveis pelo bombeamento de prótons para a matriz intermembranas. A CoQ é móvel; isso significa que pode se mover na membrana e transferir os elétrons recebidos do NADH e FADH₂ para o complexo III. O fluxo de elétrons é cíclico e envolve duas vezes a CoQ, sendo essa uma quinona, que pode existir em três formas. A forma semiquinona, que

é intermediária entre a reduzida e a oxidada, é de crucial importância nessa parte da rota, que é chamada de ciclo Q (Campbell, 2001).

O ciclo Q proporciona um mecanismo para os elétrons serem transferidos um a um, no tempo certo, da coenzima Q ao citocromo c_1 (complexo III). Como parte da etapa final, o citocromo c , que está fracamente associado à membrana, transfere os elétrons do complexo III para o IV. Por fim, os citocromos a e a_3 , que juntos formam o complexo IV, recebem os elétrons do citocromo c e os transferem para o O_2 (Campbell, 2001).

No processo de transporte de elétrons, as proteínas da cadeia transportadora captam prótons da matriz em reações redox e os liberam no espaço intermembranas, criando um gradiente de prótons (Campbell, 2001). Este conduz à produção de ATP, que ocorre quando eles retornam para o interior da matriz (Lieberman e Marks, 2008). A maneira pela qual o gradiente de prótons leva à produção de ATP depende da presença de canais de íons através da membrana mitocondrial interna. Estes fazem parte da ATP-sintase (Campbell, 2001).

O fluxo de elétrons na CTE deve ser sequencial a partir do NADH ou do $FADH_2$ até o O_2 para que ocorra a produção de ATP. O bloqueio em um ou mais pontos da CTE impede ou diminui a formação de ATP. Isto porque o bombeamento de prótons está associado ao movimento dos elétrons de um carreador para o seguinte, e assim por diante. Caso este movimento esteja bloqueado em qualquer ponto, não ocorre o bombeamento de prótons e a formação do potencial eletroquímico, com conseqüente falta de produção de ATP (Nelson e Cox, 2014).

O bloqueio da transferência de elétrons em qualquer um dos complexos pode apresentar consequências danosas, pois compromete a formação de ATP. A diminuição dos níveis de ATP intracelular pode desencadear eventos que levam a danos celulares irreversíveis, incluindo morte celular (Lieberman e Marks, 2008). Assim, como o bloqueio em qualquer um dos pontos da CTE pode trazer prejuízos, o aumento da atividade desta também traz consequências importantes, uma vez que o aumento do fluxo eletrônico da mesma provoca uma elevação no gradiente de prótons. Assim, o aumento desta força está mecanicamente ligado à produção de mais espécies reativas (ER) (Korshunov e cols., 1997; Starkov e Fiskum, 2003).

1.4. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são termos coletivos que incluem radicais de oxigênio, de nitrogênio e certos agentes oxidantes que são facilmente convertidos em radicais. Elas podem ser formadas a partir de substâncias endógenas e exógenas. Essas desempenham um duplo papel nos sistemas biológicos, uma vez que podem ser prejudiciais ou benéficas para os sistemas vivos. Elas cumprem funções biológicas importantes, como reações dependentes de oxigênio em processos metabólicos (Turrens, 1997; Cherry e Piantadosi, 2015).

Pequenas quantidades de ERO são geradas no curso normal da fosforilação oxidativa. Em condições normais, o complexo I é a principal enzima oxidante do NADH, e é também um importante local de produção de ERO, juntamente com o complexo III. Tanto a produção de ERO quanto de ERN estão

aumentadas em situações em que ocorre dano mitocondrial (Poyton e cols., 2009; Cherry e Piantadosi, 2015).

A produção do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ocorre principalmente no interior da mitocôndria de uma célula. Durante a transdução de energia, um reduzido número de elétrons "vaza" prematuramente, formando o radical livre superóxido, o qual tem sido implicado na fisiopatologia de uma variedade de doenças (Valko e cols., 2007). O radical de oxigênio mais reativo é o hidroxila (OH^{\cdot}), que reage rápido e de modo inespecífico, podendo atacar e lesar qualquer biomolécula. O radical hidroxila é formado pela reação de Fenton, onde o H_2O_2 reage com o Fe^{2+} (Figura 3). O H_2O_2 formado em praticamente todos os tecidos é fracamente reativo. Porém, sua importância deve-se à capacidade de formar o radical hidroxila (Halliwell, 2006).

O termo ERN engloba o radical óxido nítrico (NO), o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) e os íons nitrosônio (NO^+) e nitroxila (NO^-) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

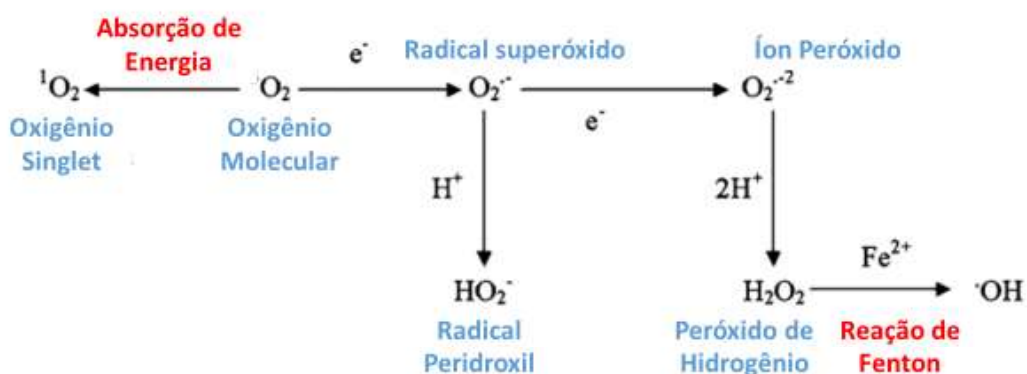


Figura 3. Estruturas eletrônicas das espécies reativas de oxigênio (ERO) mais comuns. Cada estrutura é fornecida com seu nome e fórmula química (adaptado de Bhattacharya, 2015).

1.5. Sistema de defesa antioxidante

Um antioxidante pode ser definido como "qualquer substância que atrasa, impede ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo". Antioxidantes podem ser moléculas complexas, como as superóxido dismutases (SOD), as catalases (CAT) e as peroxidases (GSH-Px), ou moléculas mais simples, como o ácido úrico e a glutathiona (Gutteridge e Halliwell, 2010) (Figura 4).

A SOD é uma enzima que catalisa a reação de dismutação de íons superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em oxigênio molecular (O_2) e em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Existem três tipos de SOD de acordo com os metais localizados no sítio ativo: as que contém cobre e zinco (CuZn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD). A CuZn-SOD é encontrada nos peroxissomas, a Mn-SOD na matriz mitocondrial e a Fe-SOD em algas, bactérias e plantas (Krishnamurthy e Wadhvani, 2012).

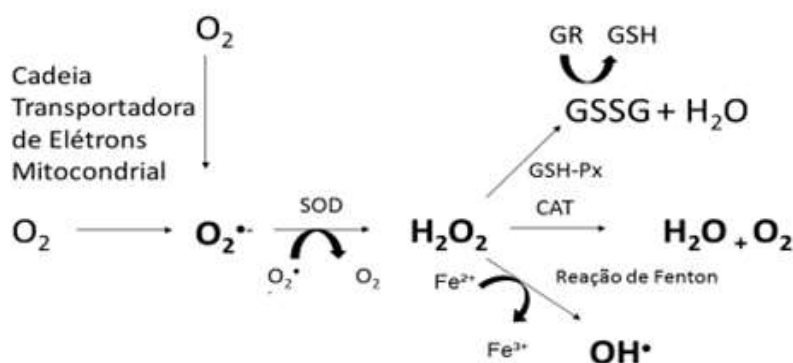


Figura 4. Geração de espécies reativas de oxigênio e as correspondentes defesas antioxidantes: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\cdot}), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona redutase (GR), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (adaptado de Wajner e cols., 2004).

A CAT é outra enzima antioxidante que catalisa a decomposição de H_2O_2 em duas moléculas de água e uma de oxigênio. Esta complementa a atividade da SOD e está presente em quase todas as células animais (Krishnamurthy e Wadhvani, 2012) (Figura 4).

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) é semelhante à catalase e representa uma família de enzimas que decompõem o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Fisiologicamente, a GSH-Px atua acoplada à enzima glutathiona redutase (GR) que, por sua vez, catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG) usando NADPH como coenzima (Krishnamurthy e Wadhvani, 2012).

1.6. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre em sistemas biológicos quando há um excesso de produção de ERO/ERN de um lado e/ou uma deficiência de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, do outro, gerando um aumento do dano oxidativo. Em outras palavras, o estresse oxidativo decorre das reações metabólicas que utilizam oxigênio e representa uma perturbação do estado de equilíbrio de reações pró-oxidantes/antioxidantes em organismos vivos (Valko e cols., 2007).

Os tecido humanos, em geral, são suscetíveis ao dano oxidativo. No entanto, o cérebro parece ser especialmente sensível a este tipo de lesão. Uma das explicações para isto seria o alto consumo de oxigênio e ATP apresentado por este tecido. Além disso, as membranas neuronais apresentam uma grande quantidade de lipídios poli-insaturados, sensíveis à lipoperoxidação. Ademais, o

tecido cerebral apresenta um baixo nível de defesas antioxidantes, o que o torna ainda mais sensível à ação das ER (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Existem evidências crescentes sugerindo que as ER desempenham um papel importante na patogênese de muitas doenças, como diabetes, neoplasias, distúrbios neurológicos e isquemia, bem como no envelhecimento (Valko e cols., 2007).

Recentemente demonstrou-se que o estresse oxidativo atua em vários EIM, sugerindo que ele possa estar envolvido no dano neurológico observado nessas doenças. Contudo, este mecanismo ainda não está totalmente compreendido. Entretanto, é possível que o acúmulo de metabólitos tóxicos induza a formação excessiva de radicais livres (Fontella e cols., 2000; Vargas e cols., 2004; Barschak, 2008; Biancini, 2012).

Há algumas evidências na literatura que demonstram que o estresse oxidativo pode estar envolvido na fisiopatologia da DF. Shen e cols. (2008) demonstraram que o excesso de GB3 intracelular aumenta a produção ERO e induz estresse oxidativo. Biancini e cols. (2012), em estudo com pacientes portadores da DF em tratamento com TRE, encontraram uma correlação positiva entre a concentração de GB3 e os níveis de MDA e de grupos carbonila, o que indica que o GB3 possa ser um indutor de peroxidação lipídica e dano às proteínas.

O dano oxidativo aos componentes celulares e mitocondriais, particularmente aos complexos CTE, leva a mais disfunção e produção de ERO/ERN (Brown e Borutaite, 2004). Lesões induzidas pelas ERO/ERN podem levar a uma extensa necrose celular e liberação de conteúdos celulares,

incluindo fragmentos mitocondriais, que agem como um estímulo inflamatório (Vanlangenakker e cols., 2012; Sangiuliano e cols., 2014).

As DLD são doenças multissistêmicas caracterizadas pelo comprometimento neurológico e vascular dos pacientes. No entanto, os mecanismos envolvidos nessas alterações não são ainda completamente compreendidos. Sendo assim, é possível que os metabólitos acumulados nessas doenças possam estar comprometendo o funcionamento mitocondrial e o suprimento energético das células, contribuindo para o desequilíbrio redox e a patogênese das doenças.

1.7. Referências Bibliográficas:

Abensur H, Reis MA. Acometimento renal na doença de Fabry. *J Bras Nefrol.* 2016;38(2):245-254.

Barschak, AG. Investigação do estresse oxidativo em pacientes tratados e não tratados com doença do xarope do bordo. Tese de doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica. Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

Beck M, Hughes D, Kampmann C, Larroque S, Mehta, A., Pintos-Morell, *et al.* Long-term effectiveness of agalsidase alfa enzyme replacement in Fabry disease: A Fabry Outcome Survey analysis *Mol. Genet. Metab. Rep.* 2015;3:21-27.

Bhattacharya S. Reactive oxygen species and cellular defence system. *Free Radicals in Humans Health and Disease. Pharmacol on line.* 2015;(16):17-29.

Biancini GB, Vanzin CS, Rodrigues DB, Deon M, Ribas GS, Barshack AG, *et al.* Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2012 Feb;1822(2):226-232.

Biancini GB. Investigação de parâmetros de estresse oxidativo e inflamação em pacientes com doença de Fabry submetidos à terapia de reposição enzimática: correlações com globotriaosilceramida. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica. Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

Biffi A. Gene therapy for lysosomal storage disorders: a good start, *Hum. Mol. Genet.* 2016;25:65-75.

Brown GC, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1658: 44–49.

Campbell MK. *Bioquímica*. 3ªEd. Porto Alegre: Artmed, 2001.

Cherry AD, Piantadosi CA. Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Its Intersection with Inflammatory Responses. *Antioxid. Redox Signal*. 2015;22:965-976.

Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Desnick RJ, Hwu WL. Fabry disease: incidence of the common later-onset alpha-galactosidase A IVS4p919G/A mutation in Taiwanese newbornsdsuperiority of DNA-based to enzyme-based newborn screening for common mutations. *Mol Med*. 2012;18:780-4.

Desnick RJ, Lannou YA, Eng CM. α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 8ª edição*, McGraw-Hill Inc., New York. 2001;3733-74.

Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S, *et al*. International Collaborative Fabry Disease Study Group. *N Engl J Med*. 2001 Jul;345(1):9-16.

Fall B, Scott CR, Mauer M, Shankland S, Pippin J, Jefferson JA, *et al* . Urinary Podocyte Loss Is Increased in Patients with Fabry Disease and Correlates with Clinical Severity of Fabry Nephropathy. *Plos One*. 2016;12.

Fontella FU, Pulrolnik V, Gasse E, Wanmacher CMD, Klein AB, Wajner M, *et al*. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neurochemistry*. 2000;11:541-44.

Garman SC, Garboczi DN. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Biol*. 2004;337(2):319–335.

Germain DP. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2010 Nov;22:5-30.

Germain DP, Fan JQ. Pharmacological chaperone therapy by active-site-specific chaperones in Fabry disease: in vitro and preclinical studies. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2009;47(1):111-17.

Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2010;393:561–64.

Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology.* 2006;141(2):312-22.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press, 2007.

Husny E, Souto A, Caldato F, Coelho M. Erros Inatos do Metabolismo: Revisão de Literatura. *Revista Paraense de Medicina.* 2006;20(2):40-5.

Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 1997 Oct;416(1):15-8.

Krishnamurthy P, Wadhwani. A. Antioxidant Enzymes and Human Health, chapter 1, In: El-Missiry, M.A. (Ed.), *Antioxidant Enzyme- InTech Science, Technology & Medicine, Vienna, Austria.* 2012:4–18.

Kuech EM, Brogden G, Naim HY. Alterations in membrane trafficking and pathophysiological implications in lysosomal storage disorders, *Biochimie.* 2016 Nov;130:152-162.

Kruger R, Bruns K, Grunhage S, Rossmann H, Reinke J, Beck M, Lackner KJ. Determination of globotriaosylceramide in plasma and urine by mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(2):189-198.

Lieberman M, Marks AD, *Mark's Basic Medical Biochemistry, a Clinical Approach*. 3^a Ed. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

Linhart A, Kampmann C, Zamorano JL, Sunder-Plassman G, Beck M, Mehta A, et al. Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease: results from the international Fabry outcome survey. *Eur Heart J*. 2007;28(10):1228-1235.

Lukas J, Giese AK, Markoff A, Grittner U, Kolodny E, Mascher H, et al. Functional characterisation of alpha-galactosidase mutations as a basis for a new classification system in Fabry disease, *PLoS Genet*. 2013 Aug;9(8):1003632

Meikle PJ, Hopwood JJ. Lysosomal Storage disorders: emerging therapeutic Options require early diagnosis. *Eur J Pediatr*. 2003 Dec;162(1):34-37.

Nelson DL, Cox MM, Lehninger – Principles of Biochemistry. 6^a Ed. New York, W.H. Freeman, 2014.

Neumann A, Brogden G, Jerjomiceva, Brodessa S, Naim HY, Von Kockritz-Blickwede M. Lipid alterations in human blood-derived neutrophils lead to formation of neutrophil extracellular traps, *Eur. J. Cell Biol*. 2014;93(8-9):347-354.

Pereira EM, Silva AS, Labilloy A, Monte Neto JT, Monte S. Podocyturia in Fabry disease. *J Bras Nefrol*. 2016 Mar;38(1):49-53.

Platt FM, Boland B, Van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol*. 2012;199(5):723–734.

Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(7):332-340.

Sangiuliano B, Perez NM, Moreira DF, Belizario JE. Cell death-associated molecular-pattern molecules: inflammatory signaling and control. *Mediators Inflamm*. 2014;821043.

Schiffmann R, Ries M. Fabry Disease: A Disorder of Childhood Onset. *Pediatric Neurology*. 2016 Nov;64:10-20.

Shen JS, More DF, Quirk JM, Shayman JA, Schiffmann R, Kaniski CR. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2008 Nov;95(3):163-68.

Sinclair LA. A new look at the inborn errors of metabolism. *Ann Clin Biochem*. 1982 Jul;19(4):314-321.

Starkov AA, Fiskum G. Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J Neurochem*. 2003 Sep;86(5):1101-1107.

Thurberg BL, Rennke H, Colvin RB, Dikman S, Gordon RE, Collins AB, *et al*. Globotriaosylceramide accumulation in the Fabry kidney is cleared from multiple cell types after enzyme replacement therapy *Kidney Int*. 2002 Dec;62(6):1933–1946.

Tøndel C, Bostad L, Larsen KK, Hirth A, Vikse BE, Houge G, *et al*. Agalsidase benefits renal histology in young patients with Fabry disease. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Jan;24(1):137-148.

Trimarchi H, Canzonieri R, Muryan A, Schiel A, Araoz A, Forrester M. Copious Podocyturia without Proteinuria and with Normal Renal Function in a Young Adult with Fabry Disease. *Case Rep Nephrol*. 2015 May;2015:257628.

Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep*. 1997 Feb;17(1):3-8.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.

Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ.* 2012 Jan;19(1):75-86.

Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR, Goulart L, Chiochetta M, Coelho D, *et al.* Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Jan 20;1688(1):26-32.

Vedder AC, Breunig F, Donker-Koopman WE, Mills K, Young E, Winchester B, *et al.* Treatment of Fabry disease with different dosing regimens of agalsidase: effects on antibody formation and GL-3. *Mol Genet Metab.* 2008 Jul;94(3):319-325.

Verity C, Winstone AM, Stellitano L, Will R, Nicoll A. The epidemiology of progressive intellectual and neurological deterioration in childhood. *Arch Dis Child.* 2010;95(5):361–364.

Voet D, Voet J, Pratt CW. *Fundamentos de bioquímica : a vida em nível molecular.* 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Wajner M, Latini A, Wyse ATS, Dutra-Filho CS. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: Insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis.* 2004;27(4):427-448.

Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U. Fabry Registry. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab.* 2008 Feb;93(2):112-128.

2. Objetivos:

2.1 Gerais

Avaliar o efeito do metabólito acumulado na DF globotriaosilceramida (GB3) sobre os complexos da CTE e parâmetros redox em córtex cerebral e rins de ratos Wistar.

2.2 Específicos

- a) Determinar os efeitos *in vitro* do GB3 sobre a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons, em homogeneizados de córtex cerebral e rins de ratos Wistar;
- b) Determinar os efeitos *in vitro* do GB3, sobre a formação de ER em homogeneizados de córtex cerebral e rins de ratos Wistar;
- c) Determinar os efeitos *in vitro* do GB3, sobre a lipoperoxidação em homogeneizados de córtex cerebral e rins de ratos Wistar.
- d) Determinar os efeitos *in vitro* do GB3 sobre a atividade das enzimas antioxidantes, superóxido-dismutase e catalase, em homogeneizados de córtex cerebral e rins de ratos Wistar;

3. Artigo científico redigido em inglês

Enviado para publicação na Revista Toxicology *in vitro*

***In vitro* effect of globotriaosylceramide on electron transport chain complexes and redox parameters**

Rafaela Martins Alvariz^{ab}, Isabel Taís da Silva Moreira^b, Gabriela Kampf Cury^b,
Carmen Regla Vargas^{c,d,e}, Alethéa Gatto Barschak^a.

^a Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Gerência de Laboratórios, Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:Bioquímica (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^e Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract:

Fabry disease (FD) is a X-linked inherited disease and occurs due to mutations in *GLA* gene that encodes the α -galactosidase enzyme. As consequence, there is accumulation of enzyme substrates, being the globotriaosylceramide (GB3) the main accumulated metabolite. FD is a multisystemic disease, caused by storage of GB3 in vascular endothelium, with

significant renal, cardiac and vascular involvement (myocardial hypertrophy, arrhythmias, renal damage). The aim of this work was to evaluate the *in vitro* effect of GB3 on electron transport chain complexes (ETC) and redox parameters. Biochemical biomarkers were determined in homogenates of cerebral cortex and kidneys of Wistar rats in presence or absence of GB3 at concentrations of 3, 6, 9 and 12 mg/L. We found that GB3 decreased catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes activities and increased malondialdehyde (MDA) content in homogenates of cerebral cortex. We also observed an increase on ETC complexes II and IV activities, as well as an increased production of reactive species and increased SOD activity in kidney homogenate in presence of GB3. The results obtained in our work suggest that GB3 interferes in ETC complexes activity and in cellular redox state, indicating that these alterations may be involved in the pathophysiology of FD, mainly in renal and cerebral manifestations.

Abbreviations:

ATP, Adenosine 5'-triphosphate; CAT, catalase; DCF, 2,7-dichlorofluorescein; ECT, Electron transport chain; FD, Fabry disease; GB3, globotriaosylceramide; α -Gal A, α -galactosidase A; H₂O₂, hydrogen peroxide; MDA, malondialdehyde; RNS: Reactive nitrogen species; ROS, Reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid-reactive species.

Keywords:

Fabry disease, globotriaosylceramide, GB3, electron transport chain, oxidative stress and reactive species.

1. Introduction

Fabry disease (FD) is an X-linked genetic disorder caused by a deficiency of the lysosomal enzyme α -galactosidase A. This defect causes the accumulation of glycosphingolipids, particularly the globotriaosylceramide (GB3), inside heart, kidney, brain, skin, eyes and vascular tissues (Desnick *et al.*, 2001). Clinical manifestations include acroparesthesia, angiokeratomas, cornea verticillata, myocardial hypertrophy, arrhythmias, renal impairment and gastrointestinal disorders (Germain, 2010).

In addition to clinical symptoms, definitive diagnosis of FD has been made through determination of α -galactosidase A enzymatic activity and through plasma quantification of GB3 levels (Desnick *et al.*, 2001). Kruger and collaborators, in a study involving 209 FD patients, found plasma concentrations of GB3 ranging from 2.9-13.3 mg/L (Kruger *et al.*, 2010).

Some evidence demonstrate that oxidative stress may be involved in pathophysiology of FD. Shen and collaborators, have shown that the excess of intracellular GB3 increases the production of reactive oxygen species (ROS) and induces oxidative stress (Shen *et al.*, 2008). Biancini and collaborators, in a study involving FD patients under treatment with enzyme replacement therapy, found a positive correlation between plasma GB3 concentrations and MDA levels and carbonyl groups, indicating that GB3 could be an inducer of lipid peroxidation and protein damage (Biancini *et al.*, 2012).

Electron transport chain (ETC) consists of complexes I, II, III and IV being, respectively, NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase, cytochrome b-c₁ and cytochrome oxidase. In addition to these complexes, ETC

presents coenzyme Q and cytochrome c as mobile elements among the complexes (Nelson and Cox, 2014). In the process of electron transport, the complexes take protons from the matrix and release them inside intermembrane space, creating a proton gradient. This proton gradient leads to ATP production, which occurs when they return to interior of the matrix. Blocking electron transfer or increasing activity in any of the complexes may have pathological consequences, such as exacerbated increase in proton motive force or a decrease in intracellular ATP levels (Figueira *et al.*, 2013). Interference at any point in the ETC can trigger events that lead to irreversible cell damage and even cell death (Lieberman and Marks, 2008).

It has not been yet fully understood how the cellular routes affected in lysosomal disease are interconnected, as well as how they affect cells viability in different tissues. In this context, the present study aimed to evaluate the *in vitro* effect of the main metabolite accumulated in FD, the GB3 on ETC complexes and redox parameter (reactive species formation, antioxidant enzymes activity and lipoperoxidation) in cerebral cortex and kidney of Wistar rats.

2. Methods and Materials

2.1. Animals

Thirty days old male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) maintained at controlled environment and temperature (22 ± 1 ° C), water and feed *ad libitum*, and 12h light-dark cycles from UFCSPA's Central Animal House were used. All animal procedures were approved by the ethics committee of animal use of the UFCSPA under protocol number 107/13.

2.2. Tissue preparation protocol

Euthanasia of animals was performed through decapitation to preserve brain quickly dissected on ice.

2.3. Tissues homogenate incubation with GB3

For ETC complexes and oxidative stress parameters determination, cerebral cortex and kidney were homogenized (1:20, v/v) in TRIS buffer, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 600g for 10 minutes to remove cell debris. Aliquots of the supernatant were made and these were kept frozen (-80°C) until determinations. The samples underwent to three freeze-thaw cycles for the disruption of mitochondrial membranes and exposure of the catalytic sites of ETC enzymes. The parameters were determined in homogenate preincubated for 60 minutes at 37 ° C in the absence (control group) or presence (test group) of GB3 at concentrations of 3, 6, 9 and 12 mg / L, according to the plasma concentration in a study of Kruger *et al.* (2010).

2.4. Determination of the I-IV complexes of the ETC

The activities of the complexes I, II, III e IV were determined according to Spinazzi *et al.* (2012). The results were expressed as nmol/min mg of proteins.

2.5. Protein determination

Proteins were determined by the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as standard.

2.6. Redox state

2.6.1. Superoxido-dismutase (SOD) activity

SOD activity was evaluated by quantifying the inhibition of superoxide dependent autoxidation of epinephrine, verifying the absorbance of the samples at 480 nm according to Misra and Fridovich (1972). SOD activity was expressed as the amount of enzyme that inhibits the oxidation of epinephrine by 50%, which is equal to 1 unit. The data were expressed as Units/mg protein.

2.6.2. Catalase (CAT) activity

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

2.7. DCF assay

ROS and nitrogen reactive species (RNS) production was determined according to the method described by LeBel *et al.* (1992). Briefly, 20 μ L of the sample were incubated at 37°C, in the dark, for 30 min, with addition of 175 μ L of PBS buffer and 5 μ L of DCF diacetate in a 96-well plate. DCF is cleaved by cellular esterases and form H₂DCF that is oxidized by reactive species which are present in the sample, producing a fluorescent compound, the DCF. DCF oxidation was fluorimetrically measured by using a 480 nm excitation and 520 nm emission wavelength. The protein concentration of the samples were standardized at 1mg/mL.

2.8. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measurement

Reactive species react with membrane lipids causing lipoperoxidation, with consequent formation of malondialdehyde (MDA), which was quantified by the method described by Ohkawa *et al.* (1979). MDA reacts with thiobarbituric acid under heating to form a pink-colored compound measured in a spectrophotometer at 535 nm. The coloration is proportional to the formed malondialdehyde. The results were expressed as nmol TBARS/mg protein.

2.9. Statistical analysis

Data from the experiments were statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test, where the *F* value was significant. Values of $p < 0.05$ were considered significant. For statistical analysis, the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software was used.

3. Results

3.1. ETC

The ETC complexes activity was individually determined in homogenates of cerebral cortex and kidney of Wistar rats pre-incubated with GB3. Complex II activity in kidney was significantly increased in presence of GB3 at concentrations of 3 mg/L ($p = 0.004$) and 9 mg/L ($p = 0.041$). It was also observed an increase on complex IV activity in kidney at GB3 concentrations of 6 mg/L ($p = 0.005$) and 12 mg/L ($p = 0.033$) (Fig. 1). ETC complexes activity in cerebral cortex homogenate was not affected by GB3 exposition (Table 1).

3.2. Redox state

DCF assay was performed to determine the production of reactive species. The results showed a significant increase of reactive species compared to control group, at concentrations of 3 mg/L ($p = 0.042$), 6 mg/L ($p < 0.001$), 9 mg/L ($p < 0.001$) and 12 mg/L ($p < 0.001$) of GB3 in kidney homogenate (Fig. 2b). The production of reactive species in cerebral cortex (Fig. 2a) homogenate was not altered by GB3 exposition.

It was demonstrated a significant decrease on CAT activity in the homogenate of cerebral cortex at concentrations of 3 mg/L ($p < 0.001$) (Fig. 3a) and SOD activity at 6 mg/L ($p < 0.001$), 9 mg/L ($p < 0.001$) and 12 mg/L ($p < 0.001$) (Fig. 4a).

In the kidney homogenate there was an increase on SOD activity at concentrations of 3 mg/L ($p = 0.018$), 6 mg/L ($p < 0.001$), 9 mg/L ($p < 0.001$) and 12 mg/L ($p < 0.001$) (Fig. 4b). However, no changes were observed on CAT activity (Fig. 3b).

To determine oxidative damage to lipids, MDA was measured in homogenates pre-incubated with GB3. The results showed a significant increase on MDA levels compared to control group, at concentrations of 6 mg/L ($p = 0.026$) and 9 mg/L ($p < 0.001$) GB3 in cerebral cortex homogenate (Fig. 5).

No significant changes in MDA levels was observed in kidney homogenate pre-incubated with GB3 when compared to control group (Fig. 5b).

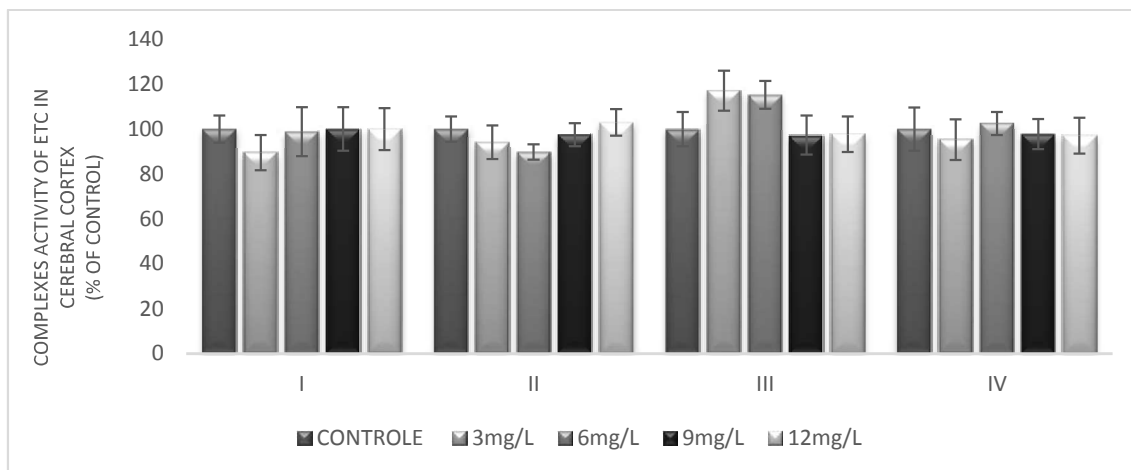


Fig. 1. *In vitro* effect of GB3 on complexes of ETC in cerebral cortex of Wistar rats. Values are means \pm S.D. (n=6).

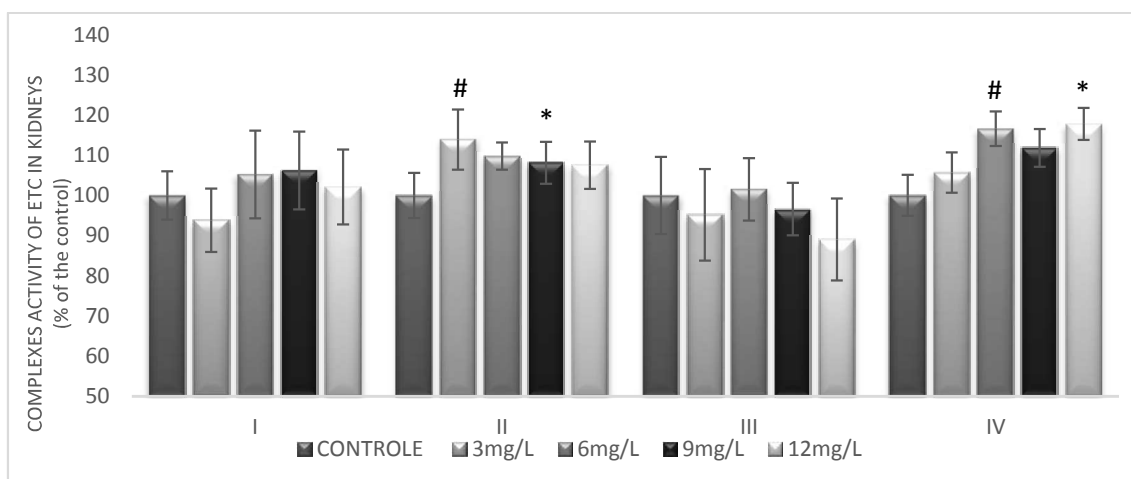


Fig. 2. *In vitro* effect of GB3 on complexes of ETC in kidneys of Wistar rats. Values are means \pm S.D. (n=6). Statistically significant differences from control were determined by ANOVA followed by Tukey test: * $p < 0.05$, # $p < 0.001$.

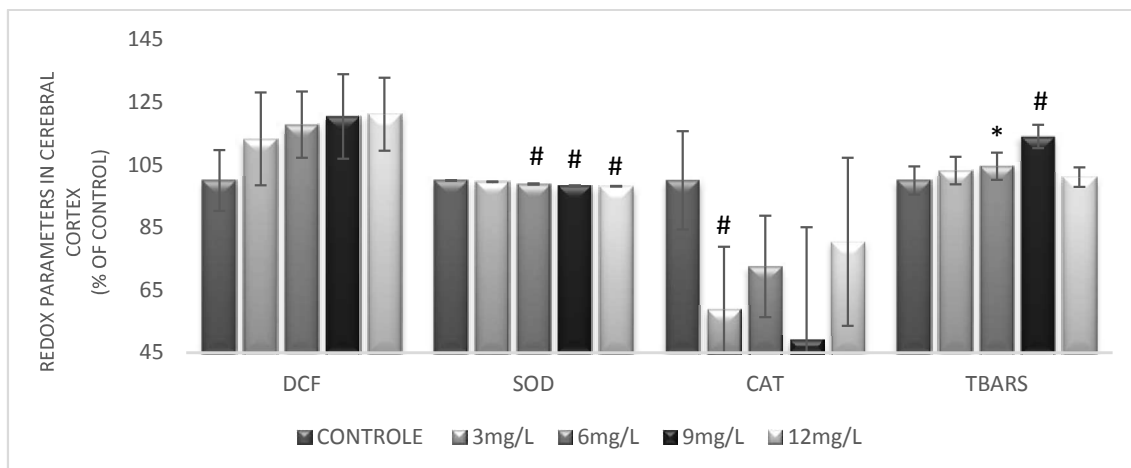


Fig. 3. *In vitro* effect of GB3 on redox parameters in cerebral cortex of Wistar rats. Values are means \pm S.D. (n=6). Statistically significant differences from control were determined by ANOVA followed by Tukey test: * $p < 0.05$, # $p < 0.001$.

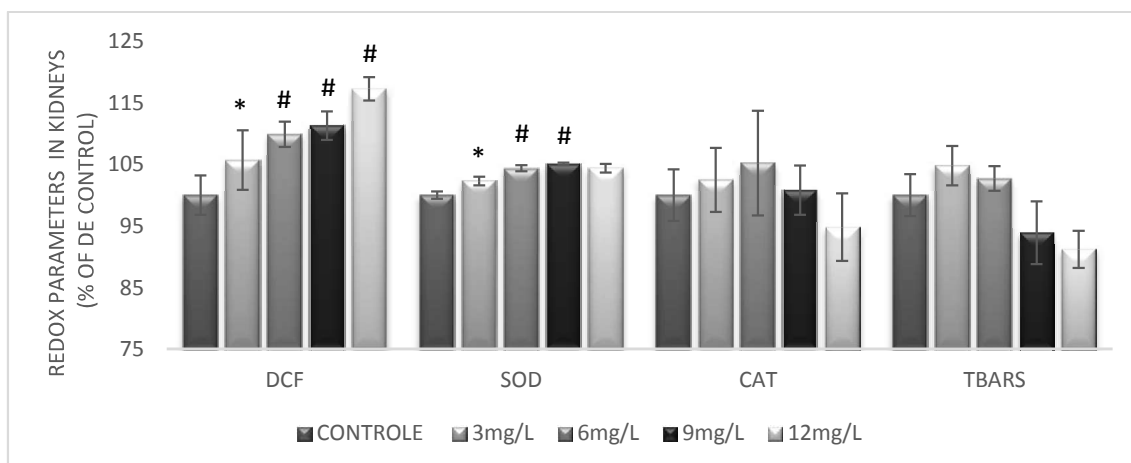


Fig. 4. *In vitro* effect of GB3 on redox parameters in kidney of Wistar rats. Values are means \pm S.D. (n=6). Statistically significant differences from control were determined by ANOVA followed by Tukey test: * $p < 0.05$, # $p < 0.001$.

Table 1: *In vitro* effect of GB3 treatment on complexes I, II, III and IV activity in each animal organ

ORGAN	COMPLEX	TREATMENT	MEAN \pm SD (nmol / min mg of proteins)	<i>p</i>
CORTEX	I	CONTROL	8.62 \pm 0.54	1.00
		3 mg/L	7.74 \pm 0.61	1.00
		6 mg/L	8.49 \pm 0.93	1.00
		9 mg/L	8.58 \pm 0.83	1.00
		12 mg/L	8.56 \pm 0.80	1.00
	II	CONTROL	19.7 \pm 1.1	1.00
		3 mg/L	18.7 \pm 1.4	1.00
		6 mg/L	17.7 \pm 0.59	0.765
		9 mg/L	19.2 \pm 0.99	1.00
		12 mg/L	20.3 \pm 1.2	1.00
	III	CONTROL	135 \pm 10.3	1.00
		3 mg/L	158 \pm 14.1	1.00
		6 mg/L	155 \pm 9.7	0.329
		9 mg/L	131 \pm 11.5	1.00
		12 mg/L	132 \pm 10.5	1.00
	IV	CONTROL	330 \pm 31.6	1.00
		3 mg/L	315 \pm 28.5	1.00
		6 mg/L	338 \pm 17.4	1.00
		9 mg/L	323 \pm 21.5	1.00
		12 mg/L	321 \pm 25.6	1.00
KIDNEY	I	CONTROL	9.68 \pm 1.0	1.00
		3 mg/L	9.05 \pm 0.70	1.00
		6 mg/L	10.2 \pm 1.3	0.385
		9 mg/L	10.3 \pm 1.2	1.00
		12 mg/L	9.88 \pm 1.3	1.00
	II	CONTROL	17.3 \pm 1.0	1.00
		3 mg/L	19.7 \pm 1.0	0.004
		6 mg/L	19.0 \pm 0.54	0.122
		9 mg/L	18.7 \pm 0.74	0.041
		12 mg/L	18.6 \pm 0.84	1.00
	III	CONTROL	170 \pm 16.2	1.00
		3 mg/L	161 \pm 18.4	1.00
		6 mg/L	172 \pm 13.4	1.00
		9 mg/L	164 \pm 10.6	1.00
		12 mg/L	151 \pm 15.4	1.00
	IV	CONTROL	476 \pm 24.4	1.00
		3 mg/L	503 \pm 25.1	1.00
		6 mg/L	555 \pm 23.6	0.005
		9 mg/L	532 \pm 25.2	0.282
		12 mg/L	561 \pm 22.4	0.033

SD: Standard Deviation; 95% Wald Confidence Interval

4. Discussion

There are few studies in literature evaluating oxidative stress in FD (Shen *et al.*, 2008; Biancini, 2016) and no work evaluating ETC activity in this disease. In this sense, our work aims to analyze, *in vitro*, the effect of the main metabolite accumulated in FD, GB3, on ETC protein complexes, production of reactive species, lipoperoxidation and antioxidant enzymes CAT and SOD.

Small amounts of ROS are generated in the normal course of oxidative phosphorylation. The production of superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) occurs mainly inside the mitochondria. During energy transduction, a small number of electrons prematurely "leak", forming superoxide free radical, which has been implicated in the pathophysiology of a variety of diseases (Valko *et al.*, 2007; Poyton *et al.*, 2009; Cherry and Piantadosi, 2015).

Oxidative stress has recently been shown to act on several inborn metabolic errors, suggesting that it may be involved in neurological damage observed in these diseases. However, the mechanism responsible for oxidative stress in inborn errors of metabolism is not yet fully understood. It is possible that the accumulation of toxic metabolites induces excessive formation of reactive species of oxygen and nitrogen (Fontella *et al.*, 2000; Vargas *et al.*, 2004; Barschak, 2008; Biancini, 2012).

Our study demonstrated that GB3 was able to increase the activity of the complexes II and IV of ETC at different concentrations, which may be related to increased reactive species production also observed in kidney homogenates, since increased electron flux through ETC causes a rise in proton gradient and

an increase in this force is strongly linked to a high production of reactive species (Korshunov *et al.*, 1997; Starkov and Fiskum, 2003).

GB3 was able to increase the activity of ETC complex II in rats kidney homogenates without proportionally increasing complex III activity. We can suggest that electrons delivery to coenzyme Q will be fast (because increased activity of complex II), however its oxidation by complex III continues normal. In this context, coenzyme Q will stay longer in the reduced state and this fact may lead to an increase in electrons leakage in Q cycle. We also verified no change in complex II + III activity in the presence of GB3 (data not shown), which reinforces this hypothesis.

On the other hand, no alteration was observed in activity of other enzymatic complexes in kidney homogenate, as well as, no changes in ETC activity was observed in cerebral cortex. It is possible that exposure time of these tissues to GB3 was not sufficient to cause changes, which does not rule out the possibility of finding other results in patient samples or cell culture exposed to GB3 in a chronic way.

In addition to increase in activity of ETC complexes and reactive species formation, an increase in kidney SOD activity was observed. It was also verified, in renal tissue, that GB3 presence caused an increase in formation of reactive species. Together, these results may contribute to explain the pathophysiology of the renal impairment presented by FD patients, being one of the main causes of death in this disease (Germain, 2010). We also verified that the results obtained from cortex homogenates showed a decrease in antioxidant enzymes SOD and CAT activity of a direct inhibition of enzyme by presence of GB3 (Giray *et al.*, 2001; Eraslan *et al.*, 2007; Sadowska-Woda *et al.*, 2010).

High ROS/RNS levels, when not neutralized by cellular antioxidant enzymes, induce redox imbalance that results in oxidative stress. This situation causes oxidative changes in the structure and function of cellular components and can lead to damage to cells, tissues and organs. Among cellular components, the most sensitive to oxidative modifications are membrane phospholipids. These are highly susceptible to oxidation and they are markers of oxidative damage (Niki, 2009; Halliwell, 2011).

In our analyzes, an increase in MDA concentrations in cerebral cortex homogenates was observed, suggesting that GB3 may be stimulating an increase in lipoperoxidation while decreasing antioxidant defenses (SOD and CAT). This result can be explained by the ability of GB3 to trigger an oxidative stress process and lipid peroxidation as a consequence of this imbalance (Biancini *et al.*, 2012). Lipid peroxidation alone is a source of new radicals, as it forms radicals unsaturated fatty acid chains of phospholipids and mitochondrial membrane has a high content of unsaturated fatty acids (Roede and Jones, 2010), a characteristic that, under pathological conditions, makes it susceptible to attacks of reactive species (Figueira *et al.*, 2013).

Human tissues, in general, are susceptible to oxidative damage, however brain appears to be especially sensitive to this type of injury. One of explanations for this would be the high consumption of oxygen and ATP presented by this tissue. In addition, the neuronal membranes present a large amount of lipids, sensitive to lipoperoxidation. Moreover, brain tissue has low level of antioxidant defenses, which makes it even more sensitive to reactive species injury (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Finally, our results together suggested that *in vitro* exposure to GB3 resulted in increased activity of CTE complexes II and IV, which may be related to increase in production of reactive species and increase of antioxidant defenses in renal tissue. Furthermore, the presence of GB3 increased lipoperoxidation and decreased antioxidant defenses in cerebral cortex. Thus, we can conclude that the principal metabolite accumulated in FD, GB3, may contribute in some way to cellular energy and redox imbalance. It is possible that this imbalance may be related to cellular damage observed in disease. However, further studies involving ETC evaluating in fabry patient samples or in cell culture may help to better understand these results.

Funding sources

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105,121-126.
- Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M. Barden, A.T., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Vargas, C.R., 2008. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab Brain Dis.* 23(1),71-80.
- Biancini, G.B., Vanzin, C.S., Rodrigues, D.B., Deon, M., Ribas, G.S., Barshack, A.G., Manfredini, V., Netto, C.B.O., Jardim, L.B., Giugliani, R., Vargas, C.R., 2012. Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta. (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822(2), 226-32.
- Biancini, G.B., Jacques., C.E., Hammerschmidt, T., de Souza, H.M., Donida, B., Deon, M., Vairo, F.P., Lourenço, C.M., Giugliani, R., Vargas, C.R., 2016. Biomolecules damage and redox status abnormalities in Fabry patients before and during enzyme replacement therapy. *Clin Chim Acta* 461(1), 41-6.
- Cherry, A.D., Piantadosi, C.A., 2015. Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Its Intersection with Inflammatory Responses. *Antioxid. Redox Signal.* 22(12), 965-76.
- Desnick, R.J., Lannou, Y.A., Eng, C.M., 2001. α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 8^a edição, McGraw-Hill Inc., New York, 3733-74.
- Eraslan, G., Saygi, S., Essiz, D., Aksoy, A., Gul, H., Macit, E., 2007. Evaluation of aspect of some oxidative stress parameters using vitamin E, proanthocyanidin and Nacetylcysteine against exposure to cyfluthrin in mice. *Pestic Biochem Physiol.* 88, 43–49.
- Figueira, T.R., Barros, M.H., Camargo, A.A., Castilho, R.F., Ferreira, J.C.B., Kowaltowski, A.F., Sluse, F.E., Souza-Pinto, N.C., Vercesi, A.E., 2013.

Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: From Molecular Mechanisms to Human Health. *Antioxid Redox Signal*. 18 (16), 2029-74.

Fontella, F.U., Pulrolnik, V., Gasse, E., Wanmache, C.M.D., Klein, A.B., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., 2000. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport*. 28;11(3):541-4.

Germain, D.P., 2010. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis*. 5:30.

Giray, B., Gurbay, A., Hincal, F., 2001. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicol Lett*. 118, 139–146.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press.

Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants - quo vadis?. *Trends Pharmacol Sci*. 32, 125-30.

Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., Starkov, A.A., 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416, 15–18.

Kruger, R., Bruns, K., Grunhage, S., Rossmann, H., Reinke, J., Beck, M., Lackner, K.J., 2010. Determination of globotriaosylceramide in plasma and urine by mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med*. 48(2), 189-98.

LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C., 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 5(2), 227-31.

Lieberman, M., Marks, A.D., 2008. *Mark's Basic Medical Biochemistry, a Clinical Approach*. 3^a Ed. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins.

- Lima, D.D., Fröhlich, M., Dalmedico, L., Aurélio, J.G.M., Magro, D.D., Pereira, E.M., Wyse, A.T.S., 2016. Galactose alters markers of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in the cerebrum of rats: protective role of antioxidants. *Metab Brain Dis* DOI 10.1007/s11011-016-9915-x.
- Lowry, O.H., 1951. Rosenbrough, N.J., Farr. A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1), 265-275.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 247(10), 3170-5.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2014. *Lehninger – Principles of Biochemistry.* 6^a Ed. New York, W.H. Freeman.
- Niki, E., 2009. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med.* 47(5), 469-84.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95(2), 351-8.
- Poyton, R.O., Ball, K.A., Castello, P.R., 2009. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 20, 332-40.
- Roede, J.R., Jones, D.P., 2010. Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environ Mol Mutagen* 51, 380–390.
- Sadowska-Woda, I., Popowicz, D., Karowicz-Bilin, A., 2010. Bifenthrin-induced oxidative stress in human erythrocytes *in vitro* and protective effect of selected flavonols. *Toxicol in Vitro* 24, 460–464.

- Shen, J.S., More, D.F., Quirk, J.M., Shayman, J.A., Schiffmann, R., Kaniski, C.R., 2008. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Molecular Genetics and Metabolism* 95(3), 163-68.
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., Angelini, C., 2012. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc.* 31, 7(6), 1235-46.
- Starkov, A.A., Fiskum, G., 2003. Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J Neurochem.* 86, 1101–07.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *J Biochem Cell Biol.* 39(1), 44–84.
- Vargas, C.R., Wajner, M., Sirtori, L.R., Goulart, L., Chiochetta, M., Coelho, D., Latini, A., Llesuy, S., Bello-Klein, A., Giugliani, R., Deon, M., Mello, C.F., 2004. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta.* 1688(1), 26-32.

4. Considerações finais

O estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia de vários EIM (Vargas et al., 2004; Barschak, 2008; Biancini *et al.*, 2012). Moore e *cols.* (2001), sugeriram que o estresse oxidativo seria um possível fator envolvido na fisiopatologia da DF, tendo em vista o aumento da formação de espécies reativas em pacientes com DF. Biancini e *cols.* (2012) em estudo com pacientes em TRE, verificaram uma diminuição das enzimas antioxidantes, aumento da peroxidação lipídica e dano à proteínas, demonstrando um estado crítico de estresse oxidativo. Porém, ainda não foi esclarecido de que forma o acúmulo de metabólitos induz o estresse oxidativo.

Nossos resultados em conjunto mostraram que a exposição *in vitro* ao GB3 resultou em aumento da atividade dos complexos II e IV da CTE, o que pode estar relacionado com o aumento na produção de ER e das defesas antioxidantes no tecido renal. Além disso, a presença de GB3 aumentou a lipoperoxidação e diminuiu as defesas antioxidantes no córtex cerebral. Por outro lado, não foi observada alterações na atividade dos outros complexos enzimáticos no homogeneizado de rim, assim como não foram observadas alterações na atividade da CTE no córtex cerebral.

Assim, podemos concluir que o principal metabólito acumulado na DF, o GB3, pode contribuir de alguma forma para o desequilíbrio energético e redox celular, e que isso pode estar relacionado ao dano celular observado na doença.

5. Anexos

5.1. Parecer CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 107/13 Parecer: 302/15

2) DATA DO PARECER:10/06/15

3) TÍTULO DO PROJETO:

Efeito 'in vitro' de metabólitos acumulados nas doenças lisossômicas de depósito sobre os complexos da cadeia transportadora de elétrons.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Alethéa Gatto Barschak

5) SUMÁRIO DO PROJETO:

O uso de animais irá auxiliar na avaliação do efeito dos metabólitos acumulados nas doenças lisossômicas de depósito (DLD) – Fabry, Gaucher, MPS II e MPS IV.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Avaliar 'in vitro' o efeito dos metabólitos acumulados nas DLD– doenças de Fabry, Gaucher, MPS II e MPS IV.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título

Adequado

Comentários

Introdução

Adequadas

Comentários

Objetivos

Adequados

Comentários

Relevância e Justificativa

Adequados

Comentários

Materiais e Métodos

Adequados

Comentários

Cronograma para execução da pesquisa	<input checked="" type="checkbox"/>	Adequado	<input type="checkbox"/>	Comentários
Orçamento e fonte financiadora	<input checked="" type="checkbox"/>	Adequados	<input type="checkbox"/>	Comentários
Referências Bibliográficas	<input checked="" type="checkbox"/>	Adequadas	<input type="checkbox"/>	Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

<input checked="" type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
-------------------------------------	-----	--------------------------	-----

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse:	B	<input checked="" type="checkbox"/>	C	<input type="checkbox"/>	D	<input type="checkbox"/>	E	<input type="checkbox"/>
------------------------------	---	-------------------------------------	---	--------------------------	---	--------------------------	---	--------------------------

Os animais serão eutanasiados e análise será 'in vitro'.

Espécie:	Ratos Norvergicus	Número Amostral:	36
-----------------	-------------------	-------------------------	----

Redução Amostral:	<input type="checkbox"/>	Sim	<input checked="" type="checkbox"/>	Não
--------------------------	--------------------------	-----	-------------------------------------	-----

Justifique:

Substituição de Metodologia:	<input type="checkbox"/>	Sim	<input checked="" type="checkbox"/>	Não
-------------------------------------	--------------------------	-----	-------------------------------------	-----

Aprimoramento da Metodologia:	<input checked="" type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
--------------------------------------	-------------------------------------	-----	--------------------------	-----

Citar os artigos científicos utilizados para o cálculo amostral.

Acomodação e manutenção dos animais:	<input checked="" type="checkbox"/>	Adequado	<input type="checkbox"/>	Inadequado
---	-------------------------------------	----------	--------------------------	------------

Manipulação dos animais:	<input checked="" type="checkbox"/>	Adequado	<input type="checkbox"/>	Inadequado
---------------------------------	-------------------------------------	----------	--------------------------	------------

Analgesia dos animais (se aplicável): Não se aplica

Adequado

Inadequado

Anestesia dos animais (se aplicável)

Adequado

Inadequado

Indicado o uso de anestesia antes da eutanásia, justificar se não for possível.

Eutanásia dos animais (se aplicável):

Adequado

Inadequado

Decapitação

Local de Realização (Biotério/Laboratório): Biotério UFCSPA
Outra instituição. Qual? Laboratório Bioquímica UFRGS

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data

Espécie

Sexo

Quantidade

12) RECOMENDAÇÃO:

Aprovado

Com Pendência

Não aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:

Emenda ao projeto: solicitado a inclusão de análise de mais um órgão, o rim (antes cérebro e fígado).

Emenda aprovada

10/06/15

5.2. Normas da Revista Toxicology *in vitro*