

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

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBRAL DOS PRINCIPAIS**  
**METABÓLITOS ACUMULADOS NAS ACIDÚRIAS D-2-**  
**HIDROXIGLUTÁRICA E L-2-HIDROXIGLUTÁRICA SOBRE A**  
**HOMEOSTASE REDOX E HISTOPATOLOGIA NO ESTRIADO E CEREBELO**  
**DE RATOS JOVENS**

**MATEUS STRUECKER DA ROSA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER**

**Porto Alegre, 2015**

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

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBRAL DOS PRINCIPAIS**  
**METABÓLITOS ACUMULADOS NAS ACIDÚRIAS D-2-**  
**HIDROXIGLUTÁRICA E L-2-HIDROXIGLUTÁRICA SOBRE A**  
**HOMEOSTASE REDOX E HISTOPATOLOGIA NO ESTRIADO E CEREBELO**  
**DE RATOS JOVENS**

**Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências**  
**Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como**  
**requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.**

**MATEUS STRUECKER DA ROSA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER**

**Porto Alegre, 2015**

*“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”*

*Platão*

## AGRADECIMENTOS

À UFRGS, pública e gratuita, juntamente com este Departamento, que me acolheu desde 2010 e me proporcionaram uma formação de altíssima qualidade.

Aos professores deste Departamento, pelos ensinamentos transmitidos durante esses anos.

Aos colegas de laboratório Alexandre, Bianca e César, companheiros desde o início dessa trajetória, bons amigos nos bons e maus momentos.

Aos amigos do laboratório 38, o melhor laboratório deste Departamento, companheiros divertidos, dinâmicos e extremamente competentes.

Aos meus amigos de fora do mundo acadêmico, que me proporcionaram momentos de muita felicidade e alegria importantes para que eu pudesse concluir mais esta etapa com serenidade.

Ao Professor Moacir, meu orientador desde sempre, pela experiência profissional e de pesquisa, carinho e orientação de vida nesses anos.

A minha família, em especial a minha mãe Carin, ao meu falecido pai Álvaro e ao meu padrasto e pai Cleomar, pela formação de caráter e por todo suporte durante a minha vida inteira, pelo carinho, pelo amor e pelo companheirismo incondicionais.

E por último, e definitivamente não menos importante, à Débora, minha namorada amada que vem me apoiando desde o fim da faculdade e durante todo o mestrado, pelo carinho, companheirismo, cumplicidade e amor incondicionais, além de ter me aturado durante todos esses anos nos momentos difíceis e por poder compartilhar comigo também os momentos mais felizes.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

EIM – Erros inatos do metabolismo

D-2-HGA – Acidúria D-2-hidroxi glutárica

L-2-HGA – Acidúria L-2-hidroxi glutárica

D-2-HG – Ácido D-2-hidroxi glutárico

L-2-HG – Ácido L-2-hidroxi glutárico

ERO – Espécie reativa de oxigênio

ERN – Espécie reativa de nitrogênio

SNC – Sistema nervoso central

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

tGS – Glutathione total

MDA – Malondialdeído

## ÍNDICE

<b><u>RESUMO</u></b>	<b>3</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>1. Erros inatos do metabolismo</b>	<b>10</b>
1. 1. Histórico e conceito	10
1. 1. 1. Classificação dos EIM	12
1. 1. 2. Aspectos clínicos	13
<b>1. 2. Acidúrias orgânicas</b>	<b>13</b>
1. 2. 1. Acidúrias 2-hidroxi-glutáricas	14
1. 2. 2. Diagnóstico das acidúrias D- e L-2-hidroxi-glutáricas	15
<b>1. 2. 3. Acidúria D-2-hidroxi-glutárica (D-2-HGA)</b>	<b>15</b>
1. 2. 3. 1. Aspectos clínicos e neuropatológicos	17
1. 2. 3. 2. Aspectos bioquímicos	17
1. 2. 3. 3. Aspectos fisiopatológicos	18
<b>1. 2. 4. Acidúria L-2-hidroxi-glutárica (L-2-HGA)</b>	<b>19</b>
1. 2. 4. 1. Aspectos clínicos e neuropatológicos	20
1. 2. 4. 2. Aspectos bioquímicos	21
1. 2. 4. 3. Aspectos fisiopatológicos	21
<b>1. 3. Radicais livres</b>	<b>22</b>
1. 3. 1. Defesas antioxidantes	23
1. 3. 2. Estresse oxidativo	24
<b><u>2. OBJETIVOS</u></b>	<b>25</b>
<b>2. 1. Objetivo geral</b>	<b>25</b>

**2. 2. Objetivos específicos** \_\_\_\_\_ Erro! Indicador não definido. **25**

**3. ARTIGOS CIENTÍFICOS** \_\_\_\_\_ **27**

**III. 1. Disruption of redox homeostasis and histopathological alterations caused by in vivo intrastriatal administration of D-2-hydroxyglutaric acid to young rats** \_\_\_\_\_ **28**

**III. 2. In vivo intracerebral administration of L-2-hydroxyglutaric acid provokes oxidative stress and histopathological alterations in striatum and cerebellum of adolescent rats** \_\_\_\_\_ **30**

**4. DISCUSSÃO** \_\_\_\_\_ **81**

**5. CONCLUSÕES** \_\_\_\_\_ **92**

**6. REFERÊNCIAS** \_\_\_\_\_ **95**

## RESUMO

As acidúrias D-2-hidroxi-glutárica (D-2-HGA) e L-2-hidroxi-glutárica (L-2-HGA) são doenças neurometabólicas hereditárias causadas pelas deficiências das atividades da D-2-hidroxi-glutarato desidrogenase (D-2-HGA do tipo I) ou isocitrato desidrogenase 2 (D-2-HGA do tipo II) e L-2-hidroxi-glutarato desidrogenase (L-2-HGA). Os pacientes afetados por essas doenças desenvolvem principalmente sintomas e sinais neurológicos como convulsões, coma e atrofia cerebral. As lesões cerebrais ocorrem majoritariamente nos gânglios da base (D-2-HGA e L-2-HGA) e no cerebelo (L-2-HGA). Bioquimicamente, a D-2-HGA e a L-2-HGA são caracterizadas pelo acúmulo tecidual e elevada excreção urinária dos ácidos D-2-hidroxi-glutárico (D-2-HG) e L-2-hidroxi-glutárico (L-2-HG), respectivamente. Tendo em vista que a fisiopatologia da disfunção cerebral encontrada nestes pacientes ainda é pouco conhecida, o presente trabalho investigou os efeitos da administração intracerebral *in vivo* em ratos jovens dos ácidos D-2-HG e L-2-HG sobre parâmetros de estresse oxidativo e sobre a histopatologia das principais estruturas afetadas nos pacientes com D-2-HGA (estriado) ou L-2-HGA (estriado e cerebelo). Inicialmente, avaliamos o efeito dos ácidos D-2-HG e L-2-HG sobre os níveis de malondialdeído (MDA) e sobre a formação de carbonilas em estriado e cerebelo. Verificamos que ambos os ácidos orgânicos aumentaram significativamente os níveis de MDA (dano oxidativo lipídico) no estriado (D-2-HG e L-2-HG) e no cerebelo (L-2-HG). Por outro lado, apenas o D-2-HG foi capaz de aumentar a formação de carbonilas (dano oxidativo proteico) no estriado. Além disso, o D-2-HG diminuiu as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) e as atividades enzimáticas da glutathiona peroxidase (GPx) e da superóxido dismutase (SOD), além de aumentar as concentrações de glutathiona oxidada (GSSG) no estriado. Já o L-2-HG foi capaz de diminuir as concentrações de GSH e de glutathiona total (tGS), bem como a

atividade da GPx e da glutathione redutase (GR). Por fim, o L-2-HG aumentou as concentrações de GSSG no estriado e no cerebelo. Também investigamos o efeito da administração intracerebral *in vivo* do D-2-HG e do L-2-HG sobre a oxidação de diclorofluorosceína (DCFH), produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e sobre o conteúdo de nitratos e nitritos, com o objetivo de verificar quais as principais espécies reativas envolvidas nos danos induzidos por estes ácidos orgânicos. O D-2-HG aumentou os níveis de nitratos e nitritos, mas não foi capaz de alterar a oxidação de DCFH e a produção de  $H_2O_2$ , indicando o envolvimento de espécies reativas de nitrogênio (ERN) nesses efeitos. Já o L-2-HG aumentou a oxidação de DCFH e a produção de  $H_2O_2$ , não alterando o conteúdo de nitratos e nitritos. Tais resultados sugerem que o L-2-HG provavelmente induz as alterações observadas através do aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Também demonstramos que os antioxidantes melatonina, creatina, ácido ascórbico mais  $\alpha$ -tocoferol (Vit C + E), N-acetilcisteína (NAC), maleato de dizocilpina (MK-801) e N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) foram capazes de prevenir o dano oxidativo lipídico e a diminuição das defesas antioxidantes induzidos pelo D-2-HG e pelo L-2-HG. Melatonina, creatina e a solução de Vit C + E preveniram vários efeitos induzidos pelo L-2-HG, enquanto o MK-801 e o L-NAME foram capazes de prevenir apenas os efeitos induzidos pelo D-2-HG e o NAC não preveniu os efeitos induzidos pelos dois ácidos orgânicos. Observamos ainda que os ácidos 3-metilglutacônico (3-MGT; estruturalmente similar ao D-2-HG) e L-2-hidróxi-3-metilvalérico (L-HMV; estruturalmente similar ao L-2-HG), não foram capazes de alterar esses parâmetros, sugerindo uma ação seletiva para as atividades pro-oxidantes induzidas pelos D-2-HG e L-2-HG. Finalmente, estudos histológicos mostraram que o D-2-HG e L-2-HG são capazes de alterar a morfologia tecidual no estriado (D-2-HG e L-2-HG) e no cerebelo (L-2-HG). O D-2-HG causou

vacuolização e infiltrado linfocítico e macrofágico no estriado. Já o L-2-HG, além de causar vacuolização e infiltrado linfocítico e macrofágico, também induziu necrose, formação de corpos granulares eosinofílicos e astrogliose (aumento da proteína ácida fibrilar glial). Também observamos em ratos injetados com L-2-HG perda da população neuronal (diminuição da imunodeteção da proteína neuronal nuclear específica) no estriado, enquanto que no cerebelo o L-2-HG induziu vacuolização e infiltrado linfocítico e macrofágico. Concluindo, este trabalho foi o primeiro a demonstrar efeitos *in vivo* do D-2-HG e do L-2-HG (administração intracerebral) sobre parâmetros de estresse oxidativo e alterações histopatológicas em cérebro de ratos jovens. Presumimos que o comprometimento da homeostase redox possa estar associado às alterações histopatológicas observadas, podendo contribuir pelo menos em parte, para a neuropatologia encontrada nos pacientes afetados pela D-2-HGA e pela L-2-HGA.

## ABSTRACT

D-2-hydroxyglutaric aciduria (D-2-HGA) and L-2-Hydroxyglutaric aciduria (L-2-HGA) are inherited neurometabolic disorders caused by enzymatic defects in D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase (D-2-HGA type I) or isocitrate dehydrogenase 2 (D-2-HGA type II) and L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase (L-2-HGA), respectively. Patients affected by these disorders develop severe neurological damage, which leads to seizures, coma and cerebral atrophy. Brain lesions occur mainly in the basal ganglia (D-2-HGA and L-2-HGA) and in cerebellum (L-2-HGA) Biochemically, D-2-HGA and L-2-HGA are characterized by tissue accumulation and high urinary excretion of D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG) and L-2-hydroxyglutaric acid (L-2-HG), respectively. Since the pathophysiology of the tissue damage in these diseases is still poorly unknown, the present study investigated the effects of *in vivo* intracerebral administration of D-2-HG and L-2-HG in adolescent rats on important parameters of oxidative stress and on the histopathology of the principal cerebral structures damaged in patients with D-2-HGA (striatum) and L-2-HGA (striatum and cerebellum). Initially, we investigated the effects of *in vivo* intracerebral administration of D-2-HG and L-2-HG on malondialdehyde (MDA) levels and carbonyl formation in striatum and cerebellum. We verified that both organic acids significantly elevated MDA levels (lipid oxidative damage) in striatum (D-2-HG and L-2-HG) and cerebellum (L-2-HG), whereas only D-2-HG was able to elevate carbonyl formation (protein oxidative damage) in striatum. Furthermore, D-2-HG and L-2-HG significantly diminished reduced glutathione (GSH) concentrations, glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activities, besides increasing oxidized glutathione (GSSG) concentrations in striatum. Otherwise, L-2-HG reduced GSH, total glutathione (tGS) concentrations and the activities of GPx and reductase glutathione (GR). Finally, L-2-

HG augmented GSSG concentrations in striatum and cerebellum. In the next step of this work, we investigated the effects of *in vivo* intracerebral administration of D-2-HG and L-2-HG on 2',7'-dichlorofluorescein oxidation (DCFH), hydrogen peroxide production ( $H_2O_2$ ) and nitrate and nitrite content in order to elucidate the main reactive species involved in the oxidative damage induced by these organic acids. D-2-HG elevated nitrate and nitrite content, whereas it did not change DCFH oxidation and  $H_2O_2$  production, suggesting the involvement of reactive nitrogen species (RNS) in these effects. On the other hand, L-2-HG injection increased DCFH oxidation and  $H_2O_2$  production, but did not change nitrate and nitrite content. These results suggest that L-2-HG-induced alterations occur by an elevated generation of reactive oxygen species (ROS). We also demonstrated that antioxidants such as melatonin, creatine, a mixture of ascorbic acid plus  $\alpha$ -tocopherol (Vit C + E), N-acetylcysteine (NAC), dizocilpine maleate (MK-801) and N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were able to prevent D-2-HG- and L-2-HG-induced lipid oxidative damage and the reduction of the antioxidant defenses induced by D-2-HG and L-2HG. Melatonin, creatine and Vit C + E prevented some of the effects induced by L-2-HG, whereas MK-801 and L-NAME were only able to prevent the D-2-HG-elicited effects and NAC did not prevent D-2-HG and L-2-HG-induced alterations. We also observed that 3-methylglutaconic (3-MGT, structurally similar to D-2-HG) and L-2-hydroxy-3-methylvaleric (L-HMV, structurally similar to L-2-HG) acids were not able to change these parameters, suggesting a selective effect on the pro-oxidant activities induced by D-2-HG- and L-2-HG. Finally, histological studies demonstrated that D-2-HG and L-2-HG were able to cause histopathological alterations in the striatum (D-2-HG and L-2-HG) and cerebellum (L-2-HG). D-2-HG provoked vacuolation, lymphocytic and macrophage infiltration in the striatum. Furthermore, L-2-HG induced vacuolation, lymphocytic and macrophage

infiltration, necrosis, granular eosinophilic bodies, astrogliosis (glial fibrillary acidic protein (elevated glial fibrillary acidic protein immunostaining) and neuronal loss (decreased neuron-specific nuclear protein (NeuN) immunostaining) in striatum. On the other hand, L-2-HG provoked only vacuolation and lymphocytic and macrophage infiltration in the cerebellum. To the best of our knowledge this is the first report that demonstrates the influence of *in vivo* intracerebral administration of D-2-HG and L-2-HG on oxidative stress parameters and histopathological alterations in brain of adolescent rats. We presumed that the disturbance of cell redox homeostasis was probably associated with the histopathological abnormalities observed, that possibly contribute at least in part to the neuropathology of the brain injury of patients affected by D-2-HGA and L-2-HGA.

# **PARTE I**

## **Introdução e Objetivos**

## ***1. Erros inatos do metabolismo***

### ***1.1. Histórico e conceito***

O termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi proposto, em 1908, pelo inglês Archibald Garrod, referindo-se à alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo. Fundamentado nas leis de Mendel, recém-descobertas, e baseado em suas observações de que estas doenças eram mais frequentes entre indivíduos da mesma família, embora seus pais e outros parentes fossem normais, Garrod propôs um modelo de herança genética autossômica recessiva para estas doenças. Também observou que alguns dos pacientes excretavam na urina quantidades aumentadas de determinadas substâncias intermediárias do metabolismo. Através da observação de que o ácido homogentísico presente em excesso na urina dos pacientes com alcaptonúria era um metabólito normal da degradação proteica, ele relacionou este acúmulo a um bloqueio na rota de catabolismo da tirosina devido à falta de um fator nessa rota. Posteriormente, foi demonstrado que cada gene exercia influência sobre a síntese de uma determinada enzima que catalisa uma reação em cada rota metabólica. Baseado nesta demonstração, o conceito de EIM, proposto por Garrod, foi reformulado por Beadle & Tatum, em 1941, com a hipótese “um gene - uma enzima”. Este conceito expressava que toda reação bioquímica estava sob controle de um único gene e que a mutação deste, resultando na modificação estrutural e funcional da enzima, ocasionava uma alteração da capacidade celular de realizar uma determinada reação química. O primeiro defeito enzimático causador de uma doença genética foi demonstrado por Gibson em 1948. Entretanto, a hipótese de Garrod só foi confirmada em 1958, quando La Du e colaboradores comprovaram a deficiência da oxidase do ácido homogentísico no fígado de um paciente com alcaptonúria. Com o surgimento de novos distúrbios relacionados a alterações genéticas e que envolviam o acúmulo de outras substâncias nos líquidos

biológicos dos pacientes, postulou-se que estas doenças resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, enzimática ou não, pertencente ao metabolismo (Scriver et al., 2001). Presumiu-se então, que em consequência deste bloqueio metabólico, pode ocorrer o acúmulo de precursores da reação catalisada pela enzima envolvida, com a formação de rotas metabólicas alternativas e a deficiência de produtos essenciais ao organismo (Scriver et al., 2001).

Assim, os EIM compreendem doenças genéticas devidas à síntese de uma proteína anômala, geralmente uma enzima, podendo expressar-se na troca da sequência primária, levando a alterações estruturais com modificações nas suas propriedades cinéticas, diminuindo sua estabilidade biológica e/ou facilitando sua degradação *in vivo*. Pode também ocorrer uma diminuição ou mesmo uma ausência na síntese proteica. A resultante de qualquer destas alterações é uma diminuição na atividade da enzima envolvida ou a inativação da mesma. Como consequências da ausência ou deficiência severa da atividade enzimática podem ocorrer o acúmulo de substâncias normalmente presentes em pequenas quantidades, a deficiência de produtos intermediários críticos, a deficiência de produtos finais específicos ou ainda o excesso nocivo de produtos de vias metabólicas acessórias. Os EIM são considerados individualmente raros, porém a incidência cumulativa, ou seja, quando consideramos todos os EIM juntos é de 1:500-1:1000 dos recém-nascidos vivos (Scriver et al., 2001). Outras proteínas que podem estar envolvidas nos EIM são proteínas de transporte, do esqueleto, do sangue, etc., como será a seguir exemplificado.

### ***1.1.1. Classificação dos EIM***

Sinclair (1982) classificou os EIM em quatro grandes grupos conforme o tipo de função exercida pela proteína deficiente e o tecido envolvido, considerando ainda aspectos clínicos, bioquímicos, patológicos e terapêuticos:

- a) doenças de transporte: envolvem proteínas transportadoras de moléculas orgânicas ou inorgânicas no rim ou no intestino. Exemplos: deficiência de dissacaridases e defeito no transporte de magnésio;
- b) doenças de armazenamento, degradação e secreção: envolvem proteínas relacionadas com o aparelho de Golgi ou lisossomas, na sua grande maioria, provocando acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos. Exemplos: doenças lisossômicas de depósito, glicogenoses e cistinose;
- c) doenças de síntese: envolvem a síntese de proteínas com funções hormonais, de defesa imunológica, estruturais, etc. Exemplo: hiperplasia adrenal congênita por deficiência na atividade da enzima de 21-hidroxilase, hipogamaglobulinemia;
- d) doenças do metabolismo intermediário: envolvem deficiências enzimáticas das rotas de metabolização de moléculas pequenas (aminoácidos, glicídios, neurotransmissores, etc), podendo comprometer rotas importantes como os ciclos dos ácidos tricarboxílicos e da uréia, ou rotas relacionadas a estas. O bloqueio produz o acúmulo de substrato da enzima deficiente, bem como dos metabólitos produzidos a partir deste, além da deficiência do produto final da rota, caso não possa ser suprido por outra via metabólica. O acúmulo de metabólitos tóxicos pode causar outras alterações bioquímicas secundárias e danos nos tecidos. Como esses produtos são liberados na circulação, podem prejudicar outros tecidos, sendo finalmente excretados na

urina. Constituem o maior grupo do EIM e têm como exemplos as acidúrias orgânicas, as aminoacidopatias, as desordens do metabolismo das purinas, da frutose, galactose e pentose, e outros.

### **1.1.2. Aspectos clínicos**

Embora a sintomatologia dos EIM seja bastante variável, existem alguns sintomas e sinais clínicos que aparecem com maior frequência nestes distúrbios. Podemos citar os seguintes sintomas: retardo no crescimento; dificuldade alimentar; vômitos; diarreia; letargia ou coma; hipotonia; convulsões; dificuldade respiratória e apneia; icterícia; hepatomegalia; odor anormal da pele; dismorfias; anormalidade oculares e cabelos anormais (Scriver et al., 2001).

### **1.2. Acidúrias Orgânicas**

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

eram os EIM mais frequentes em crianças hospitalizadas, motivando diversos estudos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos nos anos seguintes.

Clinicamente os pacientes afetados por acidúrias orgânicas apresentam predominantemente disfunção neurológica em suas mais diversas formas de expressão: regressão neurológica, convulsões, coma, ataxia, hipotonia, hipertonia, irritabilidade, tremores, movimentos coreatéticos, tetraparesia espástica, atraso no desenvolvimento psicomotor, retardo mental e outras manifestações. As mais frequentes manifestações laboratoriais são cetonemia, cetonúria, neutropenia, trombocitopenia, acidose metabólica, baixos níveis de bicarbonato, hiperglicinemia, hiperamonemia, hipo / hiperglicemia, acidose láctica, aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres e outros (Scriver et al., 2001). Através do uso da tomografia computadorizada, foram encontradas na maioria dos pacientes afetados por essas doenças alterações de substância branca (hipomielização e / ou desmielização), atrofia cerebral generalizada ou dos gânglios da base (necrose ou calcificação), megaencefalia, atrofia frontotemporal e atrofia cerebelar (Mayatepek et al., 1996).

### ***1.2.1. Acidúrias 2-hidroxi-glutáricas***

O ácido L-2-hidroxi-glutárico (L-2-HG) ou seu enantiômero, o ácido D-2-hidroxi-glutárico (D-2-HG), apresentam concentrações muito elevadas nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes afetados pelas acidúrias L-2-hidroxi-glutárica (L-2-HGA) e D-2-hidroxi-glutárica (D-2-HGA), respectivamente. Essas doenças metabólicas são doenças geneticamente distintas transmitidas de forma autossômica recessiva (Barbot et al., 1997; van der Knaap et al., 1999a, 1999b).

### ***1.2.2. Diagnóstico das acidúrias D- e L- 2-hidroxi glutáricas***

O diagnóstico das acidúrias D- e L-2-hidroxi glutárica é realizado pela detecção e determinação dos níveis dos ácidos D-2-HG e L-2-HG, respectivamente nos líquidos biológicos (urina, sangue e CSF) dos pacientes afetados por essas doenças. No entanto, pode-se suspeitar dessas doenças através da avaliação clínica de pacientes com retardo no desenvolvimento e/ou outra disfunção neurológica de etiologia desconhecida com anormalidades cerebrais em exames de imagens. O diagnóstico inicial para essas doenças é geralmente feito por espectrometria de massa associada à cromatografia gasosa (GC-MS) que revela um aumento do ácido 2-HG, sem especificar o enantiômero D ou L. A diferenciação quiral realizada apenas em poucos centros referenciais através de espectrometria de massa em tandem associada à cromatografia líquida (LC-MS/MS) é obrigatória para o correto diagnóstico diferencial (Gibson et al., 1993, Struys et al., 2004).

### ***1.2.3. Acidúria D-2-hidroxi glutárica (D-2-HGA)***

A D-2-HGA foi primeiramente descrita em 1980 por Chalmers e colaboradores. É considerada uma acidúria orgânica cerebral devido a que seus sintomas e sinais clínicos serem essencialmente cerebrais (Hoffman et al., 1994). Recentemente a D-2-HGA foi caracterizada bioquimicamente, apresentando-se sob duas formas distintas, uma com um fenótipo severo (D-2-HGA do tipo II) e outra com uma apresentação mais lenta e sintomas mais brandos (D-2-HGA do tipo I) (Kranendjik et al., 2010a, 2010b). A D-2-HGA do tipo I é causada por mutações no gene *D2HGDH* (MIM# 600721) que codifica a enzima mitocondrial D-2-hidroxi glutarato desidrogenase (D-2-HGDH). A D-2-HGA do tipo II, por sua vez, é causada por mutações de ganho de função no gene *IDH2* (MIM# 613657) que é responsável pela codificação da enzima isocitrato desidrogenase

2 (IDH2). Em ambos os casos, as mutações resultam na diminuição severa ou ausência de atividade das enzimas envolvidas. A principal característica bioquímica da D-2-HGA é o acúmulo tecidual e a excreção urinária elevada do D-2-HG que é metabolizado por essas enzimas (Figuras 1 e 2).

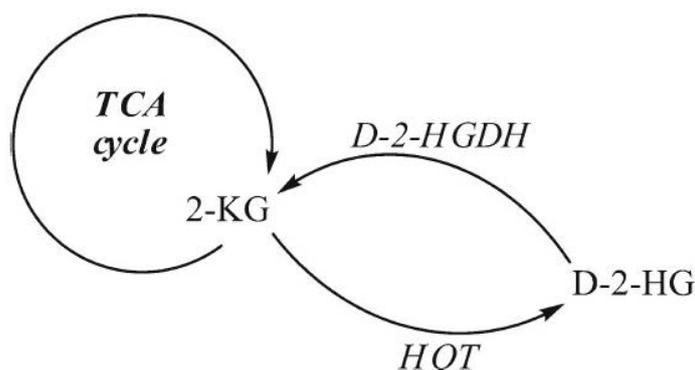


Figura 1. D-2-HG é formado a partir de 2-cetoglutarato (2-KG) via hidróxiácido-oxoácido transidrogenase (HOT). A enzima D-2-hidróxiglutarato desidrogenase (D-2-HGDH) catalisa a conversão de D-2-HG para 2-KG (Kranendjik et al., 2012).

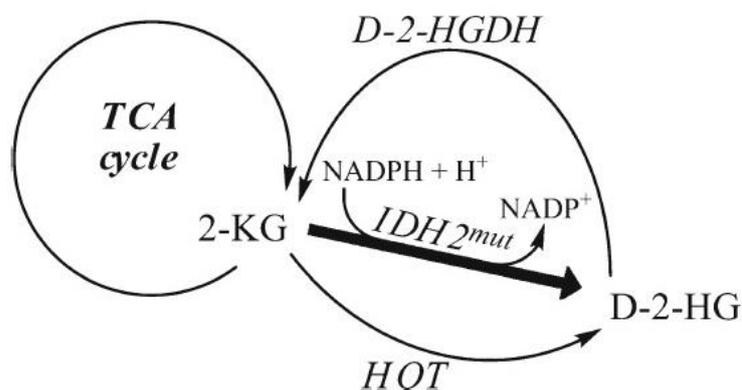


Figura 2. A enzima isocitrato desidrogenase (IDH2) mutante com ganho de função produz D-2-HG a partir de 2-KG adicionalmente à produção de D-2HG via HOT. Existe a hipótese de que a D-2-HGDH não é capaz de metabolizar todo o D-2-HG gerado, resultando no acúmulo de D-2-HG em pacientes com D-2-HGA tipo II (Kranendjik et al., 2012).

### ***1.2.3.1. Aspectos clínicos e neuropatológicos***

As manifestações clínicas cardinais para ambos os fenótipos da D-2-HGA incluem retardo no desenvolvimento, hipotonia e convulsões. Contudo, alguns estudos demonstram que os pacientes acometidos pela D-2-HGA tipo II apresentam convulsões mais frequentes e o atraso no desenvolvimento é mais severo do que o observado em pacientes D-2-HGA do tipo I. Além disso, cerca de um terço dos pacientes com o tipo II apresenta cardiomiopatia dilatada (Krannendijk et al., 2012).

Os achados neuropatológicos dessa doença são principalmente alargamento dos ventrículos laterais e alterações anatômicas nos gânglios da base. Além disso, estudos de neuroimagem demonstram, em ambos os fenótipos da D-2-HGA, um aumento dos espaços subaracnóides frontais, pseudocistos subependimais, sinais de atraso na maturação cerebral e anormalidades na substância branca cerebral multifocalizadas (Van der Knaap et al 1999a, b).

A variante tipo I da D-2-HGA é muito mais variável quanto à sintomatologia clínica do que a variante tipo II. Em determinados casos os pacientes não apresentam alterações neurológicas graves. Já o fenótipo severo (tipo II) caracteriza-se principalmente por encefalopatia epilética de início neonatal ou na infância, além de movimentos distônicos ou coreoatetóticos e deficiência visual. Um terço dos pacientes morre durante a infância (Krannedjik et al., 2012).

### ***1.2.3.2. Aspectos bioquímicos***

Bioquimicamente, a D-2-HGA é caracterizada pelo acúmulo tecidual e elevada excreção urinária do D-2-HG (Gibson et al., 1993). As concentrações intracelulares/mitocondriais de D-2-HG ainda são desconhecidas, enquanto que as concentrações plasmáticas em pacientes afetados pela D-2-HGA aumentam cerca de 30-

840 vezes. Embora as concentrações intracerebrais de D-2-HG ainda sejam desconhecidas, se acredita que possam ser maiores do que os níveis plasmáticos deste metabólito (Hoffmann 1994). Além disso, elevadas concentrações de intermediários do ciclo de Krebs, como por exemplo, o 2-cetoglutarato (2-KG) na urina e também GABA no LCR têm sido descritas (Van der Knaap 1999a,b; Gibson et al., 1993).

No que se refere ao acúmulo de D-2-HG na D-2-HGA do tipo I e na D-2HGA do tipo II, sabemos que a enzima transidrogenase hidroxilácido-oxoácido (HOT, EC 1.1.99.24) é responsável pela conversão de 2-KG em D-2-HG (Figuras 1 e 2) (Struys et al 2005a), enquanto o D-2-HG é convertido a 2-KG através da enzima D-2-HGDH (EC 1.1.99.-). Estudos recentes demonstraram que a atividade da D-2-HGDH está ausente ou muito diminuída em linfoblastos e fibroblastos de pacientes acometidos pela D-2-HGA do tipo I, sendo que o acúmulo de D-2-HG na D-2-HGA tipo I é devido à deficiência dessa enzima (Wickenhagen et al., 2009; Kranendijk et al., 2010a).

Na D-2-HGA do tipo II, a enzima que possui sua atividade alterada é a IDH2 (EC 1.1.1.42) que é responsável normalmente pela conversão de isocitrato a 2-KG (Kranendijk et al 2010b). No entanto, a enzima IDH2 mutante adquire a capacidade de converter 2-KG em D-2-HG. Acredita-se que a atividade da D-2-HGDH seja insuficiente para metabolizar o excesso de D-2-HG formado devido ao ganho de função da IDH2 mutante (Kranendijk et al., 2011, 2012), resultando no acúmulo do mesmo.

### ***1.2.3.3. Aspectos fisiopatológicos***

Embora sejam geneticamente distintas, a D-2-HGA tipo I e a D-2-HGA tipo II compartilham o acúmulo de D-2-HG nos líquidos biológicos, assim como aspectos clínicos comuns. Essas observações sugerem que o metabólito D-2-HG contribui para a fisiopatologia associada aos aspectos clínicos comuns, tais como retardo no

desenvolvimento, hipotonia e convulsões observadas em ambos os grupos. A produção aumentada de D-2-HG provavelmente ocorre na mitocôndria, uma vez que a D-2-HGDH e a IDH2 são enzimas mitocondriais. Os níveis plasmáticos de D-2-HG nos pacientes afetados pela D-2-HGA tipo II é cerca de 5 vezes maior do que os observados nos pacientes do tipo I. Sendo assim, já que a frequência e a severidade do atraso no desenvolvimento, hipotonia e convulsões observadas nos pacientes tipo II são maiores do que as observadas nos pacientes tipo I, sugere-se que exista uma correlação entre as elevadas concentrações de D-2-HG e a severidade da doença.

A fisiopatologia da D-2-HGA ainda é pouco conhecida, embora haja na literatura alguns trabalhos demonstrando efeitos deletérios do D-2-HG sobre a homeostase energética mitocondrial e redox em tecidos de roedores e humanos. Dentro desses estudos, a exposição de cérebro de roedores e de pintos ao D-2-HG provocou diminuição da atividade da enzima creatina quinase e das atividades enzimáticas dos complexos IV e V da cadeia respiratória (da Silva et al., 2002; Kölker et al., 2002; da Silva et al., 2003a, b, 2004), além de induzir estresse oxidativo *in vitro* (Kölker et al., 2002; Latini et al., 2003, 2005). Também foi demonstrado que o D-2-HG provoca o aumento da captação de glutamato em sinaptossomas sem ser capaz de alterar outros parâmetros glutamatérgicos (Junqueira et al., 2004). O D-2-HGA também foi demonstrado ser excitotóxico em culturas primárias de neurônios de pintos através da ativação de receptores NMDA (Kölker et al., 2002).

#### ***1.2.4. Acidúria L-2-hidroxiglutárica***

A acidúria L-2-hidroxiglutárica (L-2-HGA) foi primeiramente descrita em 1980 por Duran e colaboradores. O bloqueio metabólico presente nos pacientes afetados pela L-2-HGA deve-se à ausência da atividade enzima L-2-hidroxiglutarato desidrogenase (L-2-

HGDH, EC 1.1.99.2) consequente a mutações no gene *L2HGDH* (Rzem et al., 2004; Topcu et al., 2004; Samuraki et al., 2008; Steenweg et al., 2010) (Figura 3).

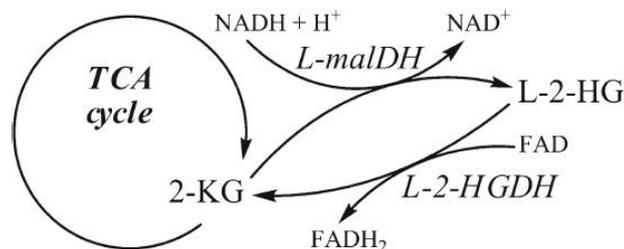


Figura 3. L-2-HG é formado através da enzima L-malato desidrogenase (L-malDH) a partir de 2-KG e NADH. A enzima L-2-hidroxiglutarato desidrogenase (L-2-HGDH) catalisa a interconversão de L-2-HG a 2-KG utilizando FAD como cofator (Kranendjik et al., 2012).

#### 1.2.4.1. Aspectos clínicos e neuropatológicos

O fenótipo clínico dos pacientes acometidos pela L-2-HGA é homogêneo. Os aspectos clínicos da doença começam a ser percebidos já na infância. Dentre eles podemos citar como principais, o atraso no desenvolvimento, epilepsia e ataxia cerebelar (Steenweg et al., 2010). O curso da doença é lentamente progressivo, sendo que alguns pacientes com L-2-HGA com a forma mais branda podem permanecer sem diagnóstico antes da adolescência ou até mesmo antes da idade adulta.

Aparentemente, todos os pacientes apresentam retardo no desenvolvimento mental e motor e cerca de dois terços desenvolvem epilepsia e disfunção cerebelar. Além disso, aproximadamente 50% dos pacientes possuem macrocefalia e sintomas extrapiramidais, incluindo tremor e distonia. Finalmente, 25 % dos pacientes acometidos pela L-2-HGA possuem problemas na fala (Kranendjik et al., 2012).

Os achados neuropatológicos dessa doença são principalmente anormalidades subcorticais no núcleo denteado, globo pálido, putamen e no núcleo caudado, além de alterações no cerebelo (Barth et al 1993; Barbot et al 1997; Topcu et al. 2005;

Kranendjik et al., 2012). Ao passo que a doença progride, a intensidade das alterações na substância branca e nos gânglios da base começa a ficar mais difusa, seguida de atrofia da substância branca cerebral e ataxia cerebelar (Barbot et al., 1997).

#### ***1.2.4.2. Aspectos bioquímicos***

Bioquimicamente, a L-2-HGA caracteriza-se pelo acúmulo persistente de L-2-HG no plasma e no LCR, bem como por elevada excreção urinária deste ácido. A concentração de L-2-HG na urina dos pacientes pode estar de 10 a 300 vezes aumentada. Além disso, aparentemente não existe correlação entre a severidade dos achados clínicos e as concentrações de L-2-HG excretadas na urina dos pacientes afetados por L-2-HGA (Barbot et al., 1997; Steenweg et al., 2010).

O L-2-HG é formado a partir do 2-KG através de uma reação catalisada pela enzima L-malato desidrogenase (L-malDH, EC 1.1.1.37) (Rzem et al., 2007) (Figura 3) que usualmente catalisa a conversão de L-malato a oxaloacetato no ciclo de ácido cítrico. Possivelmente com o objetivo de proteção contra potenciais efeitos tóxicos, o L-2-HG é rapidamente reconvertido a 2-KG pela enzima L-2-HGDH que é considerada por alguns uma enzima de reparo (Van Schaftingen et al., 2008).

#### ***1.2.4.3. Aspectos fisiopatológicos***

Embora a patogênese do dano cerebral nesta doença seja desconhecido, há alguns relatos na literatura demonstrando ações neurotóxicas para o L-2HG. Assim, a exposição de tecidos cerebrais a concentrações elevadas de L-2-HG inibiu significativamente a atividade da creatina kinase em homogeneizado de cerebelo de ratos (da Silva et al., 2003), induziu estresse oxidativo (Latini et al., 2003) e aumentou a

captação de glutamato em sinaptossomas e vesículas sinápticas (Junqueira et al., 2003), indicando possíveis mecanismos fisiopatológicos para a L-2-HG.

### ***1.3. Radicais Livres***

Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (Southorn e Powis, 1988; Halliwell, 2001; Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007a).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente, com incorporação de quatro elétrons, resultando na formação de água ( $H_2O$ ). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido a intermediários reativos como o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), e também a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (Boveris, 1998).

O termo genérico “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do  $O_2$ , como por exemplo, os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), mas também algumas substâncias reativas não- radicais derivados do oxigênio, como o  $H_2O_2$  (Halliwell e Gutteridge, 2007). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) os principais representantes.

As ERO e ERN ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos do organismo. Fisiologicamente, essas espécies reativas são importantes para a função celular (Bergendi et al., 1999). Assim, um aumento eventual da liberação local de radicais livres pode ser benéfico, como é o caso da liberação de espécies tóxicas oxidantes pelos neutrófilos que atuam na defesa do hospedeiro contra uma infecção

(Delanty e Dichter, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2007). As espécies ativas ainda participam de processos de sinalização celular e também estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Por outro lado, quando formadas em excesso, essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas (Maxwell, 1995). Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, os radicais livres podem promover lipoperoxidação (oxidação lipídica), causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), reagir com proteínas, levando à sua inativação e conseqüente alteração de sua função, além de reagir com o DNA e RNA, levando a mutações somáticas e a alterações na transcrição gênica (Delanty e Dichter, 1998; Halliwell e Whiteman, 2004), dentre outros efeitos.

### ***1.3.1. Defesas Antioxidantes***

Para evitar os efeitos danosos das espécies reativas, existem mecanismos eficientes para sua eliminação, como a produção endógena de enzimas antioxidantes e alguns antioxidantes não-enzimáticos. Embora diferindo na sua composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo (Halliwell e Gutteridge, 2007) e compreendem:

- agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase;
- proteínas que diminuem a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo), ao se ligarem aos mesmos, como as transferrinas;
- proteínas que protegem biomoléculas de dano oxidativo por outros mecanismos, como as chaperonas;
- agentes de baixo peso molecular que seqüestram espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como glutatona (GSH),  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina;

### ***1.3.2. Estresse Oxidativo***

Organismos saudáveis em condições normais produzem espécies reativas, que em sua maior parte são controladas pelos sistemas de defesa antioxidante. No entanto, em determinadas condições patológicas pode haver um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes, favorecendo a ocorrência do estresse oxidativo.

Assim, o termo “estresse oxidativo” é usado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis. Pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição que aceleram a produção de algumas espécies reativas, ou então da combinação de quaisquer desses fatores (Halliwell, 2006).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular:

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

um estresse oxidativo. Já na apoptose, o mecanismo intrínseco de morte celular programada é ativado e não há a liberação do conteúdo celular. A apoptose pode estar acelerada em certas doenças, tais como as desordens neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos da administração intraestriatal e intracerebelar *in vivo* do D-2-HG e do L-2-HG sobre parâmetros de estresse oxidativo e sobre a histopatologia em estriado e cerebelo de ratos jovens, no intuito de esclarecer os mecanismos de dano cerebral encontrados nos pacientes afetados pela D-2-HGA e pela L-2-HGA.

### **2.2. Objetivos Específicos**

a) Determinar os efeitos da administração intraestriatal *in vivo* do ácido D-2-HG sobre a peroxidação lipídica e sobre a oxidação de proteínas, medida através dos níveis de malondialdeído (MDA) e formação de carbonilas, respectivamente, em estriado de ratos de 30 dias de vida. Determinar os mesmos parâmetros em estriado e cerebelo de ratos de 30 dias de vida injetados intracerebralmente com o ácido L-2-HG.

b) Determinar os efeitos da administração intraestriatal *in vivo* do ácido D-2-HG sobre as defesas antioxidantes não enzimáticas, medidas pelas concentrações de glutathiona total (tGS), reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) em estriado de ratos de 30 dias de vida. Determinar os mesmos parâmetros em estriado e cerebelo de ratos de 30 dias de vida injetados intracerebralmente com o ácido L-2-HG.

c) Determinar os efeitos da administração intraestriatal *in vivo* do ácido D-2-HG sobre as atividades das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona

redutase (GR), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em estriado de ratos de 30 dias de vida. Determinar os mesmos parâmetros em estriado e cerebelo de ratos de 30 dias de vida injetados intracerebralmente com o ácido L-2-HG.

d) Determinar os efeitos da administração intracerebral *in vivo* do ácido D-2-HG sobre a produção de espécies reativas, medida pela oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e através da avaliação do conteúdo de nitratos e nitritos em estriado de ratos de 30 dias de vida. Determinar a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o conteúdo de nitratos e nitritos em estriado e cerebelo de ratos de 30 dias de vida injetados intracerebralmente com o ácido L-2-HG.

e) Determinar se os antioxidantes melatonina, creatina, solução de ácido ascórbico com  $\alpha$ -tocopherol (Vit C + E), N-acetilcisteína (NAC), maleato de dozolcipina (MK-801) e N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) podem prevenir os efeitos induzidos *in vivo* pelos ácidos D-2-HG e L-2-HG sobre os níveis de malondialdeído (MDA), as concentrações de GSH e as atividades das enzimas antioxidantes GPX, GR, SOD e CAT em estriado de ratos de 30 dias de vida.

f) Determinar os efeitos *in vivo* dos ácidos D-2-HG e L-2-HG sobre a histologia do estriado e do cerebelo (apenas para a administração do L-2-HG) através da coloração com hematoxilina e eosina, e pela imunodeteção da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e da proteína neuronal nuclear específica (NeuN) (apenas para a administração do L-2-HG) em estriado e cerebelo de ratos de 30 dias de vida.

## **PARTE II**

### **Artigos Científicos**

## **PARTE III**

### **Discussão e conclusões**

## DISCUSSÃO

Os ácidos D-2-HG e o L-2-HG estão acumulados em altas concentrações no tecidos e particularmente no cérebro dos pacientes afetados por D-2-HGA e da L-2-HGA, respectivamente (van der Knaap et al., 1999a, 1999b). As manifestações clínicas da D-2-HGA e da L-2-HGA são essencialmente neurológicas, incluindo convulsões, hipotonia, retardo psicomotor e ataxia cerebelar. Daí serem consideradas “acidúrias orgânicas cerebrais”. Os achados neuropatológicos dessas doenças observados em exames de imagem cerebral consistem principalmente em alargamento dos ventrículos laterais com sinais de atraso na maturação cerebral, leucoencefalopatia subcortical, alterações nos gânglios da base e atrofia cerebelar (Steenweg et al., 2010).

Embora o dano estriatal associado à distonia e coreotetose seja comum em pacientes afetados pela D-2-HGA (van der Knaap et al., 1999a, 1999b), os mecanismos patogênicos que ocasionam o comprometimento dos gânglios basais nessa doença ainda permanecem obscuros. Contudo é possível que o D-2-HG seja neurotóxico, já que os pacientes com maior acúmulo desse ácido apresentam sinais neurológicos mais evidentes. Nesse particular, existem evidências *in vitro* indicando que a disfunção da bioenergética mitocondrial e da homeostase redox, bem como a excitotoxicidade, é causada pelo D-2-HG (da Silva et al., 2002; Kölker et al., 2002; Latini et al., 2003, 2005; Wajner et al., 2002; Junqueira et al., 2003). Esses resultados talvez expliquem a acidemia láctica presente em pacientes afetados por essa doença, indicando disfunção mitocondrial (van der Knaap et al., 1999a, 1999b).

A L-2-HGA é caracterizada por manifestações neurológicas progressivas e por anormalidades cerebrais, particularmente nos gânglios basais e no cerebelo (Hoffmann et al., 1994; Kranendijk et al., 2012). Embora os mecanismos responsáveis pela neuropatologia desta doença ainda sejam pouco conhecidos, é possível que o principal

metabólito acumulado nesta acidúria orgânica (L-2-HG) exerça efeitos neurotóxicos nas estruturas cerebrais acometidas nos pacientes. Neste contexto, foi postulado que esse ácido orgânico (L-2-HG), bem com outros ácidos dicarboxílicos se acumulam no cérebro por seu baixo efluxo desse tecido, dando origem à teoria do “trapping” (Sauer et al., 2010). As observações mostrando que a razão das concentrações do L-2-HG no líquido cefalorraquidiano (LCR) / L-2-HG no plasma é maior do que 1, está de acordo com essa teoria (Barth et al., 1992, 1993; Divry et al., 1993; Kranendijk et al., 2012). Na mesma linha de raciocínio, foi postulado que a conversão de L-2-HG em 2-KG através da enzima L-2-hidroxiglutarato desidrogenase funciona como um possível mecanismo de reparo celular para proteção do SNC contra potenciais efeitos tóxicos do L-2-HG (van Schaftingen et al., 2009). Concentrações elevadas de lactato e/ou intermediários do ciclo de Krebs também foram detectados em pacientes afetados pela L-2-HGA (Chen et al., 1996; Barth et al., 1998), indicando comprometimento da função mitocondrial. De fato, estudos *in vitro* anteriores demonstraram que o L-2-HG altera a homeostase energética redox em cérebro de roedores (da Silva et al., 2003; Latini et al., 2003), indicativos de disfunção mitocondrial.

Tendo em vista que não há estudos descrevendo os efeitos da administração *in vivo* do D-2-HG e do L-2-HG sobre sistemas importantes para o funcionamento normal do cérebro, neste trabalho avaliamos os efeitos da administração *in vivo* intraestriatal aguda de D-2-HG em estriado, bem como da administração *in vivo* intraestriatal e intracerebelar aguda de L-2-HG em ratos jovens sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo. A escolha das estruturas cerebrais a serem injetadas com os metabólitos deveu-se ao fato de que as mesmas serem as mais afetadas nos pacientes afetados pela D-2-HGA e L-2-HGA, respectivamente (Craig et al., 1994; van der Knaap et al., 1999a, 1999b; Wajner et al., 2002). Também investigamos se a injeção

desses metabólitos poderia provocar alterações histopatológicas nessas regiões cerebrais, indicando dano tecidual.

A administração *in vivo* de D-2-HG provocou aumento significativo dos níveis de MDA no estriado, corroborando com estudos *in vitro* anteriores que demonstraram efeitos similares em cérebro de ratos (Latini et al., 2003). Sabendo que o MDA é um produto final da oxidação de ácidos graxos insaturados, concluímos que o D-2-HG induz oxidação lipídica *in vivo*. É importante ressaltar que a peroxidação lipídica pode comprometer as membrana lipídicas das células, resultando em alterações na organização das mesmas, bem como na fluidez e na permeabilidade, podendo alterar o transporte de íons e os processos metabólicos (Yadav et al., 2013).

O D-2-HG também induziu dano oxidativo proteico que foi verificado através do aumento da formação de carbonilas (Levine et al., 1994). É possível, portanto, que esses resultados estejam associados à perda de função proteica e formação de agregados proteicos que ocorrem quando proteínas sofrem dano oxidativo através da oxidação de cadeias laterais de resíduos de aminoácidos (Dalle-Donne et al., 2003, 2006; Yao & Rahman, 2011). Não se pode descartar a possibilidade de que o aumento da formação de MDA também esteja envolvida no aumento da carbonilação de proteínas causadas pelo D-2-HG, uma vez que MDA reage rapidamente com grupos nucleofílicos de proteínas carboniladas, tais como lisina, cisteína, histidina, formando adutos (Orioli et al., 2005; Fritz e Petersen, 2012; Fedorova et al., 2014).

Na tentativa de avaliar quais espécies reativas estavam envolvidas no dano oxidativo lipídico e proteico provocado pelo D-2-HG, determinamos a influência da administração intraestriatal do mesmo sobre a oxidação de DCFH, a produção de peróxido de hidrogênio e o conteúdo de nitratos e nitritos. Verificamos que a administração *in vivo* de D-2-HG aumentou significativamente a produção de nitratos e

nitritos (óxido nítrico), sem alterar a oxidação de DCFH e a produção de peróxido de hidrogênio no estriado de ratos. Devemos considerar que a o DCFH detecta predominantemente espécies ativas de oxigênio (ERO), porém também é sensível para espécies ativas de nitrogênio (ERN) (Halliwell and Gutteridge, 2007). Desta forma, concluímos que ERN provavelmente estão envolvidas nos efeitos pró-oxidantes do D-2-HG. Nossos resultados aparentemente não estão de acordo com os descritos por Kölker e colaboradores (2002) que demonstraram que o D-2-HG aumenta a geração de ERO *in vitro* em neurônios de pintos. Contudo, Kölker e colaboradores (2002) utilizaram dihidrorodamina-123 como sonda para detectar ERO que não é seletiva e detecta várias espécies reativas, incluindo peroxinitrito e dióxido de nitrogênio (Halliwell and Gutteridge, 2007). Assim, é possível que o D-2-HG também possa induzir a produção de ERN *in vitro* em cultura de neurônios de pintos.

Outro achado importante do presente estudo foi que o D-2-HG provocou uma redução significativa nas concentrações de GSH e na atividade das enzimas antioxidantes GPx e SOD no estriado. Estes dados indicam um comprometimento das defesas antioxidantes nessa estrutura cerebral. Partindo do fato que o GSH é o antioxidante mais abundante no cérebro e é também considerado um eficiente protetor de grupos sulfidríla, bem como um sequestrador de radicais livres, as concentrações desse antioxidante são utilizadas para avaliar a capacidade de um tecido (cérebro) em prevenir o dano oxidativo associado ao processo de produção de radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 2007). Ao menos, dois mecanismos podem explicar a diminuição dos níveis de GSH. É possível que esta redução seja devido à sua oxidação pelo aumento da geração de espécies ativas, levando à formação de sua forma oxidada (GSSG). Enfatize-se que verificamos um aumento nas concentrações de GSSG, indicando a indução *in vivo* de um estado celular pró-oxidante pelo D-2-HG.

Alternativamente, mudanças na síntese de GSH (Anderson, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2007) ou no seu consumo através de alterações nas atividades das enzimas GPx, GR, glutathione S-transferase e/ou glioxalases (Kalousova et al., 2005; Halliwell e Gutteridge, 2007; Currais e Maher, 2013; More et al., 2013) também devem ser consideradas.

No que se refere à diminuição das atividades enzimáticas da SOD e da GPx causadas pela administração *in vivo* do D-2-HG, é possível que esses achados sejam devido a um ataque oxidativo de espécies reativas em sítios específicos de aminoácidos nas enzimas, causando modificações estruturais que diminuem suas atividades (Singh et al., 2004; Brown, 2010; Viegas et al., 2012). Nossas observações estão de acordo com estudos prévios demonstrando efeitos pró-oxidantes causados pelo D-2-HG em culturas primárias de neurônios de pintos e ratos (Kölker et al., 2002). Porém, é importante enfatizar que os mecanismos precisos responsáveis pela redução da atividade destas enzimas são desconhecidos e podem ainda incluir alterações nos seus mecanismos de síntese e degradação (Seminotti et al., 2012; Cheng et al., 2013).

Também verificamos que o MK-801 (antagonista não competitivo do receptor glutamatérgico NMDA) e o L-NAME (inibidor da enzima óxido nítrico sintase) preveniram totalmente os efeitos induzidos pelo D-2-HG (dano oxidativo lipídico e alteração das defesas antioxidantes), indicando que a ativação dos receptores NMDA pode ser um dos mecanismos pelo qual o D-2-HG induz pelo menos algumas alterações dos parâmetros de estresse oxidativo detectadas no presente estudo. Este fato pode ser devido à similaridade estrutural entre o D-2-HG e o glutamato. Neste contexto, estudos anteriores mostraram uma relação importante entre o D-2-HG e o influxo de cálcio e morte neuronal mediado por receptores NMDA (Kölker et al., 2002). Ainda nesta linha de raciocínio, o aumento de ERN induzido pelo D-2-HG pode ser parcialmente devido

ao aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) pelo elevado influxo de cálcio secundário a estimulação dos receptores NMDA (Ayata et al., 1997; Brown, 2010).

Os resultados do nosso estudo sugerem que ERN são as principais espécies envolvidas nos efeitos pró-oxidantes provocados pelo D-2-HG, já que a oxidação de DCFH e a produção de  $H_2O_2$  não foram alteradas por este ácido orgânico. No entanto, não podemos descartar completamente a possibilidade de que a injeção de D-2-HG também induz formação de ERO, uma vez que a creatina que sequestra ERO também preveniu a peroxidação lipídica induzida *in vitro* por esse ácido (Guimarães-Ferreira et al., 2012). No entanto, enfatize-se que esse antioxidante também é capaz de sequestrar peroxinitrito (Lawler et al., 2002; Sestili et al., 2006, 2011).

Os nossos achados indicam que o D-2-HG provoca estresse oxidativo *in vivo* no estriado de ratos, já que esta condição deletéria ocorre por um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas com um aumento das últimas. Neste caso, é importante ressaltar que o cérebro é altamente suscetível a dano oxidativo, quando comparado a outros tecidos, devido a sua baixa atividade de enzimas antioxidantes, ao consumo de  $O_2$  aumentado, aos elevados níveis de ferro, à estimulação aumentada de receptores glutamatérgicos, à presença de neurotransmissores auto-oxidáveis e ao elevado potencial de peroxidação que se deve ao fato do cérebro possuir um conteúdo elevado de ácidos graxos poli-insaturados (Dalle-Donne et al., 2003; Halliwell and Gutteridge, 2007).

Nossos resultados também sugerem que o comprometimento da homeostase redox causado *in vivo* pelo D-2-HG provavelmente é seletivo para este composto, ao invés de constituir um efeito inespecífico causado por ácidos carboxílicos em geral, uma

vez que uma injeção intraestriatal aguda idêntica de 3-MGT, que é estruturalmente similar ao D-2-HG, não alterou os parâmetros de estresse oxidativo estudados.

Investigamos também se a administração *in vivo* de D-2-HG poderia ocasionar dano cerebral. Para tal, realizamos estudos histopatológicos 12 e 48 h após a injeção de D-2-HG. Nesta análise foram observados vacuolização no estriado após 12 h da injeção, enquanto 48 h após verificamos, além de vacuolização em maior grau, bem como infiltrado linfocítico e macrofágico. Embora não possamos precisar os mecanismos patogênicos que provocaram essas alterações, presumimos que o estado pró-oxidante causado pelo D-2-HG no estriado possa ter contribuído para essas alterações histopatológicas. Nesse contexto, enfatize-se que a formação de vacúolos pode ser ainda secundária a um comprometimento do metabolismo energético (Strauss et al., 2003), à excitotoxicidade (Goodman et al., 1977; Forstner et al., 1999; Hoffmann e Zschocke, 1999), além de ser causado por alterações da homeostase redox (Cubells et al., 1994; Wilt et al., 2000; Saxena et al., 2010). No que se refere ao infiltrado linfocítico e macrofágico, o mesmo também pode estar associado ao estresse oxidativo, uma vez que o recrutamento de leucócitos é típico da resposta inflamatória (neuroinflamação) (Hickey et al., 1991; Mukhtar et al., 2005; Liblau et al., 2013). Linfócitos T ativados e macrófagos podem interagir com astrócitos e micróglia, levando à produção de citocinas que aumentam a resposta inflamatória, com consequente elevação da geração de espécies reativas.

Nesse trabalho também investigamos os efeitos da administração intraestriatal e intracerebelar *in vivo* do L-2-HG sobre os mesmos parâmetros de estresse oxidativo e histopatologia no estriado e cerebelo dos animais. Observamos que a administração intracerebral *in vivo* de L-2-HG em ratos jovens provoca o comprometimento da

homeostase redox e causa importantes alterações histopatológicas nessas estruturas cerebrais.

Inicialmente observamos que a injeção de L-2-HG provocou oxidação lipídica, verificada através do aumento dos níveis de malondialdeído, em ambas as estruturas cerebrais, corroborando com resultados prévios *in vitro* demonstrando que esse ácido orgânico aumenta os níveis de MDA no cérebro de ratos (Latini et al., 2003). Foi também constatado que as defesas antioxidantes no estriado e no cerebelo foram marcadamente reduzidas pela administração *in vivo* do L-2-HG. Tal conclusão baseou-se na diminuição das concentrações de GSH, o principal antioxidante cerebral, e o concomitante aumento da sua forma oxidada (GSSG). Além disso, o L-2-HG também diminuiu as atividades das enzimas antioxidantes GPx e GR no estriado e cerebelo. A diminuição da atividade da GR causada pelo L-2-HG pode levar secundariamente à diminuição de GSH, uma vez que essa enzima é importante para a reciclagem de GSH e para a manutenção da razão GSH/GSSG. Além disso, podemos supor que a redução da atividade da GPx poderia, ao menos parcialmente, ser devido à menor concentração de GSH, substrato da enzima. Nossas observações de dano oxidativo lipídico e de redução das defesas antioxidantes provavelmente são devidas ao estímulo na produção de espécies reativas, visto que o D-2-HG provocou um aumento da oxidação de DCFH e na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por outro lado, esse metabólito não aumentou a formação de nitratos e nitritos. Portanto, é provável que as alterações verificadas na homeostase redox sejam mediadas por ERO.

Outras observações em nossa investigação foi que os antioxidantes MEL, Vit E + C e creatina preveniram o dano oxidativo lipídico e a redução das defesas antioxidantes não enzimáticas (GSH) e enzimáticas (atividades da GPx e GR) provocados pelo L-2-HG, sugerindo que esses efeitos ocorreram devido à geração

excessiva de radicais hidroxila e peroxila que são sequestradas por esses antioxidantes (Reiter et al., 2001; Halliwell and Gutteridge, 2007). Por outro lado, o MK-801 e o L-NAME não foram capazes de prevenir o dano oxidativo e a redução das defesas antioxidantes induzidos pelo L-2-HG, indicando que os efeitos pró-oxidantes provocados por esse ácido orgânico não foram mediados por receptores NMDA e por ERN, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com nossos resultados demonstrando que a formação de nitratos e nitritos não foi estimulada pelo L-2-HG.

Por outro lado, o L-2-HG não alterou significativamente a formação de carbonilas no estriado e no cerebelo, sugerindo que o esse composto não provoca dano oxidativo proteico. Essas observações, aliadas ao dano oxidativo lipídico induzido pelo L-2-HG, podem ser devidas a um efeito seletivo das espécies reativas sobre componentes proteicos e lipídicos celulares (Dalle-Done et al., 2003; Leipnitz et al., 2010).

Enfatize-se aqui que os efeitos pró-oxidantes causados pelo L-2-HG foram seletivas e não devidas a ações inespecíficas de ácidos carboxílicos em geral, uma vez que a administração idêntica de L-HMV, um ácido carboxílico quimicamente similar ao L-2-HG, não alterou os parâmetros de estresse oxidativo no estriado de ratos.

A análise histopatológica realizada no estriado sete dias após a injeção de L-2-HG evidenciou uma extensa vacuolização, infiltrado linfocítico e macrofágico, corpos granulares eosinofílicos e necrose. A administração de L-2-HG também causou astrogliose (aumento da imunodeteção de GFAP) e perda da população neuronal (diminuição da imunodeteção de NeuN) no estriado de ratos. Além disso, intenso infiltrado macrofágico associado a pequena vacuolização e a um pequeno infiltrado linfocítico foram observados no cerebelo após a administração de L-2-HG. Contudo, não foram encontrados corpos granulares eosinofílicos, astrogliose e perda da população

neuronal no cerebelo de ratos injetados com L-2-HG. No que se refere à fisiopatologia dos achados histopatológicos, presumimos que os mesmos possam ter sido ao menos causados pelo estado pró-oxidante causado por esse ácido orgânico.

Nossos achados demonstrando alterações histopatológicas menos severas no cerebelo quando comparadas àquelas observadas no estriado não podem ser atribuídos às concentrações de L-2-HG detectadas nessas estruturas cerebrais (4.46 mM no estriado e 6.96 mM no cerebelo), porém indicam que o estriado parece ser mais vulnerável aos efeitos deletérios do L-2-HG.

Não podemos estabelecer, até o presente momento, a relevância fisiopatológica dos nossos resultados uma vez que as concentrações cerebrais de D-2-HG e L-2-HG na D-2-HGA e na L-2-HGA, respectivamente, permanecem desconhecidas. Porém, salientamos que o D-2-HG e o L-2-HG se acumulam em grandes quantidades no cérebro, onde são produzidos e acumulados pelo baixo efluxo do cérebro (Sauer et al., 2010). Além disso, considerando que os níveis de L-2-HG de aproximadamente 4.5 mM e 7 mM foram encontradas no estriado e no cerebelo, respectivamente, após a sua administração e também devido ao fato de que o ácido glutárico que se encontra acumulado na acidemia glutárica do tipo I, outra acidemia orgânica cerebral, pode ultrapassar níveis superiores a 8 mM no cérebro, causando degeneração estriatal (Sauer et al., 2006), presumimos que nossos achados possam contribuir para explicar a neuropatologia do dano cerebral na L-2-HGA. Também devemos levar em consideração que espécies reativas são capazes de oxidar uma grande variedade de moléculas, incluindo lipídeos, proteínas, açúcares e DNA numa cascata patogênica podendo resultar em morte celular apoptótica ou necrótica (Kroemer e Reed, 2000; Nizuma et al., 2009; Circu e Aw, 2010). Portanto, sugerimos que nossos presentes resultados,

demonstrando que o D-2-HG e o L-2-HG comprometem a homeostase redox *in vivo* no cérebro, possam contribuir para a patogênese da D-2-HGA.

Concluindo, este foi o primeiro trabalho demonstrando que a administração *in vivo* de D-2-HG compromete a homeostase redox com o possível envolvimento dos receptores NMDA, bem como provoca anormalidades histopatológicas no estriado. Especulamos que a estimulação exacerbada dos receptores glutamatérgicos NMDA ocasionada pelo D-2-HG poderia resultar no dano estriatal encontrado na D-2-HGA através do ataque de espécies reativas, como ocorre de maneira semelhante em doenças neurodegenerativas como Parkinson (Nash et al., 1999; Calabresi et al., 2000). Finalmente, propomos que antioxidantes direcionados à mitocôndria ou antagonistas específicos de subunidades dos receptores NMDA, bloqueando os efeitos excitotóxicos sem interferir na função fisiológica da neurotransmissão (Suzuki et al., 2010; Réus et al., 2012), poderiam ser utilizados como futuras terapias adjuvantes para a D-2-HGA.

Além disso, também demonstramos pela primeira vez o comprometimento da homeostase redox e as alterações histopatológicas provocadas *in vivo* pela administração de L-2-HG no estriado e no cerebelo de ratos jovens. Sendo assim, propusemos que o estresse oxidativo pode ser responsável pelos achados neurodegenerativos e, portanto, representar um mecanismo importante do dano cerebral na L-2-HGA. Constatamos que concentrações cerebrais elevadas de L-2-HG comprometem as defesas antioxidantes, induzem a formação de ERO e dano oxidativo lipídico nas principais estruturas cerebrais afetadas nos pacientes com L-2-HGA. Neste particular, um estudo recente evidenciou elevadas concentrações de MDA e a redução das enzimas antioxidantes GPx e SOD no sangue de pacientes afetados pela L-2-HGA (Jellouli et al., 2014), reforçando o papel do comprometimento da homeostase redox na neuropatologia da L-2-HGA. Todavia, não podemos descartar outros possíveis

mecanismos de dano cerebral, tais como a excitotoxicidade causada pelo L-2-HG, devido a sua similaridade ao glutamato, o neurotransmissor mais importante do SNC. Porém, nossos dados demonstram que o MK-801 não foi capaz de prevenir as alterações dos parâmetros de estresse oxidativo, além de estudos anteriores que determinaram que o L-2-HG não desempenha efeitos excitotóxicos (Junqueira et al., 2003). Finalmente, outros estudos in vitro demonstraram que o L-2-HG é capaz de alterar o metabolismo energético (da Silva et al., 2003), fato que também pode contribuir para a neurotoxicidade deste metabólito. Portanto, podemos também propor a administração de antioxidantes e mesmo compostos que melhoram o estado energético celular como a creatina como terapia potencial para os pacientes afetados pela L-2-HGA.

## CONCLUSÕES

A. A administração aguda intraestriatal de D-2-HG (2.5  $\mu$ mol) em ratos jovens provoca:

1. Aumento significativo dos níveis de MDA (dano oxidativo lipídico) e da formação de carbonilas (dano oxidativo proteico) no estriado.
2. Diminuição significativa das defesas antioxidantes, determinadas pela diminuição das concentrações de GSH e das atividades das enzimas GPX e SOD no estriado.
3. Aumento de espécies reativas de nitrogênio (determinado pelo aumento do conteúdo de nitratos e nitritos), sem alterar a formação de espécies reativas de oxigênio (oxidação de DCFH e produção de  $H_2O_2$  inalteradas) no estriado.

4. O MK-801 e L-NAME preveniram o dano oxidativo lipídico e a diminuição das defesas antioxidantes no estriado, indicando que o dano oxidativo possa ter ocorrido através da estimulação de receptores NMDA e consequente estimulação da enzima óxido nítrico sintase e produção de óxido nítrico.
5. As alterações histopatológicas (vacuolização, infiltrado linfocítico e macrofágico) 12 e 48 h após a injeção estão possivelmente associadas, ao menos em parte, ao aumento da geração de espécies reativas de nitrogênio no estriado.
6. As alterações de homeostase redox causadas pelo D-2-HG foram seletivas, visto que o 3-MGT (estruturalmente similar ao D-2-HG) não alterou nenhum dos parâmetros de estresse oxidativo no estriado.

**B.** A administração aguda intracerebral de L-2-HG (2.5  $\mu$ mol) em ratos jovens provoca:

1. Aumento significativo dos níveis de MDA (dano oxidativo lipídico) sem alterar a formação de carbonilas (dano oxidativo proteico ausente) no estriado e no cerebelo.
2. Diminuição significativa das defesas antioxidantes não enzimáticas (GSH) e enzimáticas (atividades da GPx e GR), além de aumentar os níveis de GSSG no estriado e cerebelo.
3. Aumento de espécies reativas de oxigênio (determinado pelo aumento da oxidação de DCFH e da produção de  $H_2O_2$ ), sem alterar a formação de espécies

reativas de nitrogênio (conteúdo de nitratos e nitritos inalterado) em ambas as estruturas cerebrais.

4. Dano oxidativo causado provavelmente por radicais peroxila e hidroxila, já que os antioxidantes sequestradores desses radicais livres melatonina, creatina e uma mistura de Vit C + E preveniram a peroxidação lipídica e a diminuição das defesas antioxidantes no estriado.
5. Alterações histopatológicas no estriado (vacuolização, infiltrado linfocítico e macrofágico, necrose, astrogliose e perda neuronal) e no cerebelo (vacuolização, infiltrado linfocítico e macrofágico) que possivelmente estão associadas ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio.
6. As alterações de homeostase redox causadas pelo L-2-HG foram seletivas, visto que o 3-MGT (L-HMV (estruturalmente similar ao L-2-HG) não alterou nenhum dos parâmetros no estriado.

Como conclusão geral, propomos que alterações da homeostase redox estejam envolvidas com o dano estriatal provocado pelo D-2-HG e pelos danos estriatal e cerebelar provocado pelo L-2-HG, de tal forma que a neuropatologia das D-2-HGA e L-2-HGA podem ser parcialmente explicadas por aumento de espécies ativas devido aos principais compostos acumulados nessas doenças.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Anderson ME (1998), Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact* 111-112:1-14.

Ayata C, Ayata G, Hara H, Matthews RT, Beal MF, Ferrante RJ, Endres M, Kim A, Christie RH, Waeber C, Huang PL, Hyman BT, Moskowitz MA (1997), Mechanisms of reduced striatal NMDA excitotoxicity in type I nitric oxide synthase knock-out mice. *J Neurosci* 17:6908-6917.

Barbot, C., Fineza, I., Diogo, L., Maia, M., Melo, J., Guimaraes, A., Pires, M.M., Cardoso, M.L., Vilarinho, L., 1997. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: clinical, biochemical and magnetic resonance imaging in six Portuguese pediatric patients. *Brain Dev* 19:268-273.

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

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

Barth, P.G., Hoffmann, G.F., Jaeken, J., Lehnert, W., Hanefeld, F., van Gennip, A.H., Duran, M., Valk, J., Schutgens, R.B., Trefz, F.K., et al., 1992. L-2-hydroxyglutaric acidemia: a novel inherited neurometabolic disease. *Ann Neurol* 32:66-71.

Barth, P.G., Hoffmann, G.F., Jaeken, J., Wanders, R.J., Duran, M., Jansen, G.A., Jakobs, C., Lehnert, W., 1993. L-2-hydroxyglutaric acidemia: clinical and biochemical

findings in 12 patients and preliminary report on L-2-hydroxyacid dehydrogenase. *J Inherit Metab Dis* 16:753-761.

Barth, P.G., Wanders, R.J., Scholte, H.R., Abeling, N., Jakobs, C., Schutgens, R.B., Vreken, P., 1998. L-2-hydroxyglutaric aciduria and lactic acidosis. *J Inherit Metab Dis* 21:251-254.

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

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

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

Brown GC (2010), Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 23:153-165.

Calabresi P, Centonze D, Bernardi G (2000), Cellular factors controlling neuronal vulnerability in the brain: a lesson from the striatum. *Neurology* 55:1249-1255.

Calì T, Ottolini D, Brini M (2012), Mitochondrial Ca(2+) as a key regulator of mitochondrial activities. *Adv Exp Med Biol* 942:53-73.

Chalmers RA, Lawson AM, Watts RW et al (1980) D-2-hydroxyglutaric aciduria: case report and biochemical studies. *J Inherit Metab Dis* 3:11–15.

Chalmers, RA, Lawson, AM (1982), Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias, vol. Chapman & Hall, London.

Chen, E., Nyhan, W.L., Jakobs, C., Greco, C.M., Barkovich, A.J., Cox, V.A., Packman, S., 1996. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: neuropathological correlations and first report of severe neurodegenerative disease and neonatal death. *J Inherit Metab Dis* 19:335-343.

Cheng X, Ku CH, Siow RC (2013), Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis. *Free Radic Biol Med* 64:4-11.

Circu ML, Aw TY (2010), Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48:749-762.

Craigden WJ, Jakobs C, Sekul EA, Levy ML, Gibson KM, Butler IJ, Herman GE (1994), D-2-hydroxyglutaric aciduria in neonate with seizures and CNS dysfunction. *Pediatr Neurol* 10:49-53.

Cubells JF, Rayport S, Rajendran G, Sulzer D (1994), Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. *J Neurosci* 14:2260-22671.

Currais A, Maher P (2013), Functional consequences of age-dependent changes in glutathione status in the brain. *Antioxid Redox Signal* 19:813-822.

da Silva CG, Ribeiro CA, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Sarkis JJ, Jakobs C, Wajner M (2002), Inhibition of cytochrome c oxidase activity in rat cerebral cortex and human skeletal muscle by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1586:81-91.

da Silva, C.G., Bueno, A.R., Schuck, P.F., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A., Wannmacher, C.M., Wyse, A.T., Wajner, M., 2003. L-2-hydroxyglutaric acid inhibits mitochondrial creatine kinase activity from cerebellum of developing rats. *Int J Dev Neurosci* 21:217-224.

da Silva CG, Bueno AR, Schuck PF, Leipnitz G, Ribeiro CA, Rosa RB, Dutra Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M (2004), Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Neurochem Int* 44:45-52.

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003), Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 9:169-176.

Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2006), Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 10:389-406.

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

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

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

Divry, P., Jakobs, C., Vianey-Saban, C., Gibson, K.M., Michelakakis, H., Papadimitriou, A., Divari, R., Chabrol, B., Cournelle, M.A., Livet, M.O., 1993. L-2-hydroxyglutaric aciduria: two further cases. *J Inher Metab Dis* 16:505-507.

Duran, M., Kamerling, J.P., Bakker, H.D., van Gennip, A.H., Wadman, S.K., 1980. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: an inborn error of metabolism? *J Inher Metab Dis* 3:109-112.

Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R (2014), Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev* 33:79-97.

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

Forstner R, Hoffmann GF, Gassner I, Heideman P, De Klerk JB, Lawrenz-Wolf B, Doringe E, Weiss-Wichert P, Troger J, Colombo JP, Plochl E (1999), Glutaric aciduria type I: ultrasonographic demonstration of early signs. *Pediatr Radiol* 29:138-143.

Fritz KS, Petersen DR (2012), An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. *Free Radic Biol Med* 59:85-91.

Gibson KM, Ten Brink HJ, Schor DS et al (1993) Stable-isotope dilution analysis of D- and L-2-hydroxyglutaric acid: application to the detection and prenatal diagnosis of D- and L-2-hydroxyglutaric acidemias. *Pediatr Res* 34:277–280.

Goodman SI, Norenberg MD, Shikes RH, Breslich DJ, Moe PG (1977), Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. *J Pediatr* 90:746-750.

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

Guemez-Gamboa A, Estrada-Sánchez AM, Montiel T, Páramo B, Massieu L, Morán J (2011), Activation of NOX2 by the stimulation of ionotropic and metabotropic glutamate receptors contributes to glutamate neurotoxicity in vivo through the production of reactive oxygen species and calpain activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:1020-1035.

Guimarães-Ferreira L, Pinheiro CH, Gerlinger-Romero F, Vitzel KF, Nachbar RT, Curi R, Nunes MT (2012), Short-term creatine supplementation decreases reactive oxygen species content with no changes in expression and activity of antioxidant enzymes in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 112:3905-3911.

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

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

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007), Measurement of reactive species. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth edition (Halliwell B, Gutteridge JMC, eds), pp. 268-340. Oxford University Press, Oxford.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004 May;142(2):231-55.

Hickey WF, Hsu BL, Kimura H (1991), T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28:254–260.

Hoffmann GF, Seppel CK, Holmes B, Mitchell L, Christen HJ, Hanefeld F, Rating D, Nyhan WL (1993), Quantitative organic acid analysis in cerebrospinal fluid and plasma: reference values in a pediatric population. *J Chromatogr* 617:1-10.

Hoffmann, GF, Gibson, KM, Trefz, FK, Nyhan, WL, Bremer, HJ, Rating, D (1994), Neurological manifestations of organic acid disorders. *Eur J Pediatr* 153:S94-100

Hoffmann GF, Zschocke J 1999), Glutaric aciduria type I: from clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy. *J Inherit Metab Dis* 22:381-391.

Hoffmann GF, von Kries R, Klose D, Lindner M, Schulze A, Muntau AC, Röschinger W, Liebl B, Mayatepek E, Roscher AA (2004), Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur J Pediatr* 163(2):76-80.

Janetzky, B., Hauck, S., Youdim, M.B.H., Riederer, P., Jellinger, K., Pantucek, F., Zochling, R., Boissl, K.W., Reichmann, H. Unaltered aconitase activity but decreased

complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 169: 126-128, 1994.

Jellouli, N.K., Hadj Salem, I., Ellouz, E., Kamoun, Z., Kamoun, F., Tlili, A., Kaabachi, N., Triki, C., Fakhfakh, F., 2014. Founder effect confirmation of c.241A>G mutation in the L2HGDH gene and characterization of oxidative stress parameters in six Tunisian families with L-2-hydroxyglutaric aciduria. *J Hum Genet* 59:216-222.

Junqueira, D., Brusque, A.M., Porciúncula, L.O., Rotta, L.N., Ribeiro, C.A., Frizzo, M.E., Dutra Filho, C.S., Wannmacher, C.M., Wyse, A.T., Souza, D.O., Wajner, M., 2003. Effects of L-2-hydroxyglutaric acid on various parameters of the glutamatergic system in cerebral cortex of rats. *Metab Brain Dis* 18:233-243.

Junqueira D, Brusque AM, Porciúncula LO, Rotta LN, Frizzo ME, Wyse AT, Wannmacher CM, Souza DO, Wajner M (2004), In vitro effects of D-2-hydroxyglutaric acid on glutamate binding, uptake and release in cerebral cortex of rats. *J Neurol Sci* 217:189-194.

Kalousová M, Zima T, Tesar V, Dusilová-Sulková S, Skrha J (2005), Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mutat Res* 579:37-46.

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

Kölker S, Pawlak V, Ahlemeyer B, Okun JG, Hörster F, Mayatepek E, Krieglstein J, Hoffmann GF, Köhr G (2002), NMDA receptor activation and respiratory chain complex V inhibition contribute to neurodegeneration in d-2-hydroxyglutaric aciduria. *Eur J Neurosci* 16:21-28.

Kranendijk M, Struys EA, Gibson KM et al (2010a) Evidence for genetic heterogeneity in D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Hum Mutat* 31:279–283.

Kranendijk M, Struys EA, van Schaftingen E, Gibson KM, Kanhai WA, van der Knaap MS, Amiel J, Buist NR, Das AM, de Klerk JB, Feigenbaum AS, Grange DK, Hofstede FC, Holme E, Kirk EP, Korman SH, Morava E, Morris A, Smeitink J, Sukhai RN, Vallance H, Jakobs C, Salomons GS (2010b), IDH2 mutations in patients with D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Science* 330:336.

Kranendijk M, Salomons GS, Gibson KM, Van Schaftingen E, Jakobs C, Struys EA (2011) A lymphoblast model for IDH2 gain-of-function activity in D-2-hydroxyglutaric aciduria type II: novel avenues for biochemical and therapeutic studies. *Biochim Biophys Acta* 1812:1380–1384.

Kranendijk M, Struys EA, Salomons GS, van der Knaap MS, Jakobs C (2012), Progress in understanding 2-hydroxyglutaric acidurias. *J Inherit Metab Dis* 35:571-587.

Kroemer G, Reed JC (2000), Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6:513-519.

Latini A, Scussiato K, Rosa RB, Llesuy S, Belló-Klein A, Dutra-Filho CS, Wajner M (2003), D-2-hydroxyglutaric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Eur J Neurosci* 17:2017-2022.

Latini A, da Silva CG, Ferreira GC, Schuck PF, Scussiato K, Sarkis JJ, Dutra Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M (2005), Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab* 86:188-199.

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

Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W (2002), Demaree S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 290:47-52.

Leipnitz, G., da Silva, L. de B., Fernandes, C.G., Seminotti, B., Amaral, A.U., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., 2010. d-Serine administration provokes lipid oxidation and decreases the antioxidant defenses in rat striatum. *Int J Dev Neurosci* 28:297-301.

Levine RL, Williams JA, Stadman ER, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346–357.

Liblau RS, Gonzalez-Dunia D, Wiendl H, Zipp F (2013), Neurons as targets for T cells in the nervous system. *Trends Neurosci* 36:315-324.

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

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

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

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

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

Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG (1997) A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J Immunol Methods* 202(2):133–141

More SS, Vartak AP, Vince R (2013), Restoration of glyoxalase enzyme activity precludes cognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci* 4:330-338.

Nash JE, Hill MP, Brotchie JM (1999), Antiparkinsonian actions of blockade of NR2B-containing NMDA receptors in the reserpine-treated rat. *Exp Neurol* 155:42-48.

Nizuma K, Endo H, Chan PH (2009), Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem* 109:133-138.

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

Orioli M, Aldini G, Beretta G, Facino RM, Carini M (2005), LC-ESI-MS/MS determination of 4-hydroxy-trans-2-nonenal Michael adducts with cysteine and histidine-containing peptides as early markers of oxidative stress in excitable tissues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 827:109–118

Pospíšilová E, Mrázová L, Hrdá J, Martincová O, Zeman J (2003), Biochemical and molecular analyses in three patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *J Inherit Metab Dis* 26:433-441.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester, LC, Qi W (2001) Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 34:237–256.

Réus GZ, Abelaira HM, Stringari RB, Fries GR, Kapczinski F, Quevedo J (2012), Memantine treatment reverses anhedonia, normalizes corticosterone levels and increases BDNF levels in the prefrontal cortex induced by chronic mild stress in rats. *Metab Brain Dis* 27:175-182.

Ribeiro CAJ, Balestro F, Grando V, Wajner M (2007) Isovaleric acid reduces Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27: 529-540.

Rose CD, Henneberry RC (1994) Etiology of the neurodegenerative disorders: a critical analysis. *Neurobiol. Aging* 15: 233-234.

Rosenthal RE, Hamud F, Fiskum G, Varghese PJ, Sharpe S (1987), Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:752–758.

Rzem R, Veiga-da-Cunha M, Noel G et al (2004) A gene encoding a putative FAD-dependent L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase is mutated in L-2-hydroxyglutaric aciduria. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16849–16854

Rzem R, Vincent MF, Van Schaftingen E, Veiga-da-Cunha M (2007) L-2-hydroxyglutaric aciduria, a defect of metabolite repair. *J Inherit Metab Dis* 30:681–689

Samuraki M, Komai K, Hasegawa Y et al (2008) A successfully treated adult patient with L-2-hydroxyglutaric aciduria. *Neurology* 70:1051–1052

Sauer S, Okun JG, Fricker G, Mahringer A, Müller I, Crnic LR, Mühlhausen C, Hoffmann GF, Hörster F, Goodman SI, et al. (2006) Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Neurochem* 97(3):899-910.

Sauer SW, Opp S, Mahringer A, Kamiński MM, Thiel C, Okun JG, Fricker G, Morath MA, Kölker S (2010), Glutaric aciduria type I and methylmalonic aciduria: simulation of cerebral import and export of accumulating neurotoxic dicarboxylic acids in in vitro models of the blood-brain barrier and the choroid plexus. *Biochim Biophys Acta* 1802:552-560.

Saxena G, Bharti S, Kamat PK, Sharma S, Nath C (2010), Melatonin alleviates memory deficits and neuronal degeneration induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 94:397-403.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*. 1: 1269.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark, JB, Marsden CD (1990a) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 54: 823-827.

Schapira AHV, Mann VM, Cooper JM, Dexter D, Daniel SE, Jenner P, Clark JB, Marsden CD (1990b) Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 55: 2142-2145.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. (2001) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8<sup>a</sup> edition. New York, McGraw-Hill, pp. 3-45.

Seminotti B, da Rosa MS, Fernandes CG, Amaral AU, Braga LM, Leipnitz G, de Souza DO, Woontner M, Koeller DM, Goodman S, Wajner M (2012) Induction of oxidative stress in brain of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice by acute lysine administration. *Mol Genet Metab* 106:31-38.

Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, Battistelli M, Falcieri E, Agostini D, Gioacchini AM, Stocchi V (2006) Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 40:837-849.

Sestili P, Martinelli C, Colombo E, Barbieri E, Potenza L, Sartini S, Fimognari C (2011), Creatine as an antioxidant. *Amino Acids* 40:1385-1396.

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

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

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

Smith CD, Carney JM, Starke-Reed, PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 10540-10543.

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

Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF (2004), Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* 24:7779-7788.

Steenweg ME, Jakobs C, Errami A, van Dooren SJ, Adeva Bartolomé MT, Aerssens P, Augoustides-Savvapoulou P, Baric I, Baumann M, Bonafé L, et al. (2010) An overview of L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene (L2HGDH) variants: a genotype-phenotype study. *Hum Mutat* 31:380-390.

Strauss KA, Morton DH (2003), Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 121:53-70.

Struys EA, Jansen EE, Verhoeven NM, Jakobs C (2004) Measurement of urinary D- and L-2-hydroxyglutarate enantiomers by stable-isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry after derivatization with diacetyl-L-tartaric anhydride. *Clin Chem* 50:1391-1395

Struys EA, Verhoeven NM, Ten Brink HJ, Wickenhagen WV, Gibson KM, Jakobs C (2005) Kinetic characterization of human hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase: relevance to D-2-hydroxyglutaric and gamma-hydroxybutyric acidurias. *J Inher Metab Dis* 28:921–930

Struys EA, Salomons GS, Achouri Y, van Schaftingen E, Grosso S, Craigen WJ, Verhoeven NM, Jakobs C (2005b), Mutations in the D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene cause D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Am J Hum Genet* 76:358–360.

Suzuki Y, Kure S, Oota M, Hino H, Fukuda M (2010), Nonketotic hyperglycinemia: proposal of a diagnostic and treatment strategy. *Pediatr Neurol* 43:221-224.

Sweetman, L., 1991. Organic acid analysis. In: Hommes FA, editors. *Techniques in Diagnostic. Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*. New York: Wiley-Liss, p 143.

Teare JP, PUNCHARD NA, POWELL JJ, LUMB PJ, MITCHELL WD, THOMPSON RPH (1993), Automated spectrophotometric method for determining oxidized and reduced glutathione in liver. *Clin Chem* 39:686-689.

Topcu M, Jobard F, Halliez S et al (2004) L-2-Hydroxyglutaric aciduria: identification of a mutant gene C14orf160, localized on chromosome 14q22.1. *Hum Mol Genet* 13:2803–2811

Topcu M, Aydin OF, Yalcinkaya C et al (2005) L-2-hydroxyglutaric aciduria: a report of 29 patients. *Turk J Pediatr* 47:1–7

Tretter L, Adam-Vizi V (2004), Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci* 24:7771-7778.

Tretter L, Takacs K, Kövér K, Adam-Vizi V (2007), Stimulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by calcium in brain mitochondria respiring on alpha-glycerophosphate. *J Neurosci Res* 85:3471-3479.

van der Knaap MS, Jakobs C, Hoffmann GF, Nyhan WL, Renier WO, Smeitink JA, Catsman-Berrevoets CE, Hjalmarson O, Vallance H, Sugita K, Bowe CM, Herrin JT, Craigen WJ, Buist NR, Brookfield DS, Chalmers RA (1999a), D-2-Hydroxyglutaric aciduria: biochemical marker or clinical disease entity? *Ann Neurol* 45:111-119.

van der Knaap MS, Jakobs C, Hoffmann GF, Duran M, Muntau AC, Schweitzer S, Kelley RI, Parrot-Roulaud F, Amiel J, De Lonlay P, Rabier D, Eeg-Olofsson O (1999b), D-2-Hydroxyglutaric aciduria: further clinical delineation. *J Inherit Metab Dis* 22:404-413.

Van Schaftingen E, Rzem R, Veiga-da-Cunha M (2008) L-2-Hydroxyglutaric aciduria, a disorder of metabolite repair. *J Inherit Metab Dis* 32:135–142

Van Schaftingen E, Rzem R, Veiga-da-Cunha M (2009) L: -2-Hydroxyglutaric aciduria, a disorder of metabolite repair. *J Inherit Metab Dis* 32:135-142.

Viegas CM, Tonin AM, Zanatta A, Seminotti B, Busanello EN, Fernandes CG, Moura AP, Leipnitz G, Wajner M (2012), Impairment of brain redox homeostasis caused by the major metabolites accumulating in hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome in vivo. *Metab Brain Dis* 27:521-530.

Wajner M, Vargas CR, Funayama C, Fernandez A, Elias ML, Goodman SI, Jakobs C, van der Knaap MS (2002), D-2-Hydroxyglutaric aciduria in a patient with a severe clinical phenotype and unusual MRI findings. *J Inherit Metab Dis* 25:28-34.

Wajner M, Coelho D de M, Ingrassia R, de Oliveira AB, Busanello EN, Raymond K, et al. (2009) Selective screening for organic acidemias by urine organic acid GC-MS analysis in Brazil: fifteen- year experience. *Clin Chim Acta* 400:77 – 81.

Wickenhagen WV, Salomons GS, Gibson KM, Jakobs C, Struys EA (2009) Measurement of D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase activity in cell homogenates derived from D-2-hydroxyglutaric aciduria patients. *J Inherit Metab Dis* 32:264–268

Wilt SG, Dugger NV, Hitt ND, Hoffman PM (2000), Evidence for oxidative damage in a murine leukemia virus-induced neurodegeneration. *J Neurosci Res* 62:440-450.

Wortmann SB, Duran M, Anikster Y, Barth PG, Sperl W, Zschocke J, Morava E, Wevers RA (2013a), Inborn errors of metabolism with 3-methylglutaconic aciduria as discriminative feature: proper classification and nomenclature. *J Inherit Metab Dis*. In press.

Wortmann SB, Kluijtmans LA, Rodenburg RJ, Sass JO, Nouws J, van Kaauwen EP, Kleefstra T, Tranebjaerg L, de Vries MC, Isohanni P, Walter K, Alkuraya FS, Smuts I, Reinecke CJ, van der Westhuizen FH, Thorburn D, Smeitink JA, Morava E, Wevers RA (2013b), 3-Methylglutaconic aciduria-lessons from 50 genes and 977 patients. *J Inherit Metab Dis*. In press.

Yadav UC, Ramana KV (2013), Regulation of NF- $\kappa$ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev*. In press.

Yao H, Rahman I (2011) Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 254:72-85.

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