

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

RAFAEL TEIXEIRA RIBEIRO

**INVESTIGAÇÃO SOBRE OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBRAL
DO ÁCIDO D-2-HIDROXIGLUTÁRICO SOBRE A HOMEOSTASE REDOX E
HISTOPATOLOGIA EM CÉREBRO DE RATOS NEONATOS**

Porto Alegre

2019

RAFAEL TEIXEIRA RIBEIRO

**INVESTIGAÇÃO SOBRE OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO
INTRACEREBRAL DO ÁCIDO D-2-HIDROXIGLUTÁRICO SOBRE A
HOMEOSTASE REDOX E HISTOPATOLOGIA EM CÉREBRO DE RATOS
NEONATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: **Prof. Dr. MOACIR
WAJNER**

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Ribeiro, Rafael Teixeira
INVESTIGAÇÃO SOBRE OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO
INTRACEREBRAL DO ÁCIDO D-2-HIDROXIGLUTÁRICO SOBRE A
HOMEOSTASE REDOX E HISTOPATOLOGIA EM CÉREBRO DE RATOS
NEONATOS / Rafael Teixeira Ribeiro. -- 2019.
56 f.
Orientador: Moacir Wajner.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Acidúria D-2-hidroxiglutárica . 2. Estresse
Oxidativo . 3. Histopatologia. I. Wajner, Moacir,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“[...] para partilhar a sua parte do segredo do céu: que cada vida afeta a outra, e a outra afeta a seguinte, e que o mundo está cheio de histórias, mas todas as histórias são uma só”

(Mitch Albom, “As Cinco Pessoas que você Encontra no Céu”)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por me proporcionar formação gratuita e de excelência.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPERGS, pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Bioquímica, por fornecer todo o suporte necessário para o desenvolvimento desse trabalho e aos funcionários e professores por todo o profissionalismo e competência.

Ao meu orientador professor Moacir, por todos ensinamentos, incentivo, carinho e respeito que venho recebendo ao longo dos últimos anos.

À Bianca Seminotti, ou simplesmente Bi, por toda a ajuda, paciência, trabalho duro e por partilhar da sua experiência de bancada, conhecimento e amizade que vem sendo essencial na minha formação como pesquisador.

À querida Ânge, que me ajudou no começo deste projeto e que com sua amizade tornou as longas 6 horas de espera momentos mais divertidos e leves.

Ao Alexandre, pela ajuda em estabelecer o modelo de injeção neonatal e estar sempre disposto a ajudar.

À Cris, e mais recentemente, a Ana, pelo companheirismo no dia a dia do laboratório e pelas risadas compartilhadas.

Aos colegas do laboratório 27, Mateus, Bel, Léo, Nevton e Júlia que juntamente ao professor Guilhian estão sempre dispostos a ajudar.

À Marcelle, Tai, Dani e Chêrla, amigas que a Faculdade de Farmácia da UFRGS me presenteou e que fazem a minha vida mais feliz.

Ao Andrey, por todo carinho, apoio, amizade e principalmente amor.

À minha vó Fátima, segunda mãe, que jamais mediu esforços para eu me tornasse aquilo que eu queria ser.

À minha amada tia Léia, pelo acolhimento em Porto Alegre e as demonstrações diárias de carinho.

Aos meus pais, que sempre acreditaram e incentivaram todos meus sonhos.

SUMÁRIO

PARTE I	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
I.1. INTRODUÇÃO	6
I.1.1. Erros inatos do metabolismo	6
I.1.2. Acidúrias orgânicas	6
I.1.3. Acidúrias 2-hidroxi-glutáricas	7
I.1.4. Acidúria D-2-hidroxi-glutárica	8
I.1.4.1. Diagnóstico da acidúria D-2-hidroxi-glutáricas	9
I.1.4.2. Aspectos clínicos e neuropatológicos	10
I.1.4.3. Achados Bioquímicos	10
I.1.4.4. Tratamento	11
I.1.4.5 Fisiopatologia.....	11
I.1.5 . Radicais Livres e Defesas Antioxidantes	12
I.1.6 . Estresse oxidativo	13
I.2. OBJETIVOS	14
I.2.1. Objetivo geral	14
I.2.2 Objetivos específicos	14
PARTE II	15
PARTE III	44
III.1. DISCUSSÃO	45
III.2. CONCLUSÕES	51

PARTE I
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

RESUMO

A acidúria D-2-hidroxi glutárica (D-2-HGA) é uma doença neurometabólica primeiramente descrita por Chalmers e colaboradores, caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo tecidual e elevada excreção urinária do ácido D-2-hidroxiglutarico (D-2-HG). A nível molecular, a D2HGA pode ser causada por mutações no gene que codifica a enzima mitocondrial D-2-hidroxi glutarato desidrogenase (D-2-HGDH) levando a deficiência desta enzima ou por mutações específicas de ganho de função da isocitrato desidrogenase 2 (IDH2). As manifestações clínicas da D-2-HGA são majoritariamente neurológicas, tais como epilepsia, hipotonia e retardo no desenvolvimento mental e psicomotor. Esse erro inato do metabolismo apresenta dois fenótipos distintos: uma forma neonatal grave e com risco de vida e uma variante mais branda da doença. Visto que os mecanismos fisiopatogênicos responsáveis pelo dano ao SNC nos pacientes afetados por essa doença ainda não estão totalmente elucidados, o presente trabalho teve por objetivo investigar os efeitos *ex vivo* da administração intracerebroventricular (icv) do D-2HG a ratos Wistar neonatos sobre a homeostase redox e a imunohistopatologia nas principais estruturas cerebrais afetadas nos pacientes com D-2-HGA (estriado e córtex cerebral). Em alguns experimentos, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com o antioxidante melatonina ou com o antagonista de receptores glutamatérgico do tipo NMDA MK-801 uma hora antes da administração icv de D-2-HG. Inicialmente, avaliamos os efeitos do D-2-HG 6 horas após a administração icv sobre os parâmetros de homeostase redox. Os resultados mostraram que a administração de D-2-HG induziu lipoperoxidação, determinada pelo aumento significativo nos níveis de malondialdeído (MDA), em estriado e córtex cerebral dos animais neonatos. Também verificamos que o D-2-HG promoveu uma redução significativa do conteúdo de grupos sulfidrilas em estriado e aumento na formação de grupamentos carbonila no córtex cerebral, evidenciando dano oxidativo às proteínas em ambas as estruturas. Além disso, o metabólito aumentou a oxidação da 2',7' - diclorofluoresceína (DCFH) no córtex cerebral e estriado, o que, somado ao aumento nos níveis de nitratos e nitritos em cérebro total, sugere que o D-2-HG provocou um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Por outro lado, as concentrações de GSH foram diminuídas no córtex cerebral e as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) aumentadas, indicando um provável mecanismo compensatório com aumento da transcrição gênica secundário a elevação das espécies reativas. Demonstramos também que o dano oxidativo aos lipídeos e proteínas e o aumento da produção de espécies reativas induzido por D-2-HG foram prevenidos pelo pré-tratamento dos animais com melatonina e MK-801. Contudo, tanto a melatonina quanto o MK-801 não foram capazes de reverter o aumento provocado pelo D-2-HG na atividade da SOD e CAT observados no córtex cerebral. Finalmente, a avaliação morfológica do cérebro por meio da coloração por hematoxilina e eosina, 24 horas após a injeção icv de D-2-HG, revelou a presença de numerosos vacúolos e edema no córtex cerebral, com efeitos semelhantes, mas menos expressivos no estriado. Também observamos, 15 dias após a administração icv do metabólito, um aumento da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), indicando a indução de astrogliose. Concluindo, presumimos que um comprometimento da homeostase redox, bem como a excitotoxicidade glutamatérgica possam estar associados às alterações histopatológicas observadas e contribuir, pelo menos em parte, para a neuropatologia encontrada nos pacientes afetados pela D-2-HGA.

ABSTRACT

D-2-hydroxyglutaric aciduria (D-2-HGA) is a neurometabolic disorder first described by Chalmers et al., biochemically characterized by tissue accumulation and high urinary excretion of D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG). At the molecular level, D-2-HGA can be caused by mutations in the gene encoding the mitochondrial enzyme D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase (D-2-HGDH) leading to deficiency of this enzyme or by specific gain-of-function mutations in the isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2). The clinical manifestations of D-2-HGA are mostly neurological, such as epilepsy, hypotonia and psychomotor/mental retardation. The neuropathological findings of this disease are mainly anatomical changes in the central nervous system (CNS) such as enlargement of the lateral ventricles (cortical atrophy), changes in the basal ganglia, subependymal cysts and delayed brain maturation. This inborn error of metabolism presents two distinct phenotypes: a severe and life-threatening neonatal form or a mild form of disorder. Considering that the pathophysiological mechanisms underlying the CNS damage observed in affected individuals remain unclear, the aim of the present work was to investigate the *ex vivo* effects of D-2-HG intracerebroventricular (icv) administration to neonatal Wistar rats on parameters of redox homeostasis and on the immunohistopathology of the main structures affected in patients with D-2-HGA (striatum and cerebral cortex). In some experiments, the animals were pretreated intraperitoneally with antioxidant (melatonin) or NMDA receptor antagonist (MK-801) one hour prior to icv administration of D-2-HG. Initially, we evaluated the effects of D-2-HG 6 hours after icv administration on the parameters of redox homeostasis. We verified that D-2-HG *in vivo* icv injection induced lipid peroxidation, determined by the significant increase in malondialdehyde (MDA) levels in striatum and cerebral cortex of neonatal rats. We also observed that D-2-HG promoted a significant reduction in the content of sulfhydryl groups in striatum and the increase carbonyl formation in the cerebral cortex, denoting oxidative damage to proteins in both structures. In addition, the metabolite increased the oxidation of of 2',7'- dichlorofluorescein (DCFH) in both evaluated structures, which added to the increase in the levels of nitrates and nitrites in whole brain, suggests that D-2-HG provokes an increase in the production of reactive oxygen and nitrogen species. On the other hand, GSH concentrations were decreased only in the cerebral cortex, besides provoking an increase in the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT), indicating a probable compensatory mechanism with increased gene transcription secondary to observed reactive species elevation. In the striatum, the activity of SOD, CAT and glutathione peroxidase (GPx) were decreased, an effect that can be attributed to oxidative damage to protein structures, leading to a decrease in the catalytic activity of these enzymes. Furthermore, D-2-HG-induced lipid and protein oxidative damage and increase of reactive species production in the cerebral cortex and striatum were prevented by the pretreatment with melatonin or MK-801. However, melatonin and MK-801 were not able to reverse the increase caused by D-2-HG in the SOD and CAT activity observed in the cerebral cortex. Finally, histological brain sections 24 hours after the D-2-HG icv injection, stained with hematoxylin and eosin, showed the presence of numerous vacuoles and edema in the cerebral cortex, with less effects in the striatum. Moreover, we observed that 15 days after the administration of metabolite, an increase of the glial fibrillary acidic protein (GFAP), suggesting that D-2-HG promotes astrogliosis. In conclusion, it may be presumed that the disturbance of cell redox homeostasis and glutamatergic excitotoxicity are associated with the histopathological changes observed, and may contribute at least in part to the neuropathology found in patients affected by D-2-HGA.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT - catalase

D-2-HGA – acidúria D-2-hidroxi glutárica

D-2-HG – ácido D-2-hidroxi glutárico

EIM – erros inatos do metabolismo

ERN – espécie reativa de nitrogênio

ERO – espécie reativa de oxigênio

GFAP – proteína glial fibrilar ácida

GPx – glutatona peroxidase

GSH – glutatona reduzida

HE – hematoxilina-eosina

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

2-HG – ácido 2-hidroxi glutárico

ICV - intracerebroventricular

L-2-HG – ácido L-2-hidroxi glutárico

L-2-HGA – acidúria L-2-hidroxi glutárica

MDA – malondialdeído

Mel - melatonina

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NMDA - N-metil-D-aspartato

NO[•] – óxido nítrico

O₂ – oxigênio molecular

O₂^{•-} – ânion superóxido

OH[•] – radical hidroxila

¹O₂ – oxigênio singlete

ONOO⁻ – peroxinitrito

RMN – ressonância magnética nuclear

SOD – superóxido dismutase

SNC – sistema nervoso central

TBA-RS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. Erros inatos do metabolismo

No início do século XX, mais precisamente em 1908, o médico inglês Sir Archibald E. Garrod introduziu o termo erro inato do metabolismo (EIM) referindo-se à alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo. Através das recém postuladas leis de Mendel, Garrod propôs um modelo de herança genética autossômica recessiva, baseado em suas observações de que estas doenças eram mais frequentes entre indivíduos de uma mesma família e maior consanguinidade entre os pais, embora estes e outros parentes fossem indivíduos normais. Os EIM são um grupo de doenças fenotipicamente heterogêneas causadas por defeitos genéticos que levam a deficiência de uma proteína, geralmente uma enzima, acarretando no bloqueio de uma rota do metabolismo celular. Como consequência do bloqueio dessa via, há o acúmulo de intermediários potencialmente tóxicos nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes, além de uma possível depleção de produtos essenciais ao organismo (Bickel 1987; Mak et al. 2013).

Até o momento, foram descritos mais de 600 EIM com o defeito bioquímico caracterizado. Embora sejam individualmente raros, coletivamente os EIM podem alcançar uma incidência de aproximadamente 1 a cada 500-1.000 recém-nascidos vivos. Avanços no entendimento da etiologia molecular e bioquímica de EIM através de técnicas desenvolvidas nos últimos anos têm levado a um significativo progresso na detecção e tratamento precoces dessas condições (Alfadhel et al. 2013; Beaudet et al. 2014; Vernon 2015), processo esse essencial para o diagnóstico neonatal, através de testes de triagem, que possibilitam uma intervenção terapêutica no período pré-sintomático que podem levar a um desfecho clínico mais brando da doença.

I.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 (Beudet et al. 2014). 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).

I.1.3. Acidúrias 2-hidroxi-glutáricas

O ácido 2-hidroxi-glutárico (2-HG), é um ácido dicarboxílico de 5 carbonos com a presença de uma hidroxila no carbono 2, conferindo a esta molécula um centro quiral que possibilita a existência desse composto em duas conformação enantioméricas, isto é, pode estar presente na forma de ácido D-2-hidroxi-glutárico ou L-2-hidroxi-glutárico (Figura 1).

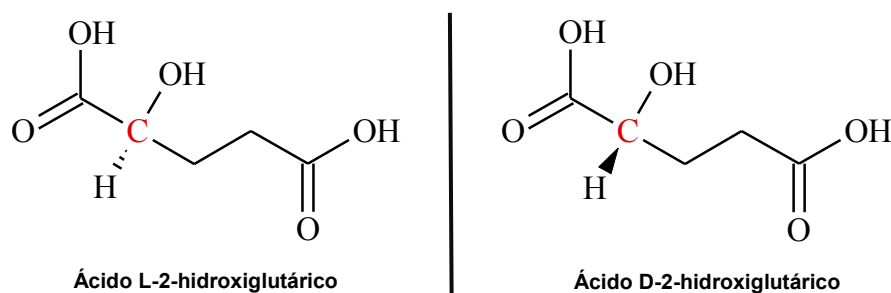


Figura 1. Estrutura química dos ácido L-2-hidroxi-glutárico e D-2-hidroxi-glutárico destacando o carbono quiral em vermelho.

As duas formas enantioméricas do ácido 2-hidroxi-glutárico foram identificadas pela primeira vez como constituintes normais da urina humana por Gregersen e colaboradores (1977). Três anos depois, dois novos erros inatos do metabolismo foram relatados simultaneamente no *Journal of Inherited Metabolic Disease*. Chalmers e colaboradores (1980) identificaram um paciente com acidúria D-2-hidroxi-glutárica (D-2-HGA, OMIM # 600721 e OMIM # 613657), enquanto Duran e colaboradores (1980) descreveram um caso de acidúria L-2-hidroxi-glutárica (L-2-HGA, OMIM # 236792), publicações estas que estabeleceram os marcadores bioquímicos (D- e L-2-HG) nessas duas doenças metabólicas distintas.

I.1.4. Acidúria D-2-hidroxi-glutárica

A acidúria D-2-hidroxi-glutárica (D-2-HGA) é uma doença neurometabólica, caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo tecidual e excreção aumentada do ácido D-2-hidroxi-glutárico (D-2-HG). Dois fenótipos distintos da D-2-HGA foram descritos: uma forma neonatal severa (tipo II) (Kranendijk et al. 2010b) e uma variante infantil menos grave (tipo I) (Kranendijk et al. 2010a).

Na última década estudos estabeleceram as bases moleculares que levam ao acúmulo do D-2-HG nos dois fenótipos distintos de D-2-HGA. A enzima mitocondrial hidróxiácido-oxoácido transidrogenase (HOT) catalisa a conversão do α -cetogluturato (2-KG) em D-2-HG (figura 1). Este metabólito, com função fisiológica ainda desconhecida, é novamente convertido a 2-KG por ação da D-2-hidroxi-glutarato desidrogenase (D-2-HGDH) (figura 1). Uma mutação no gene que codifica a D-2-HGDH provoca a diminuição ou perda total da atividade desta enzima e está associada ao aumento do D-2-HG caracterizando a acidúria D-2-hidroxi-glutárica tipo I (Kranendijk et al. 2010a).

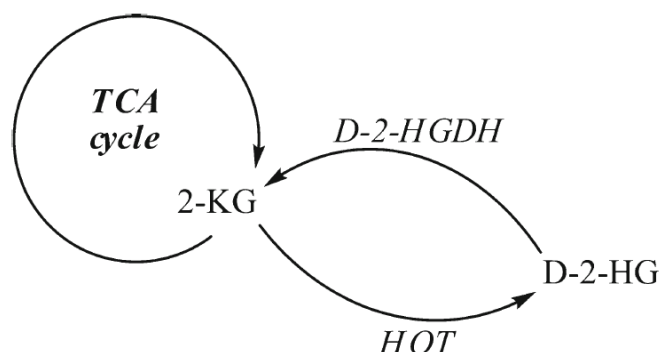


Figura 2. D-2-HG é formado a partir de 2-KG por ação da HOT. D-2-HGDH catalisa a conversão de D-2-HG a 2-KG. O Acúmulo de D-2-HG em pacientes com D-2-HGA tipo I ocorre quando há deficiência da D-2-HGDH (Adaptado de *Kranendijk et al., 2012*).

Já a acidúria D-2-hidroxi-glutárica tipo II está relacionada a mutações específicas no gene da isocitrato desidrogenase II (figura 3), que levam a um aumento de 8 vezes na atividade desta enzima e conferem a esta a capacidade de converter o alfa-cetoglutarato em D-2-HG (Kranendijk et al. 2010b), sem alterar a atividade da HOG ou mesmo da D-2-HGDH.

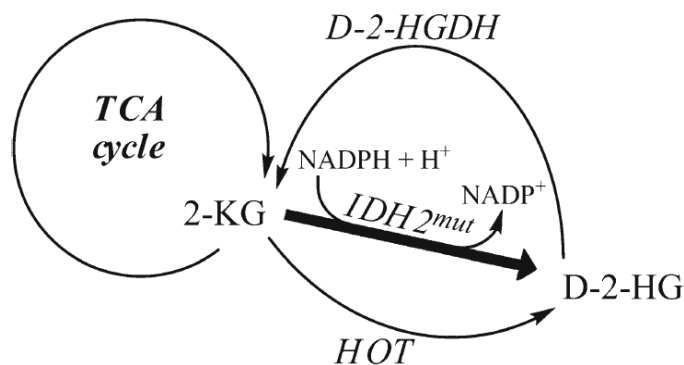


Figura 3. IDH2 mutada ganha a função de converter 2-KG em D-2-HG, além a produção de D-2-HG pela HOG. A D-2-HGDH não consegue metabolizar completamente todo o D-2-HG gerado, resultando em acumulado de D-2-HG em pacientes com D-2-HGA tipo II (Adaptado de *Kranendijk et al., 2012*).

I.1.4.1. Diagnóstico da acidúria D-2-hidroxi-glutáricas

O diagnóstico diferencial das acidúrias 2-hidroxi-glutáricas inicia com a avaliação clínica do paciente que possui um retardo no desenvolvimento não esclarecido e/ou que seja portador de disfunção neurológica de etiologia desconhecida, elevando o nível de suspeita para uma desordem metabólica. O diagnóstico provisório da A triagem urinária de ácidos orgânicos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) revela um aumento nos níveis de 2-HG. Contudo, a determinação da configuração quiral ainda precisa ser determinada. Embora as manifestações clínicas possam sugerir tanto D-2-HGA como L-2-HGA, a diferenciação quiral realizada através de GC-MS ou de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) é obrigatória para o correto diagnóstico diferencial e consequente confirmação de D-2-HGA (Kranendijk et al. 2012). Subsequentemente, a caracterização genética e enzimática possibilita a confirmação de D-2-HGA e diferenciação em seus 2 subtipos, representando uma importante informação para diagnóstico pré-natal futuro (Gibson et al. 1993b; Struys et al. 2004).

I.1.4.2. 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 (Kranendijk 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. 1999b, a). Neste contexto, devido à disfunção neurológica severa e atrofia cerebral apresentadas pelos pacientes, a D-2-HGA é classificada como uma doença neurometabólica.

A D-2-HGA tipo I é muito mais variável quanto à sintomatologia clínica do que a 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 (Kranendijk et al. 2012).

I.1.4.3. Achados Bioquímicos

Os pacientes acometidos pela D-2-HGA têm como achado bioquímico principal o acúmulo tecidual e excreção urinária aumentada do D-2-HG. Foram também reportados aumentos nos níveis de GABA no líquido (van der Knaap et al. 1999b, a), além de aumento moderado na excreção de intermediários do ciclo do ácido cítrico (ácidos 2-cetoglutárico, cítrico e succínico) em pacientes afetados. 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 et al. 1994).

I.1.4.4. Tratamento

Não há, até o presente momento, intervenção terapêutica efetiva para os pacientes com D-2-HGA. Adição de FAD (com o objetivo de aumentar a atividade de enzimas D-2-HGDH) não resultou em atividade enzimática aumentada (Achouri et al. 2004). Uma abordagem terapêutica utilizando riboflavina ainda não foi realizada. Contudo, poderia ser benéfica, sabendo que a sequência de DNA do gene *D2HGDH* pertence à família das enzimas que utilizam FAD como cofator. Na D-2-HGA tipo II, a inibição da IDH2 mutante com oxaloacetato levou à diminuição da produção de D-2-HG em lisados de linfoblastos de pacientes (Kranendijk et al. 2011). A inibição com substratos ou fármacos altamente específicos para IDH2 mutante pode representar uma estratégia terapêutica viável em pacientes.

I.1.4.5 Fisiopatologia

Embora geneticamente distintas, as D-2-HGA tipo I e tipo II possuem como característica comum o acúmulo de D-2-HG nos fluidos corporais, bem como aspectos clínicos semelhantes. Essas observações podem sugerir que o metabólito D-2-HG potencialmente contribui para a fisiopatologia associada aos aspectos clínicos do retardo no desenvolvimento, hipotonia e epilepsia presentes em ambos os tipos da desordem. A superprodução de D-2-HG provavelmente inicia na mitocôndria, já que a D-2-HGDH e a IDH2 são enzimas mitocondriais. As concentrações de D-2-HG intracelular e mitocondriais são desconhecidas; já no plasma se sabe que, que nos pacientes afetados, as concentrações do metabólito estão aumentadas de 30 a 840 vezes (26-757 μM) (Gibson et al. 1993a; Kranendijk et al. 2010a, b, 2011). Os níveis médios no plasma de pacientes tipo II são cerca de 5 vezes mais elevados do que nos pacientes tipo I. Sabendo que os pacientes com D-2-HGA tipo II apresentam sintomas mais severos que os tipo I, sugere-se que exista uma correlação entre o aumento das 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 bioenergética mitocondrial e homeostase 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 dos complexos IV e V da cadeia respiratória (Da Silva et al. 2002, 2004; Kölker et al. 2002), além de induzir estresse oxidativo *in vitro* (Kölker et al. 2002; Latini et al. 2003, 2005).

Também foi demonstrado que a administração intraestriatal de D-2-HG a ratos Wistar de 30 dias induziu estresse oxidativo e algumas alterações histopatológicas (da Rosa et al. 2014). Além disso, o D-2-HG apresentou efeito excitotóxico em culturas primárias de neurônios de pintos através da ativação de receptores NMDA (Kölker et al. 2002).

I.1.5 . Radicais Livres e Defesas Antioxidantes

Radicaís livres são espécies químicas capazes de existir de forma independente contendo um ou mais elétrons desemparelhados. Sendo assim, essas espécies encontram-se em uma situação energeticamente instável, o que as torna altamente reativas (Southorn and Powis 1988; Halliwell, B., Gutteridge 2015a).

Em condições fisiológicas, o O_2 sofre redução tetravalente no complexo IV da cadeia transportadora de elétrons (CTE) resultando na formação de H_2O . Entretanto, centros redox dos complexos da CTE, como os presentes nos complexos I e III, podem ser diretamente oxidados pelo O_2 , resultando na transferência de um único elétron para essa molécula e na consequente geração de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O $O_2^{\bullet-}$ pode ser convertido pela superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie reativa não-radical já que não apresenta elétrons desemparelhados. Por sua vez, o H_2O_2 reagindo com Fe_2^+ dá origem ao radical hidroxila (OH^{\bullet}), um radical livre extremamente reativo. O $O_2^{\bullet-}$, o H_2O_2 e o OH^{\bullet} fazem parte das chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO). Além das ERO, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), representadas principalmente pelo óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) (Halliwell, B., Gutteridge 2015a).

A produção fisiológica de ERO e ERN apresenta um importante papel na síntese e regulação de proteínas e sinalização celular, como a sinalização de insulina e adaptação ao exercício (Irani 2000; Wall et al. 2012; Hamann et al. 2014; Webb et al. 2017), e na defesa contra infecções através da liberação de espécies reativas pelos neutrófilos (Delanty and Dichter 1998; Aratani et al. 2012). Entretanto, quando formadas em excesso, podem causar danos às células através da oxidação de diversas biomoléculas, tais como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (Halliwell, B., Gutteridge 2015a).

Com a finalidade de evitar os efeitos nocivos das espécies reativas, as células possuem mecanismos eficientes para a detoxificação das mesmas: as defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas. Essas defesas estão amplamente

distribuídas no organismo e compreendem agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas SOD, catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx); proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo) ao se ligarem aos mesmos, como as transferrinas; agentes que aprisionam espécies reativas e que são substratos de enzimas antioxidantes, como a GSH; além de proteínas que protegem biomoléculas de danos por outros mecanismos (Halliwell, B., Gutteridge 2015b, c).

I.1.6 . Estresse oxidativo

Espécies reativas são necessárias para a função normal da célula, servindo como moléculas de sinalização para importantes papéis fisiológicos. Elas são continuamente produzidas e neutralizadas por sistemas de defesa antioxidante. No entanto, quando produzidos em altas concentrações ou quando as defesas antioxidantes estão deficientes, as espécies reativas podem causar dano celular. Se o aumento de espécies reativas é relativamente pequeno, a resposta antioxidante será suficiente para compensar esse aumento. No entanto, sob certas condições patológicas, a produção de espécies reativas estará aumentada, e as defesas antioxidantes podem ser insuficientes para restabelecer a homeostase redox (Halliwell, B., Gutteridge 2015d).

O rompimento entre o equilíbrio pró-oxidante e antioxidante é descrito como estresse oxidativo, e pode representar um mecanismo fundamental envolvido em doenças humanas (Halliwell 2006). O estresse oxidativo pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a combinação de quaisquer desses fatores (Halliwell, B., Gutteridge 2015a).

As células são capazes de tolerar um nível moderado de estresse oxidativo, o que geralmente resulta em um aumento na síntese de enzimas antioxidantes com a finalidade de neutralizar as espécies reativas produzidas excessivamente. Por outro lado, se o dano celular for exacerbado, o estresse oxidativo pode levar à morte celular por necrose ou apoptose (Halliwell, B., Gutteridge 2015d).

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. Objetivo geral

Apesar da grave disfunção neurológica observada nos pacientes acometidos pela D-2-HGA, os mecanismos de neurotoxicidade não estão totalmente esclarecidos nessa doença. Além disso, não há na literatura nenhum trabalho avaliando os efeitos do metabólito acumulado neste EIM sobre o cérebro de ratos neonatos, período esse de fundamental importância, uma vez que o fenótipo mais grave dessa doença ocorre nos primeiros dias de vida. Por estas razões, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos ex vivo da administração icv do D-2-HG sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e estriado de ratos neonatos, bem como alterações histopatológicas cerebrais no intuito de desvendar os mecanismos tóxicos desse composto e as repercussões do mesmo sobre o SNC.

I.2.2 Objetivos específicos

Verificar os efeitos da injeção intracerebroventricular (icv) do D-2-HG a ratos neonatos sobre os seguintes parâmetros em córtex cerebral e estriado:

- a) A peroxidação lipídica (níveis de malondialdeído – MDA) e sobre a oxidação de proteínas (formação de carbonilas e conteúdo de grupos sulfidrila).
- b) A produção de espécies reativas (oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína – DCFH e o conteúdo de nitratos e nitritos).
- c) As defesas antioxidantes não enzimáticas (concentrações de GSH) e enzimáticas (atividade das enzimas SOD, CAT e GPx).
- d) A morfologia cerebral e a imunohistologia da proteína glial fibrilar ácida (GFAP).
- e) Efeito de compostos neuroprotetores (melatonina e MK-801) sobre parâmetros da homeostase redox.

PARTE II
Artigo Científico

Disturbance of redox homeostasis associated with histopathological abnormalities in cerebral cortex and striatum of neonatal rats injected with D-2-hydroxyglutaric acid: a probable contributing pathomechanism of brain damage in D-2-hydroxyglutaric aciduria

Rafael Teixeira Ribeiro³, Ângela Zanatta¹, Alexandre Umpierrez Amaral^{1,2}, Guilhian Leipnitz^{1,3}, Bianca Seminotti¹, Moacir Wajner^{1,3,4}

1 - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

2 - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, Brazil

3 - Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil

4 - Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico #404883/2013-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul #2266-2551/14-2, Pró-Reitoria de Pesquisa/Universidade Federal do Rio Grande do Sul #PIBIC 27613, FIPE/HCPA and Financiadora de Estudos e Projetos/Rede Instituto Brasileiro de Neurociência # 01.06.0842-00.

***Corresponding author:** Moacir Wajner, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

High concentrations of D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG) are found in brain and other tissues and biological fluids of patients affected by the two forms of D-2-hydroxyglutaric aciduria (D-2-HGA), D-2-hydroxyglutaric aciduria type I (D2HGA1) and D-2-hydroxyglutaric aciduria type II (D2HGA2) caused, respectively, by mutations in the genes encoding D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase 2. The clinical findings of both disorders are epilepsy, hypotonia and psychomotor retardation, as well as macrocephaly, visual problems and facial dysmorphism. Neuroimaging findings usually reveal delayed cerebral maturation and myelination, multifocal cerebral white matter abnormalities, subdural effusions, enlargement of the lateral ventricles, and subependymal pseudocysts. Since very little has been reported on the pathomechanisms involved in brain injury in these disorders, we investigated whether intracerebral administration of D-2-HG to neonatal rat pups could alter important parameters of redox homeostasis and cause histochemical and immunochemical histological alterations in cerebral cortex and striatum of these animals. D-2-HG in vivo intracerebral administration also increased 2',7'-dichlorofluorescein-DCFH-oxidation (ROS formation), malondialdehyde concentrations (lipid peroxidation) and carbonyl formation (protein oxidation), besides decreasing reduced glutathione levels (nonenzymatic antioxidant defense) and increasing superoxide dismutase and catalase activities (enzymatic antioxidant defenses) in the cerebral cortex. Some of these alterations were prevented by both melatonin and MK-801, whereas others were differentially prevented by one of these compounds and still others (the antioxidant enzyme activities SOD and CAT) were not changed by these protective agents. We also observed that nitrates and nitrites production was significantly increased by in vivo D-2-HG administration, implying a role for reactive nitrogen species in the effects observed. D-2-HG also markedly induced reactive oxygen species production (increase of DCFH), lipid peroxidation (increase of malondialdehyde concentrations) and protein oxidation (increase of sulfhydryl oxidation) in striatum that were totally prevented by the antioxidant melatonin and by the competitive inhibitor of NMDA glutamate receptors MK-801, implying the participation of reactive species and of overstimulation of NMDA receptor in these effects. Finally, D-2-HG induced vacuolation and edema particularly in the cerebral cortex with less intense alterations in the striatum that were presumably associated with the unbalanced redox homeostasis caused by this metabolite. In addition, the metabolite provoked an increase in the glial fibrillary acidic protein (GFAP), suggesting that D-2-HG promotes astrogliosis. Our present data indicate that the major metabolite accumulating in D-2-HGA disturb cellular redox status in cerebral structures mostly affected in patients with these diseases through induction of ROS and RNS production and stimulation of NMDA receptors, It is presumed that these pathomechanisms may contribute to the brain damage characteristic of this disease.

Keywords: D-2-hydroxyglutaric aciduria; D-2-hydroxyglutaric acid; redox homeostasis; cerebral cortex; striatum; histopathology.

Introduction

D-2-hydroxyglutaric aciduria consists of two distinct neurometabolic disorders called D-2-hydroxyglutaric aciduria type I (D2HGA1) and type II(D2HGA2) caused, respectively, by mutations in the genes encoding D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase [1] and isocitrate dehydrogenase 2 [2]. Both types result in high levels of D-2-hydroxyglutaric acid in urine, plasma, CSF and, in particular, the brain. The concentrations of this organic acid are much higher in D2HGA2 than in D2HGA1. Diagnosis is based on detection of elevated concentrations of D-2-hydroxyglutaric acid in body fluids. Over 80 cases of D2HGA have so far been reported, but the prevalence in the general population is unknown [3].

D2HGA1 manifests within the first 6 years of life, and disease progression is generally insidious with mild to moderate clinical symptoms and a still undefined life expectancy [4]. In D2HGA2, the symptoms emerge in the first 2 years of life, are more severe than in D2HGA1 and include cardiomyopathy, associated with high mortality, in half of patients [4, 5]. The characteristic clinical findings of both disorders consist of epilepsy, hypotonia and developmental delay. Most children with early-infantile onset are affected by D2HGA2 and manifest with generalized convulsions, severe hypotonia and psychomotor retardation [4]. Macrocephaly, visual problems and facial dysmorphism can be also observed in both forms as the disease progresses.

Neuroimaging findings of both disorders usually reveal delayed cerebral maturation and myelination, multifocal cerebral white matter abnormalities, subdural effusions, enlargement of the lateral ventricles, and subependymal pseudocysts [1, 4, 6–10]. Patients with the mild late-onset form have less intense cerebral MRI anomalies. No effective treatment is available for these diseases.

The mechanisms of the neurological symptoms presented by D-2-HGA patients are still poorly understood. However, since the concentrations of D-2-HG are up to 800 fold higher in the affected patients compared to normal individuals and much higher in D-2-HGA type 2, the more severe form of D-2-HGA, than in D-2-HGA type 1, it is conceivable that this organic acid is potentially neurotoxic in this disorder [4]. In this context, it was verified that D-2-HG disrupts redox homeostasis [11–13], mitochondrial bioenergetics [14–16] and the glutamatergic system [14, 17], reinforcing the presumption that this accumulating metabolite contributes to the pathophysiology of D-2-HGA. It is emphasized that these experimental studies were performed in brain of adolescent rats or human blood leukocytes [13] (and so far nothing has been published on the effects of this organic acid in neonate brain).

Considering that the underlying mechanism of brain damage in D-2-HGA are still not fully established especially in infantile brain and that this central structure is highly susceptible to free radical attack, the present work investigated the effects of intracerebral administration of D-2-HG on a large spectrum of redox homeostasis parameters in cerebral cortex and striatum of neonatal rats. Lipid oxidative damage (malondialdehyde levels), protein oxidation (carbonyl formation and sulfhydryl content), reactive oxygen species (DCFH oxidation), and the non-enzymatic (GSH levels) and enzymatic antioxidant defenses (glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase) were determined. We also investigated whether D-2-HG could provoke-histopathological changes in the brain of these animals,

by evaluating brain sections stained with hematoxylin and eosin (HE) and the GFAP immunofluorescence staining.

Material and Methods

Animals

Neonatal Wistar rats obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil, were used. Six whole litters of 12 animals each were used for each experimental *in vivo* condition. The animals had free access to water and 20% (w/w) protein commercial chow (SUPRA, Porto Alegre, RS, Brazil) and were maintained on a 12:12-h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) colony room. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for animal research (35426) of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, and followed the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication 85-23, revised 2011). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Reagents

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. D-2-HG was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) on the day of the experiments, and the pH was adjusted to 7.4.

D-2-HG administration and drug treatment

Seventy-two neonatal pups were used in the experiments. Each littermate received an intracerebral injection into the Cisterna magna, as previously described [18, 19], between 12 and 48 hours after birth (P1) with D-2-HG (0.75 $\mu\text{mol/g}$, pH 7.4,) or vehicle (phosphate buffered saline (PBS), 0.01 M, pH 7.4). After injection, animals were allowed to recover during 15–30 min and returned to their mother. In some experiments, the antioxidant melatonin (MEL; 20 mg/kg body weight) [20] or the classical NMDA receptor antagonist MK-801 (0.25 mg/kg body weight) [21] was administered intraperitoneally 60 min before D-2-HG administration.

Sample Preparation

Six hours after D-2-HG injection, animals were euthanized by decapitation, and the brain was immediately removed and kept on an ice Petri plate. The olfactory bulb, pons, and medulla were discarded and the cerebral cortex and striatum were dissected, weighed, and kept chilled until homogenization. For nitrate and nitrite determination, we used forebrain. These structures were homogenized (1:10 w/v) in 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, containing 140 mM chloride potassium (1:10 w/v), centrifuged at 750 g for 10 min and the supernatants used for the assays. The following parameters of oxidative stress were measured in these cerebral structures 6 hours after D-2-HG injection. A few parameters could not be determined in striatum because of the small size of this cerebral structure

and nitrate and nitrite determination was measured in whole brain, because this technique needs a greater amount of tissue.

Reactive species production

2',7'-Dichlorofluorescein oxidation

DCFH oxidation was determined according to the method of LeBel [22] with slight modifications. Homogenates (0.04–0.07 mg protein) were incubated with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (5 μ M) during 1 h at 37°C. DCF-DA is permeable to the cell membrane and is deacetylated by esterases to DCFH in the intracellular medium. DCFH is then converted by reactive species into the highly fluorescent product dichlorofluorescein (DCF). DCF fluorescence was measured using wavelengths of 480 nm (excitation) and 535 nm (emission). The calibration curve was performed with standard DCF (0.01–0.75 μ M). The production of reactive species was calculated as μ mol DCF / mg protein.

Nitrate and nitrite content

Reactive nitrogen species (RNS) formation was evaluated by measuring nitrate and nitrite content according to Navarro-Gonzalez and collaborators [23], with some modifications. One hundred and fifty microliters of supernatants (containing approximately 1.2 mg of protein) was deproteinized by adding 125 mL of 75 mM ZnSO₄ solution, followed by centrifugation at 9,000 g for 2 min at 25°C. The supernatant obtained was neutralized with 55 mM NaOH solution and diluted in 5 vol of glycine buffer solution, pH 9.7. Copper-coated cadmium granules (600–1,000 mg) were added to the supernatants to convert all nitrates into nitrite in the biological samples. Aliquots of 200 μ L were then treated with 200 μ L of Griess reagent (2% sulfanilamide in 5% HCl and 0.1% N-1-(naphthyl)ethylenediamine in H₂O) and incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was read at 505 nm. A calibration curve was prepared with NaNO₂ at concentrations ranging from 1 to 125 mM. The final results were expressed in μ mol nitrate and nitrite / mg protein.

Oxidative damage

Malondialdehyde Levels

MDA concentrations were measured according to the method described by Yagi [23] with some modifications. Briefly, one hundred microliters of cerebral cortex or striatum supernatants containing 0.3 mg of protein were treated with 200 μ L of 10 % trichloroacetic acid and 300 μ L of 0.67 % thiobarbituric acid in 7.1 % sodium sulfate and incubated for 1 h in a boiling water bath. The tubes containing the mixture were allowed to cool on running tap water for 5 min. The resulting pink-stained complex was extracted with 400 μ L of butanol. Fluorescence of the organic phase was read at 515 and 553 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. A calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane and subjected to the same treatment as supernatants. MDA levels were calculated as nmol MDA / mg protein.

Sulfhydryl Group Content

This assay was performed according to Aksenov and Markesbery [24]. It is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) DTNB by thiol groups, generating a yellow-stained compound TNB whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Thirty microliters of 0.1 mM DTNB was added to 120 μ L of cerebral cortex or striatum supernatants containing 0.36mg of protein. This was followed by 30-min incubation at room temperature in a dark room. Absorption was measured at 412 nm. Results were calculated as nmol TNB / mg protein.

Protein carbonyl formation

Protein carbonyl formation was measured according to the method of Reznick and Packer[25]. The assay is based on the reaction of the carbonyl groups with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) generating a corresponding dinitrophenyl hydrazone, whose absorbance is read in spectrophotometer at 370 nm. Briefly, 200 μ L of cerebral cortex or striatum supernatants were treated with 400 μ L of 10 mM DNPH dissolved in 2.5 M HCl or with 2.5 M HCl (blank) and left in the dark for 1 h. Samples were then precipitated with 600 μ L of 20 % TCA and centrifuged for 5 min at 9,000 g. The pellet was washed with 1 mL of ethanol:ethyl acetate (1:1, v/v) and suspended in 550 μ L of 6 M guanidine prepared in 2.5 N HCl. The difference between the absorbance of the samples treated with DNPH and with HCl (blank) was used to calculate the carbonyl content. The results were calculated as nmol carbonyl groups / mg of protein, using the extinction coefficient of $22,000 \times 10^6$ nmol / mL for aliphatic hydrazones.

Antioxidant defenses

Reduced glutathione concentrations

This parameter was measured according to Browne and Armstrong [26] with some modifications. One hundred and eighty-five microliters of 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 5 mM EDTA, and 15 μ L of o-phthaldialdehyde (1 mg/mL) were added to 30 μ L of sample (0.3–0.5 mg of protein) previously deproteinized with metaphosphoric acid. This mixture was incubated at room temperature in a dark room for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. Calibration curve was prepared with standard GSH (0.001–1 mM), and the concentrations were calculated as nmol GSH / mg protein.

Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was measured according to Wendel [27] using tert-butylhydroperoxide as substrate. The enzyme activity was determined by monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium containing 600 μ L of buffer (100 mM potassium phosphate containing 1 mM EDTA, pH 7.0), 10 μ L of 40 mM sodium azide, 15 μ L of 100 mM GSH, 15 μ L of 10 U/mL glutathione reductase, 10 μ L of 10 mM NADPH, and 10 μ L of sample (3 μ g of protein). One GPx unit (U) is defined as 1 μ mol of NADPH consumed per minute. The specific activity was calculated as U / mg protein.

Catalase (CAT) activity

CAT activity was assayed according to Aebi [28] by measuring the absorbance decrease at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0.1 % Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and approximately 1 µg of protein. One unit (U) of the enzyme is defined as 1 µmol of H₂O₂ consumed per minute. The specific activity was calculated as U / mg protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was assayed according to Marklund [29] and is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide anion, which is the substrate for SOD. The inhibition of the autoxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD and, therefore, is proportional to the activity of the SOD present in homogenates. The reaction medium contained 50 mM Tris buffer/1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8.2, 80 U/mL CAT, 0.38 mM pyrogallol, and approximately 1 µg of protein, and the absorbance was read at 420 nm. A calibration curve was performed with purified SOD as standard, in order to calculate the activity of SOD present in the samples. The specific activity was calculated as U / mg protein.

Histological analysis

Hematoxylin and eosin staining

We performed histological analysis in the brain with hematoxylin and eosin staining [30]. Six rats of each group (PBS or D-2-HG-injected animals) were euthanized 24 hours after PBS or D-2-HG (0.75 µmol/g,) administration. The whole brain was removed and postfixed in 10% formaldehyde-buffered solution, pH 7.0, for 48 hours at room temperature and processed for paraffin-embedded sectioning. Three-micrometer-thick brain slices were obtained with a microtome (MICROM HM 360). Brain sections were stained in hematoxylin solution for 5 min and then washed in running tap water. The sections were then placed in eosin solution for 3 min, dehydrated with 100 % ethanol and cleared with xylene for 2 min. Image analysis (magnification of 100x and 400x) was performed using the Q Capture Pro Software (Olympus).

GFAP immunohistochemical staining

Fifteen days after D-2-HG icv administration, animals were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and transcardially perfused with 0.9% saline solution containing 0.16% sodium citrate and then with 4% paraformaldehyde prepared in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, for brain fixation. Fixed brains were removed, post-fixed by immersion in PFA during 24 h, and then sectioned on a vibrating microtome to obtain 35-µm-thick consecutive coronal series. Immunohistochemistry was performed using transverse cerebral sections of neocortex and striatum of rats euthanized 15 days after D-2-HG or NaCl administration, according to Moura et al. [31]. For each animal and staining procedure, three to six equivalent sections were immunostained. Slices were incubated with the antibody anti-Iba1 (1:1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in PBST (phosphate-buffered saline with Tween-20). After

a 4 °C overnight incubation, sections were rinsed in PBS and incubated at room temperature for 2 h with a secondary antibody (1:500) conjugated to fluorescent probes (Molecular Probes). Sections were then washed, mounted using fluoroshield (Sigma-Aldrich Co.), and imaged in a FV300 Olympus confocal microscope provided with 488 and 546 nm lasers. Primary or secondary antibodies were omitted in negative controls [31].

Protein Determination

Protein content was measured by the method of Lowry [32], using bovine serum albumin as a standard.

Statistical Analysis

Results are presented as mean \pm standard deviation. Assays were performed in triplicate, and the mean was used for statistical calculations. Data were analyzed using the Student's *t* test for unpaired samples or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the *post-hoc* Tukey multiple range test when the F was significant. Only significant values are shown in the text. Differences between groups were considered significant at $P < 0.05$. All analyses were carried out using the GraphPad Prism 5 software.

Results

D-2-HG intracerebral administration induces reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation in brain of neonate rats

We initially examined whether D-2-HG could induce reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) generation by determining DCFH oxidation and nitrate and nitrite concentrations in brain of neonatal rats. D-2-HG significantly increased DCFH oxidation in cerebral cortex (17%) [$F_{(3,12)} = 7.060$; $P = 0.0054$] (Figure 1A) and striatum (47 %) [$F_{(3,12)} = 19.13$; $P < 0.0001$] (Figure 1B). It can be also seen in the figures that melatonin and MK-801 pre-treatment totally prevented this increase in both cerebral structures. It was also observed that RNS was significantly increased by D-2-DG in forebrain (38%) [$t_{(6)} = 4.240$; $P = 0.0054$] (Figure 1C). Since the data clearly demonstrated that reactive species generation are stimulated by D-2-HG, the next steps were to test whether this increase could provoke lipid and protein oxidative damage and alter the antioxidant defenses in cerebral cortex and striatum of neonate rats.

D-2-HG intracerebral administration provokes lipid oxidative damage in cerebral cortex and striatum of neonate rats

Figures 2A and B shows that D-2-HG markedly enhanced the concentrations of MDA in cerebral cortex (33%) [$F_{(3,12)} = 11.22$; $P = 0.0009$] and striatum (29%) [$F_{(3,12)} = 10.14$; $P = 0.0013$] of neonate rats 6 h after its administration and that pre-treatment with the antioxidant melatonin and the NMDA antagonist MK-801 fully prevented these effects. Since MDA is an end product of membrane polyunsaturated fatty acid peroxidation, these data indicate that D-2-HG causes lipid oxidative damage

D-2-HG intracerebral administration provokes protein oxidative damage in cerebral cortex and striatum of neonate rats

Next we tested whether D-2-HG could cause protein oxidation by measuring sulfhydryl and carbonyl group contents in cerebral cortex and striatum. We observed that D-2-HG intracerebral injection significantly decreased sulfhydryl content in striatum (33%) [$F_{(3,13)} = 5.330$; $P = 0.0129$] (Figure 3B), but did not change this parameter in cerebral cortex [$t_{(6)} = 0.1941$; $P = 0.8525$] (Figure 3A). Furthermore, it was also verified that carbonyl content was significantly enhanced by D-2-HG intracerebral injection in cerebral cortex (37%) [$F_{(3,12)} = 22.31$; $P < 0.0001$] (Figure 3C). A further interesting finding was that melatonin and MK-801 completely prevented sulfhydryl oxidation in striatum (Figure 3B) and carbonyl increase in cerebral cortex (Figure 3C). Since two thirds of total cellular sulfhydryl groups are protein bound [33, 34], being their decrease mainly a reflection of cysteine sulfhydryl oxidation and, considering that carbonyl group is represents a marker of free radical-mediated protein oxidation, our results indicate that D-2-HG induces protein oxidative damage in cerebral cortex and striatum of rat pups.

D-2-HG intracerebral administration alters the antioxidant defenses in cerebral cortex and striatum of neonate e rats

Next, we found that D-2-HG did not change GSH concentrations in striatum (Figure 4B) [$t_{(8)} = 0.7871$; $P = 0.4539$], but, in contrast, significantly decreased these levels in cerebral cortex (15%) [$F_{(3,12)} = 8.963$; $P = 0.0022$] (Figure 4A). It was also seen that melatonin was able to fully prevent D-2-HG-induced GSH diminution, in contrast to MK-802 that did not change this decrease (Figure 4A). These findings indicate an impairment of the most important brain antioxidant defense by this organic acid in the cerebral cortex.

Finally, we evaluated the effects of D-2-HG treatment on the enzymatic antioxidant defenses in cerebral cortex of neonate rats. It was seen that D-2-HG significantly increased SOD (24%) (Figure 5A) [$F_{(3,12)} = 21.38$; $P < 0.0001$] and CAT (61%) [$F_{(3,12)} = 10.88$; $P = 0.0010$] (Figure 5B) activities, without changing GPx activity [$t_{(7)} = 1.978$; $P = 0.0884$] (Figure 5C). Furthermore, pre-treatment with melatonin and Mk-801 was not able to reverse the effects of D-2-HG on the activity of these antioxidant enzymes.

D-2-HG provokes extensive vacuolation in cerebral cortex and causes glial reactivity in striatum of neonatal rats

The effect of D-2-HG intracerebroventricular administration on the brain integrity was then studied by HE staining, 24 hours after the D-2-HG icv injection. We observed that D-2-HG administration provoked intense edema and vacuolation in the cerebral cortex (4-fold) [$t_{(6)} = 21.11$; $P < 0.0001$] (Figure 6) with less effects in the striatum (63%) [$t_{(6)} = 7.00$; $P = 0.0004$] (Figure 7). We also evaluated whether these toxic effects could induce astrocyte reactivity. We verified that D-2-HG increased GFAP staining (twofold) in the striatum [$t_{(7)} = 6.406$; $P = 0.0004$], with no effects on the cerebral cortex (Figure 8), indicating that this metabolite induces glial reactivity.

Discussion

Two biochemical defects are responsible for the two genetic forms of D-2-HGA, resulting in D-2-HGA type 1 and D-2-HGA type 2, being the later form the more severe condition [4]. According to the clinical manifestations and independently of the biochemical defect, two distinct neurometabolic forms of D-2HGA with severe and mild phenotypes have been recognized [9, 10]. The infantile-early-onset variant is characterized by acute symptomatology, including early infantile-onset epileptic encephalopathy with severe hypotonia, psychomotor retardation and developmental delay, fatal cardiomyopathy, facial dysmorphism and macrocephaly, and life expectancy may be from a few weeks to early adulthood [1, 4, 9, 10]. Cerebral imaging of D-2-HGA patients affected by both underlying molecular (D-2-HGA1 and D-2-HGA2) reveals brain atrophy with delayed cerebral maturation and multifocal cerebral white-matter abnormalities in the first months of life [4, 9, 10]. The mild phenotype (late-onset variant) has a more variable clinical presentation and less-consistent MRI findings than the severe phenotype; patients present with hypotonia and progressive developmental delay and mental retardation, and life expectancy remains undefined.

Although neurological features are prominent in this disorder, the pathogenesis of brain damage is still poorly known. However, previous experimental revealed neurotoxic deleterious effects of D-2-HG, disturbing redox homeostasis [11, 12, 14], mitochondrial bioenergetics [14, 16, 35] and the glutamatergic system [14, 17], suggesting that this accumulating metabolite contributes to the pathophysiology associated with the clinical features of developmental delay, hypotonia and convulsions of the affected patients. This is in line with the findings observed in patients with these disorders in which the mean plasma levels of D-2HG in type II the most severe form are around 5 times higher than those of type I [4], supporting a relationship between D-2-HG concentrations and disease severity. However, since to the best of our knowledge nothing has been reported on the role of D-2-HG in neonatal brain, we investigated whether accumulation of D-2-HG achieved by intracerebral injection of this organic acid to neonatal rats could disturb cellular redox status and provoke histopathological alterations in cerebral cortex and striatum of these animals.

We initially verified that D-2-HG administration markedly increased DCFH oxidation in cerebral cortex and striatum and nitrate and nitrite concentrations in whole brain. Since DCFH oxidation reflects ROS and nitrates and nitrites concentrations RNS [36], these data strongly support that production of these reactive species are induced by D-2-HG. These findings are in accordance with previous *in vitro* and *in vivo* animal experimental data showing that D-2-HG increase reactive species in brain of 30-day-old rats and in chick neuronal cultures [11, 12, 14].

The next step of our investigation was to evaluate whether these increases could provoke lipid and protein oxidative damage. In this particular, we observed that D-2-HG significantly increased MDA levels in cerebral cortex and striatum, corroborating previous *in vivo* and *in vitro* findings showing D-2-HG-induced increases of the levels of thiobarbituric acid-reactive substances in brain of adolescent rats [11, 12]. Since MDA is an end product of membrane fatty acid peroxidation, these data indicate that D-2-HG induces lipid peroxidation that is probably particularly important as a damaging deleterious pathomechanism in brain damage because this tissue contains a large amount of lipids. In this context, it

is emphasized that lipid peroxidation of unsaturated fatty acids of lipid neural membranes may increase their permeability altering ion transport and cellular metabolic processes [37].

D-2-HG also markedly increased carbonyl groups in the cerebral cortex and significantly decreased sulfhydryl content in the striatum. Since carbonyl groups are formed by oxidation of amino acid side chain protein residues (Pro, Arg, Lys, and Thr) and two thirds of sulfhydryl groups in cells are protein bound [33, 34], it is assumed that D-2-HG induces protein oxidative damage in the brain. We cannot rule out the possibility that MDA could react with nucleophilic groups in proteins, such as the side chains of lysine, cysteine, and histidine, forming adducts that contain the carbonyl moiety [38–40].

Regarding to the antioxidant defenses, D-2HG provoked a significant decrease of GSH concentrations in cerebral cortex of neonate rats that could be tentatively attributed to its oxidation forming oxidized glutathione by increased reactive species generation. Since GSH represents the major naturally-occurring tissue antioxidant and plays a key role in maintaining the intracellular redox state protecting crucial cellular sulfhydryl groups [36], our present findings suggest that D-2-HG impairs the tissue non enzymatic antioxidant defenses. We cannot establish at the present why GSH levels were not changed in the striatum, but a conceivable explanation could be the higher turnover of GSH recovery in this cerebral structure that is well vascularized with the highest blood flow compared to other brain structures.

We also demonstrated that *in vivo* D-2-HG intracerebral administration increased SOD and CAT activities, without changing Gpx activity in cerebral cortex of the neonate rats. It may be presumed that the increased activities of SOD and CAT might have occurred due to the overexpression of these enzymes at gene level in order to compensate the increased formation of superoxide and hydrogen peroxide that are the natural substrate of these enzymes.

On the other hand, we presume that D-2HG-induced lipid and protein oxidative damage and decreased GSH concentrations probably resulted from the enhanced generation of ROS and RNS, hypothesis that is supported by the observations that melatonin, that scavenges mainly the radical hydroxyl and peroxy but also RNS [41, 42], was able to totally prevent D-2-HG pro-oxidant effects. We may also assume that the decreased concentrations of GSH, an important brain antioxidant defense against lipid and protein oxidative damage and protector of sulfhydryl groups from oxidation, by its reactive species scavenging properties [43, 44] responsible for the initiation of these processes, may have also contributed to these oxidative effects, making lipids and proteins more vulnerable to the oxidative damage caused by D-2-HG through ROS formation. Otherwise, our results, showing that the classical antagonist of glutamate NMDA receptors MK-801 prevented lipid and protein oxidative damage, as well as ROS formation and the antioxidant defense decrease, indicate that overstimulation of these receptors may also have happened possibly because of the similarity of the chemical structures between this organic acid and glutamate. This presumption is supported by a previous study that has shown activation of NMDA receptors by receptors by D-2-HG in primary neuronal cultures [14].

Taken together, our present findings strongly indicate that D-2-HG induces oxidative stress *in vivo* in rat cerebral cortex and striatum of neonatal rats since oxidative stress results from an imbalance between the total antioxidant defenses and the reactive species generated in a tissue. This process is

highly deleterious to the brain because this tissue has a high rate of oxidative metabolism coupled to superoxide production, lower activity of antioxidant enzymes, and higher peroxidation potential (high content of polyunsaturated fatty acids) [36, 45]. In this scenario, it is stressed the capability of ROS and RNS to oxidize important cellular molecules, including lipids, proteins, sugars, and DNA, representing a key event in the pathogenic cascade leading to necrotic and apoptotic cell death [46, 47].

In order to test whether D-2-HG *in vivo* administration could cause brain injury, histopathological studies were carried out 24 h after D-2-HG injection and clearly revealed extensive edema and vacuolation in the cerebral cortex, with less intense effects in the striatum. Although not proven, we assume that these brain alterations could be possibly related to the disruption of redox homeostasis elicited by this organic acid. In addition, 15 days after D-2-HG injection we observed increased GFAP staining in striatum, indicating that this compound provokes glial reactivity, a condition triggered by brain injury and characterized by astrocyte activation, and, in severe cases, astrocyte proliferation [48, 49]. These alterations have the potential to protect the surrounding neurons, but, when exacerbated, they may cause detrimental effects leading to neuronal damage, as observed in some neurodegenerative diseases [18, 50–52].

It is difficult to determine at present the pathophysiological relevance of our present findings since the actual intracellular concentrations of D-2-HG in D-2-HGA are still unknown. Plasma D-2-HGA levels affected patients are up to 840-fold increased, compared to normal individuals and may reach 0.8 mM. However, considering that the concentrations of organic acids accumulating within neural cells in organic acidemias are usually much higher than those of plasma and cerebrospinal fluid (trapping theory) [53] and since D-2-HGA is considered a cerebral organic acidemia because symptoms are totally or almost exclusively neurologic and D-2-HG is formed and trapped in the CNS [54, 55], it is conceivable that much higher concentrations of this neurotoxic organic acid are found in the brain of the affected patients where it could potentially exert its neurotoxic effects disturbing cellular redox homeostasis.

Conclusion

In conclusion, intracerebral administration of D-2-HG provokes lipid and protein oxidative damage and disrupts the antioxidant defenses in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats. Most of these effects were prevented by the potent antioxidant melatonin and by the NMDA antagonist MK-801, implying that reactive species generation and overstimulation of these glutamate receptors may underlie the altered cellular redox status. This is the first report showing that a single D-2-HG injection can cause oxidative stress and histopathological changes in the brain of neonatal rats. These *in vivo* findings and the *in vitro* experimental animal and *in vitro* humans studies strongly indicate that disruption of cellular redox status may be involved in the neurologic symptoms and brain abnormalities of patients affected by D-2-HGA.

On the other hand, it is feasible that sustained elevated levels of D-2-HG found in the patients may lead to chronic oxidative stress, as found in a previous study [56]. Another novel and important finding of the present investigation is the histopathological alterations observed in the cerebral cortex and

striatum of pups injected with D-2-HG that are presumably caused by disruption of redox homeostasis. In case our present *in vivo* findings are further confirmed in tissues (blood and cultivated fibroblasts) from individuals affected by D-2HGA, it is tempting to speculate that antioxidants could be supplemented to the affected patients as a potential adjuvant therapy to prevent or attenuate neurologic symptoms.

Compliance with Ethical Standards

Ethical Approval

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the UFRGS, Porto Alegre, Brazil, and followed the “National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publications No. 85–23, revised 2011).

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Kranendijk M, Struys EA, Gibson KM, et al (2010) Evidence for genetic heterogeneity in D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Hum Mutat* 31:279–83. <https://doi.org/10.1002/humu.21186>
2. Kranendijk M, Struys EA, van Schaftingen E, et al (2010) IDH2 Mutations in Patients with D-2-Hydroxyglutaric Aciduria. *Science* (80-) 330:336–336. <https://doi.org/10.1126/science.1192632>
3. Wajner M, Goodman SI (2011) Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: Insights from human and animal studies. *J Bioenerg Biomembr* 43:31–38. <https://doi.org/10.1007/s10863-011-9324-0>
4. Kranendijk M, Struys EA, Salomons GS, et al (2012) Progress in understanding 2-hydroxyglutaric acidurias. *J Inherit Metab Dis* 35:571–587. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9462-5>
5. Haliloglu G, Temucin CM, Oguz KK, et al (2009) Peripheral neuropathy in a patient with D-2-hydroxyglutaric aciduria. *J Inherit Metab Dis* 32:21–25. <https://doi.org/10.1007/s10545-009-0933-2>
6. Reddy N, Calloni SF, Vernon HJ, et al (2018) Neuroimaging Findings of Organic Acidemias and Aminoacidopathies. *RadioGraphics* 38:912–931. <https://doi.org/10.1148/rg.2018170042>
7. Yeetong P, Phewplung T, Kamolvisit W, et al (2018) Widespread and debilitating hemangiomas in a patient with enchondromatosis and D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Skeletal Radiol* 47:1577–1582. <https://doi.org/10.1007/s00256-018-2963-z>
8. Kwong KL, Mak T, Fong CM, et al (2002) D-2-Hydroxyglutaric aciduria and subdural haemorrhage. *Acta Paediatr* 91:716–8
9. van der Knaap MS, Jakobs C, Hoffmann GF, et al (1999) D-2-hydroxyglutaric aciduria: further clinical delineation. *J Inherit Metab Dis* 22:404–13
10. van der Knaap MS, Jakobs C, Hoffmann GF, et al (1999) D-2-Hydroxyglutaric aciduria: biochemical marker or clinical disease entity? *Ann Neurol* 45:111–9
11. da Rosa MS, Seminotti B, Amaral AU, et al (2014) Disruption of redox homeostasis and histopathological alterations caused by in vivo intrastriatal administration of D-2-hydroxyglutaric acid to young rats. *Neuroscience* 277:281–293. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.07.011>
12. Latini A, Scussiato K, Rosa RB, et al (2003) D-2-hydroxyglutaric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Eur J Neurosci* 17:2017–2022. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02639.x>
13. Rodrigues DGB, de Moura Coelho D, Sitta Â, et al (2017) Experimental evidence of oxidative stress in patients with L-2-hydroxyglutaric aciduria and that L-carnitine attenuates in vitro DNA damage caused by D-2-hydroxyglutaric and L-2-hydroxyglutaric acids. *Toxicol Vitro* 42:47–53.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.006>

14. Kölker S, Pawlak V, Ahlemeyer B, et al (2002) NMDA receptor activation and respiratory chain complex V inhibition contribute to neurodegeneration in D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Eur J Neurosci* 16:21–28. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02055.x>
15. Da Silva CG, Ribeiro CAJ, Leipnitz G, et al (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 - Mol Basis Dis* 1586:81–91. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(01\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(01)00088-6)
16. Da Silva CG, Bueno ARF, Schuck PF, et al (2004) Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Neurochem Int* 44:45–52. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6081-7_14
17. Junqueira D, Brusque AM, Porciúncula LO, et al (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. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2003.10.005>
18. Olivera-Bravo S, Fernández A, Sarlabós MN, et al (2011) Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I. *PLoS One* 6:e20831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020831>
19. Olivera-Bravo S, Isasi E, Fernández A, et al (2014) White matter injury induced by perinatal exposure to glutaric acid. *Neurotox Res* 25:381–91. <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9445-9>
20. Olivier P, Fontaine RH, Loron G, et al (2009) Melatonin promotes oligodendroglial maturation of injured white matter in neonatal rats. *PLoS One* 4:e7128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007128>
21. Da Rosa MS, João Ribeiro CA, Seminotti B, et al (2015) In vivo intracerebral administration of L-2-hydroxyglutaric acid provokes oxidative stress and histopathological alterations in striatum and cerebellum of adolescent rats. *Free Radic Biol Med* 83:201–213. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.008>
22. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227–31
23. Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J (1998) Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 44:679–81
24. Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141–5
25. Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:357–63
26. Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347–52. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:347>

27. Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325–33
28. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–6
29. Marklund SL (1985) Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. *FEBS Lett* 184:237–9
30. Amaral AU, Seminotti B, da Silva JC, et al (2018) Induction of Neuroinflammatory Response and Histopathological Alterations Caused by Quinolinic Acid Administration in the Striatum of Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient Mice. *Neurotox Res* 33:593–606.
<https://doi.org/10.1007/s12640-017-9848-0>
31. Moura AP, Parmeggiani B, Gasparotto J, et al (2018) Glycine Administration Alters MAPK Signaling Pathways and Causes Neuronal Damage in Rat Brain: Putative Mechanisms Involved in the Neurological Dysfunction in Nonketotic Hyperglycinemia. *Mol Neurobiol* 55:741–750.
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-0319-z>
32. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–75
33. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346–57
34. Requejo R, Chouchani ET, Hurd TR, et al (2010) Measuring mitochondrial protein thiol redox state. *Methods Enzymol* 474:123–47. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)74008-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)74008-8)
35. Latini A, Da Silva CG, Ferreira GC, et al (2005) Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab* 86:188–199.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.05.002>
36. Halliwell, B., Gutteridge J (2015) Oxidative stress and redox regulation. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc., New York, NY, pp 199–2083
37. Yadav UCS, Ramana K V (2013) Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev* 2013:690545.
<https://doi.org/10.1155/2013/690545>
38. Orioli M, Aldini G, Beretta G, et al (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* 827:109–18. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.04.025>
39. Fritz KS, Petersen DR (2013) An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. *Free Radic Biol Med* 59:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.025>
40. 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.
<https://doi.org/10.1002/mas.21381>
41. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, et al (2006) Melatonin as antioxidant,

- geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta* 1757:573–89.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.03.012>
42. 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* 34:237–56. <https://doi.org/10.1385/CBB:34:2:237>
 43. Halliwell B (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *PLANT Physiol* 141:312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
 44. Halliwell, B., Gutteridge J (2015) Antioxidant defenses synthesized in vivo. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc., New York, NY, pp 77–151
 45. Halliwell B (2001) Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases. *Drugs Aging* 18:685–716. <https://doi.org/10.2165/00002512-200118090-00004>
 46. Circu ML, Aw TY (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48:749–62. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>
 47. Niizuma K, Endo H, Chan PH (2009) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem* 109 Suppl 1:133–8. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05897.x>
 48. Sofroniew M V, Vinters H V (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
 49. Anderson MA, Ao Y, Sofroniew M V. (2014) Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett* 565:23–29. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>
 50. Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, et al (2004) Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* 25:663–74. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.01.007>
 51. McGeer PL, McGeer EG (2008) Glial reactions in Parkinson’s disease. *Mov Disord* 23:474–483. <https://doi.org/10.1002/mds.21751>
 52. De Keyser J, Mostert JP, Koch MW (2008) Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci* 267:3–16. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.08.044>
 53. Hoffmann GF, Meier-Augenstein W, Stöckler S, et al (1993) Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *J Inher Metab Dis* 16:648–69
 54. Sauer SW, Opp S, Mahringer A, et al (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* 1802:552–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.03.003>
 55. Sauer SW, Okun JG, Fricker G, 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* 97:899–910. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03813.x>
56. Rodrigues DGB, de Moura Coelho D, Sitta Â, et al (2017) Experimental evidence of oxidative stress in patients with L-2-hydroxyglutaric aciduria and that L-carnitine attenuates in vitro DNA damage caused by D-2-hydroxyglutaric and L-2-hydroxyglutaric acids. *Toxicol Vitr* 42:47–53. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.006>

Legend to figures

Fig. 1 Effect of intracerebral administration of D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG; 0.750 $\mu\text{mol/g}$) on DCFH oxidation in the cerebral cortex (A) and striatum (B) and on nitrate and nitrite concentrations in the forebrain (C) of neonatal rats. Data are represented as mean \pm SD for four to six independent experiments (animals) performed in triplicate and are expressed as percentage of controls (controls: (A) DCFH oxidation [$\mu\text{mol} / \text{mg protein}$]: 2.60 ± 0.14 ; (B) DCFH oxidation [$\mu\text{mol} / \text{mg protein}$]: 3.69 ± 0.46 ; (C) nitrates and nitrites concentration [$\mu\text{mol} / \text{mg protein}$]: 1.40 ± 0.2). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, compared to D-2-HG (Tukey multiple range test and Student's t test for unpaired samples).

Fig. 2 Effect of intracerebral administration of D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG; 0.750 $\mu\text{mol/g}$) on malondialdehyde (MDA) levels in the cerebral cortex (A) and striatum (B) of neonatal rats. Data are represented as mean \pm SD for four to six independent experiments (animals) performed in triplicate and are expressed as percentage of controls (controls: (A) MDA levels [$\text{nmol} / \text{mg protein}$]: 0.67 ± 0.08 ; (B) MDA levels [$\text{nmol} / \text{mg protein}$]: 1.71 ± 0.14). ** $P < 0.01$, compared to control; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, compared to D-2-HG (Tukey multiple range test).

Fig. 3 Effect of intracerebral administration of D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG; 0.750 $\mu\text{mol/g}$) on sulfhydryl content in the cerebral cortex (A) and striatum (B) and on carbonyl formation in the cerebral cortex of neonatal rats. Data are represented as mean \pm SD for four to six independent experiments (animals) performed in triplicate and are expressed as percentage of controls (controls: (A) sulfhydryl content [$\text{nmol} / \text{mg protein}$]: 41.8 ± 3.92 ; (B) sulfhydryl content [$\text{nmol} / \text{mg protein}$]: 33.9 ± 3.5 ; (C) carbonyl formation [$\text{nmol} / \text{mg protein}$]: 4.81 ± 0.38). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, compared to control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, compared to D-2-HG (Tukey multiple range test).

Fig. 4 Effect of intracerebral administration of D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG; 0.750 $\mu\text{mol/g}$) on reduced glutathione (GSH) concentrations in the cerebral cortex (A) and striatum (B) of neonatal rats. Data are represented as mean \pm SD for four to six independent experiments (animals) performed in triplicate and are expressed as percentage of controls (controls: (A) GSH concentrations [$\text{nmol} / \text{mg protein}$]: 0.67 ± 0.08 ; (B) GSH concentrations [$\text{nmol} / \text{mg protein}$]: 1.71 ± 0.14). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared to control; ## $P < 0.01$, compared to D-2-HG (Tukey multiple range test and Student's t test for unpaired samples).

Fig. 5 Effect of intracerebral administration of D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG; 0.750 $\mu\text{mol/g}$) on the activities of superoxide dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) and glutathione peroxidase (GPx) (C) in the cerebral cortex of neonatal rats. Data are represented as mean \pm SD for four to six independent experiments (animals) performed in triplicate and are expressed as percentage of controls (controls: (A) SOD activity [$\text{U} / \text{mg protein}$]: 4.47 ± 0.32 ; (B) CAT activity [$\text{U} / \text{mg protein}$]: 1.42 ± 0.28 ; GPx activity [$\text{U} / \text{mg protein}$]: 21.07 ± 1.49). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to control (Tukey multiple range test and Student's t test for unpaired samples).

Fig. 6 Light microscopy images showing hematoxylin and eosin (HE) staining of the cerebral cortex from control (PBS) (A, C) and D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG)-injected neonatal rats (B, D). Animals were sacrificed 24 h after D-2-HG intracerebroventricular administration. Representative images were obtained from six rats per group. HE staining with magnification of $\times 100$ and $\times 400$. (E) Quantification of the number of vacuoles was performed with $\times 400$ magnification by using the median of five randomly selected fields from three cerebral cortex sections per brain. Values are mean \pm standard deviation for six rats per group. ***P < 0.001 compared to PBS-injected rats (Student's t test for unpaired samples)

Fig. 7 Light microscopy images showing hematoxylin and eosin (HE) staining of the striatum from control (PBS) (A, C) and D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG)-injected neonatal rats (B, D). Animals were sacrificed 24 h after D-2-HG intracerebroventricular administration. Representative images were obtained from six rats per group. HE staining with magnification of $\times 100$ and $\times 400$. (E) Quantification of the number of vacuoles was performed with $\times 400$ magnification by using the median of five randomly selected fields from three cerebral cortex sections per brain. Values are mean \pm standard deviation for six rats per group. ***P < 0.001 compared to PBS-injected rats (Student's t test for unpaired samples).

Fig. 8 Effect of intracerebral administration of D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG; 0.750 $\mu\text{mol/g}$) on GFAP staining in cerebral cortex (A) and striatum (B) of 15-day-old rats. Animals were sacrificed 15 days after D-2-HG injection. Representative images of GFAP immunofluorescence staining were obtained from six rats per group. Quantification of GFAP staining in cerebral cortex and striatum was performed with $\times 400$ magnification. Data are represented as mean \pm SD for six independent experiments (animals) performed in triplicate and expressed as percentage of control. ***P < 0.001 compared to control (PBS) (Student's t test for unpaired samples).

Figure 1

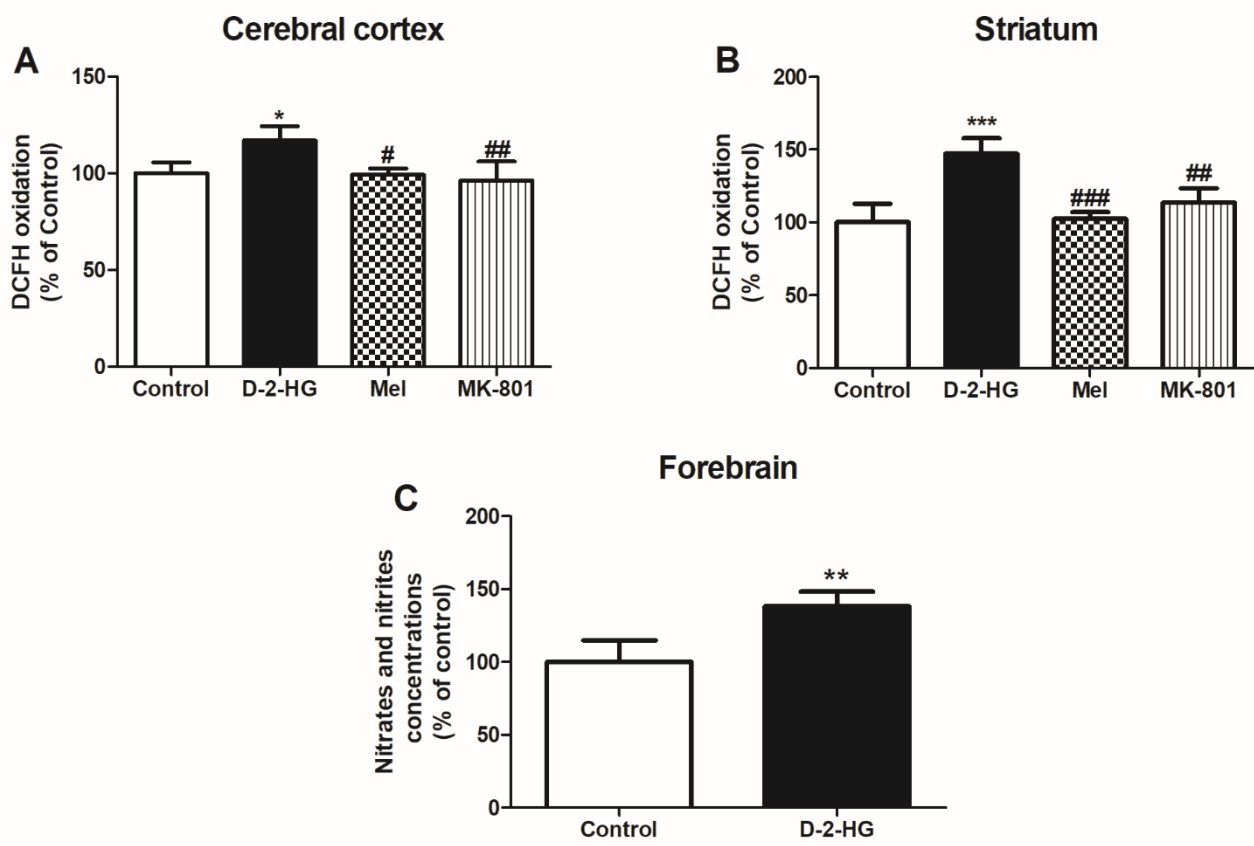


Figure 2

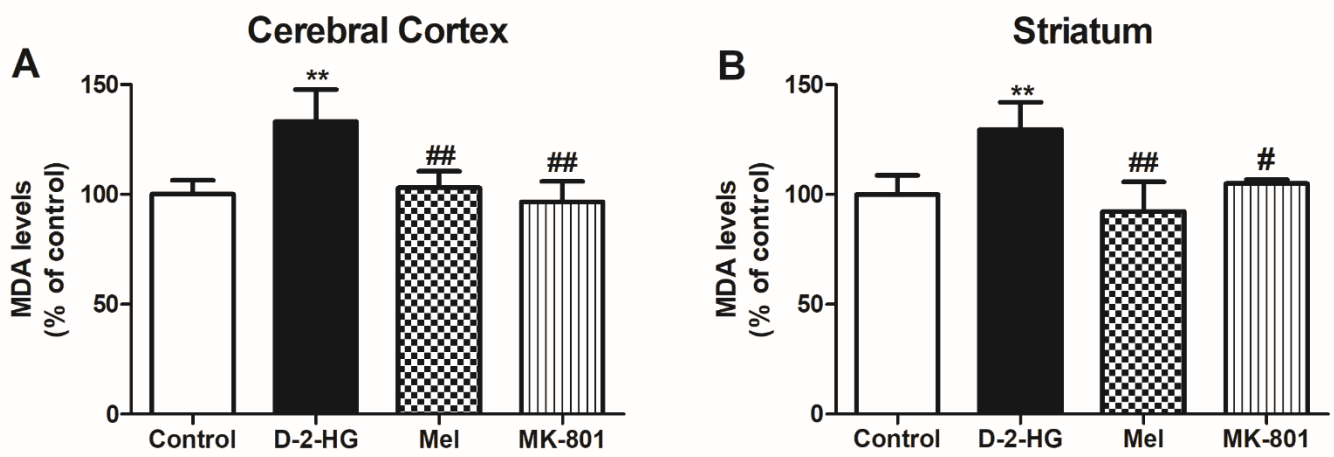


Figure 3

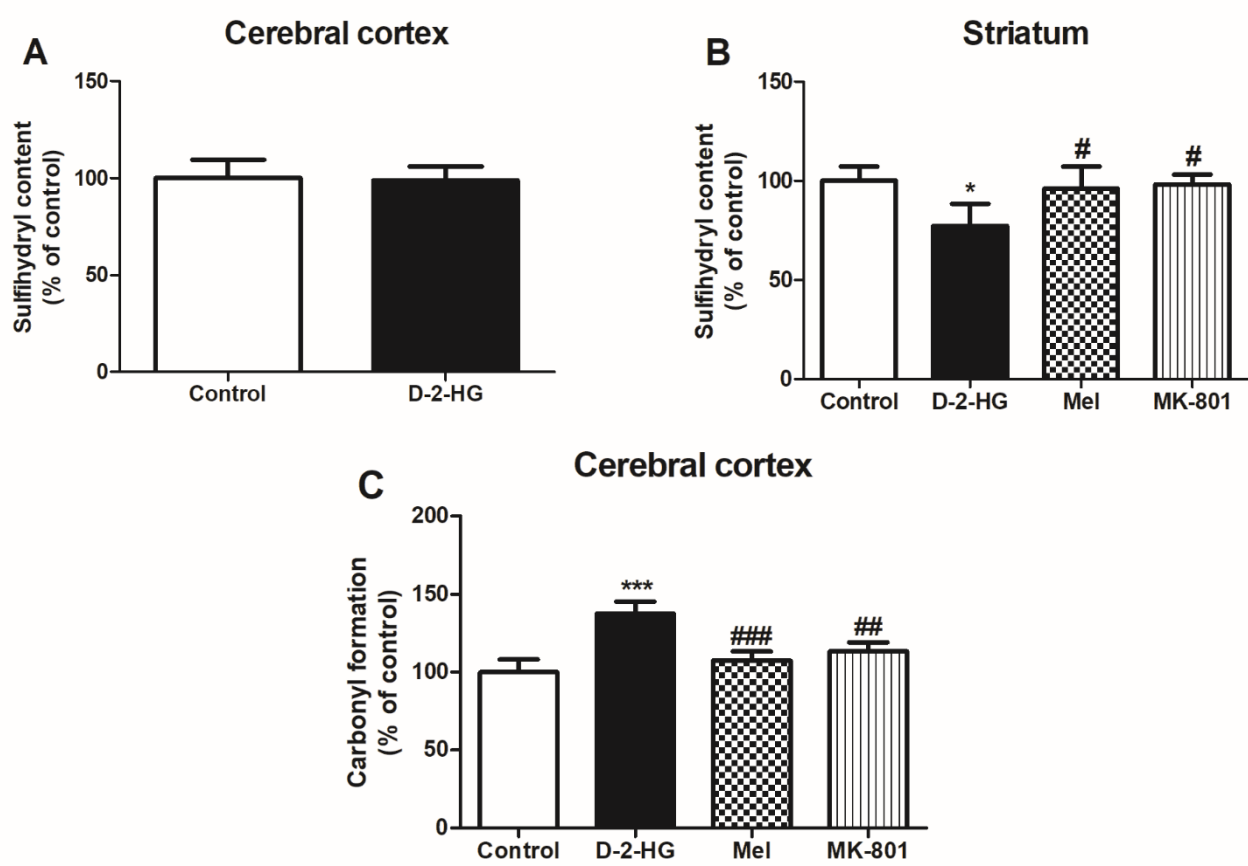


Figure 4

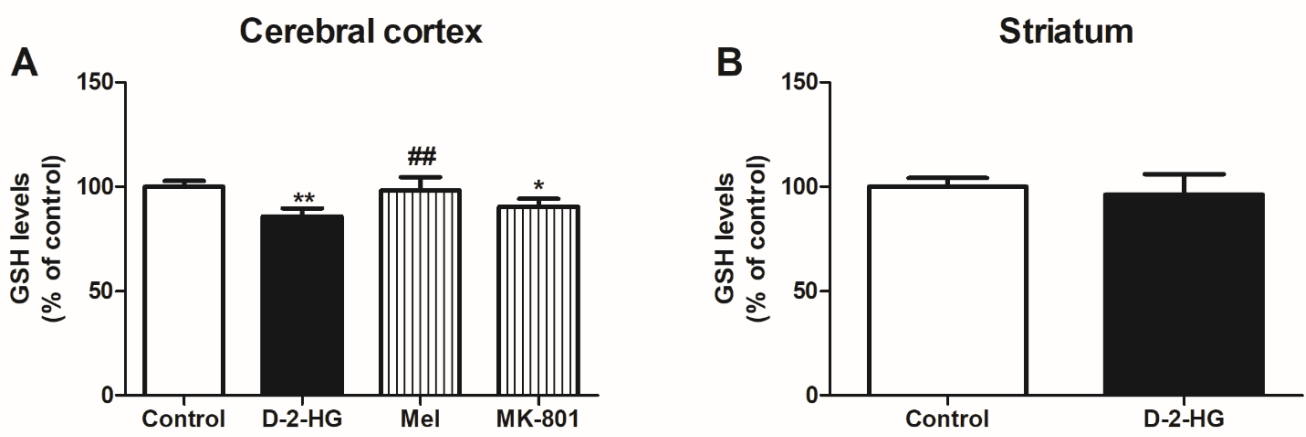


Figure 5

Cerebral Cortex

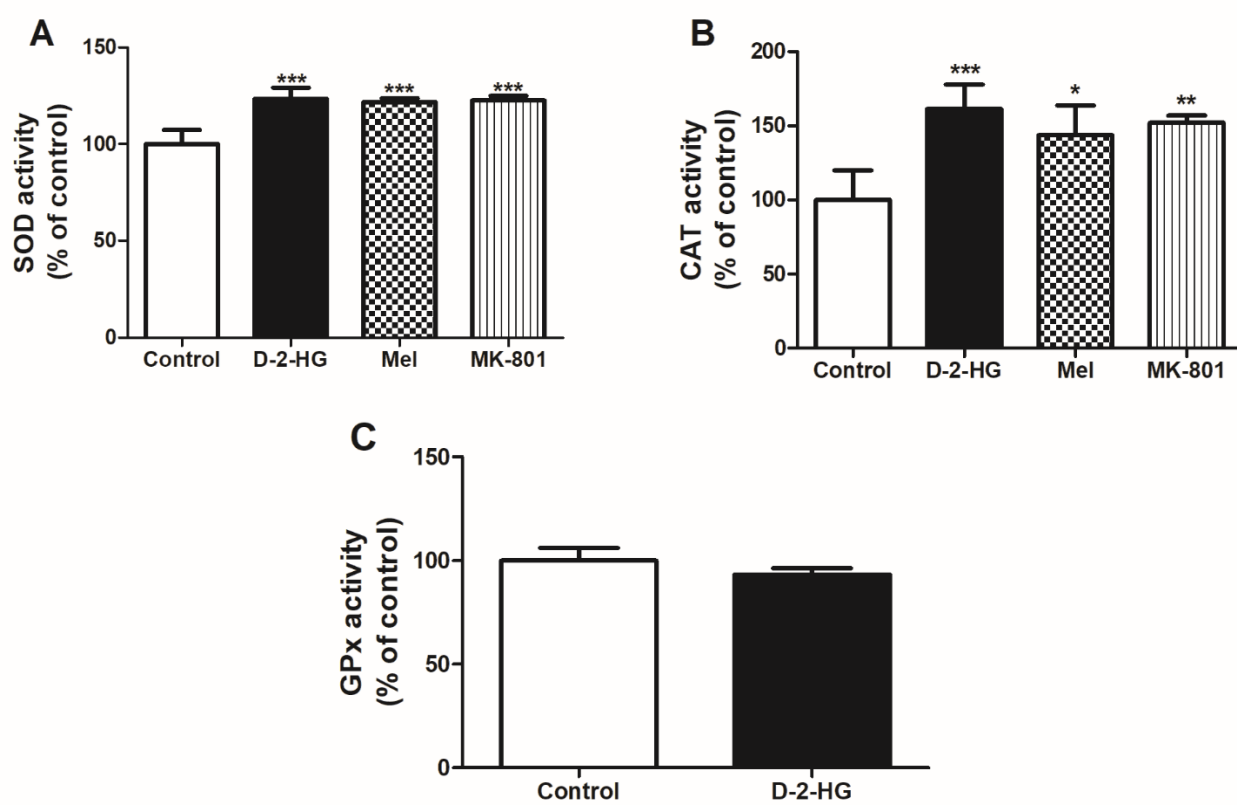


Figure 6

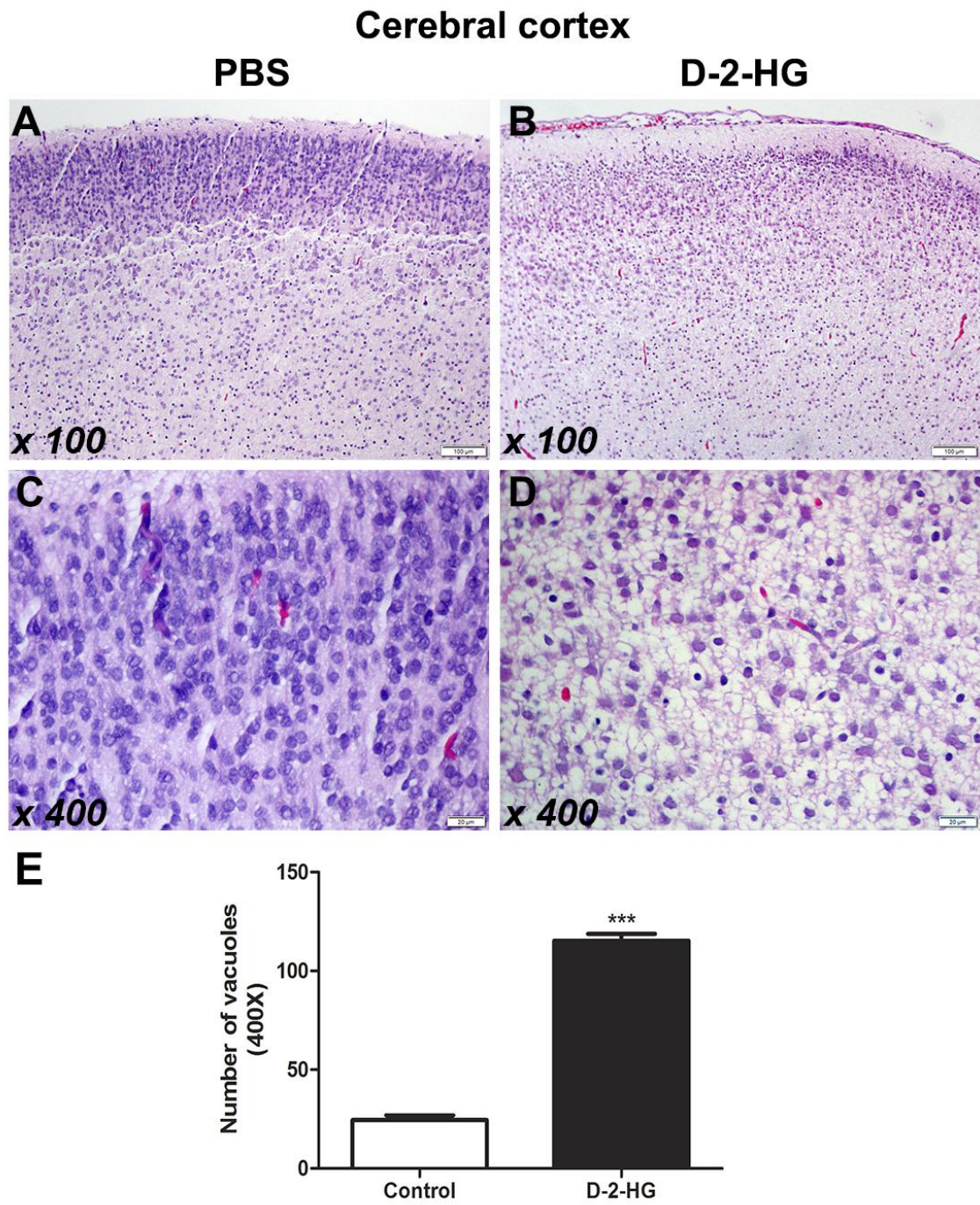


Figure 7

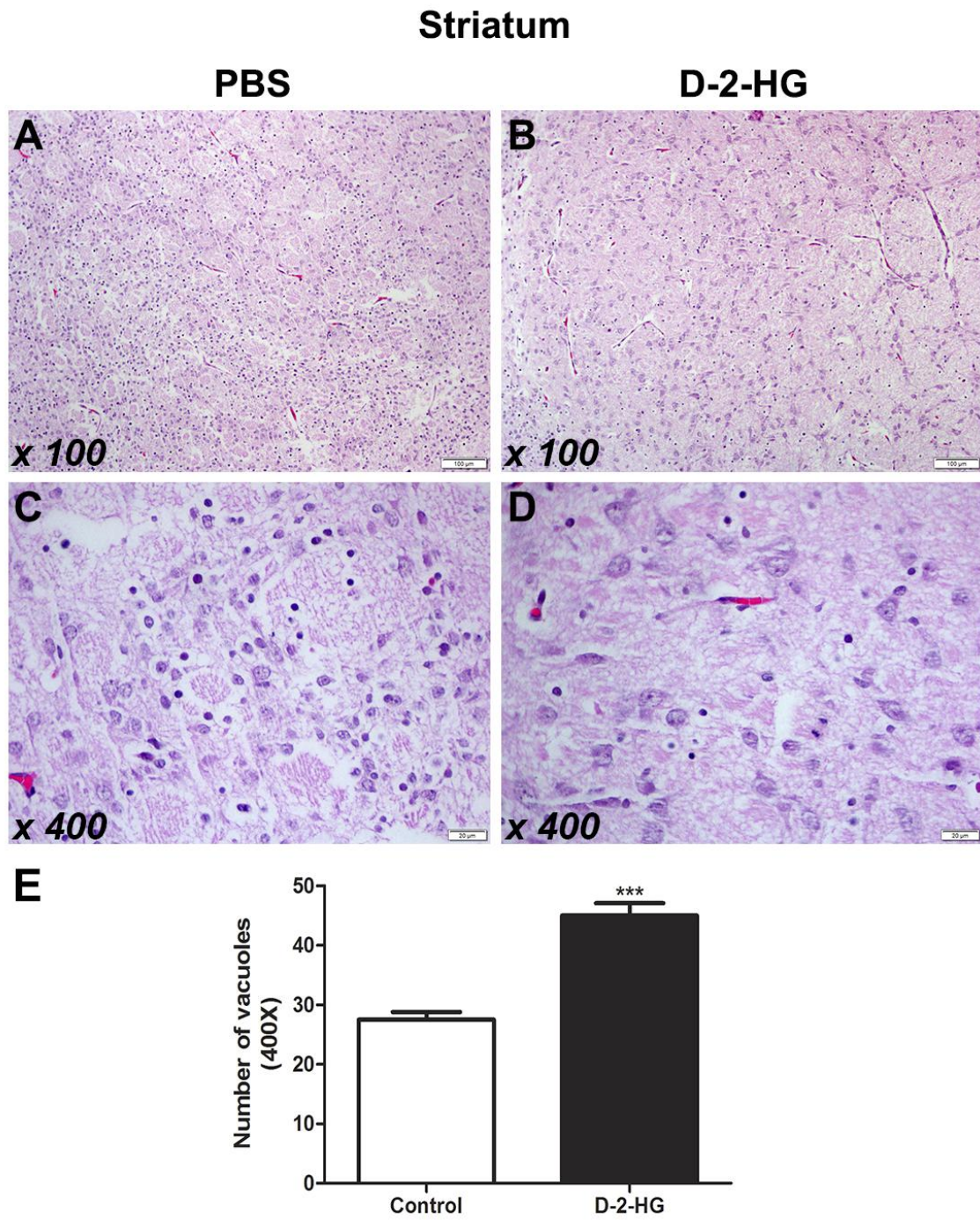
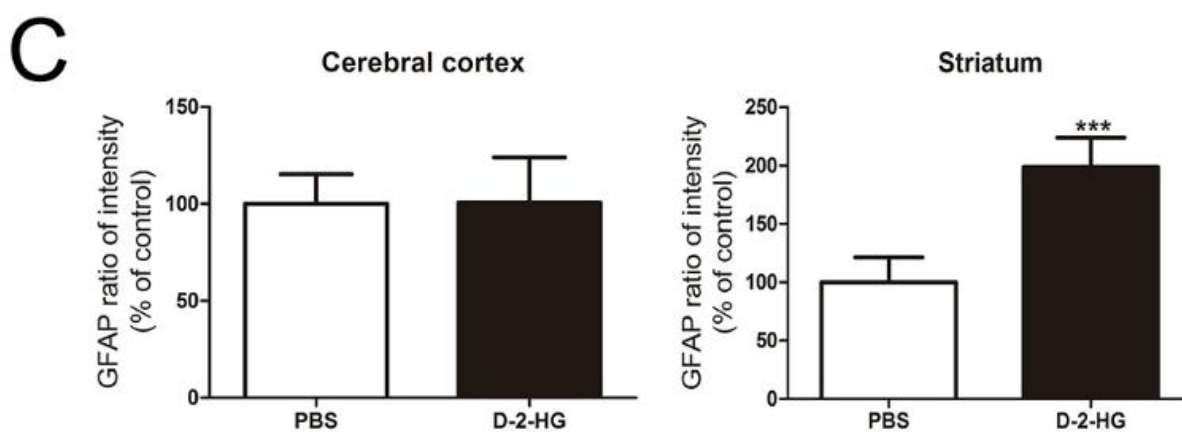
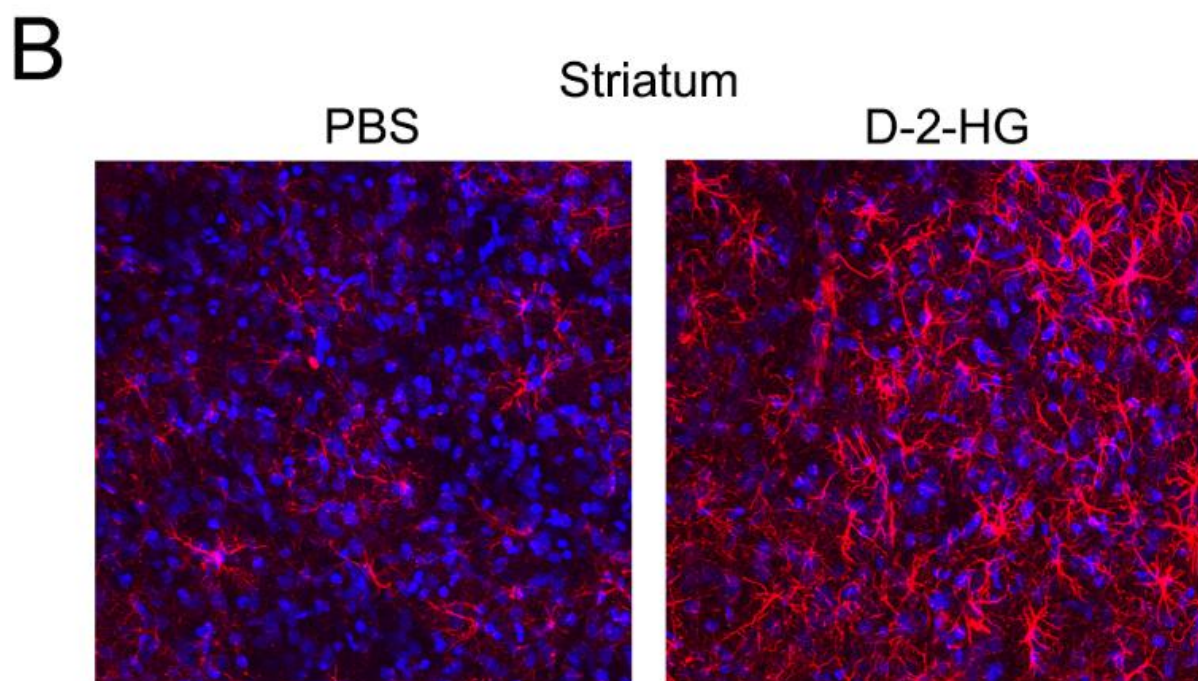
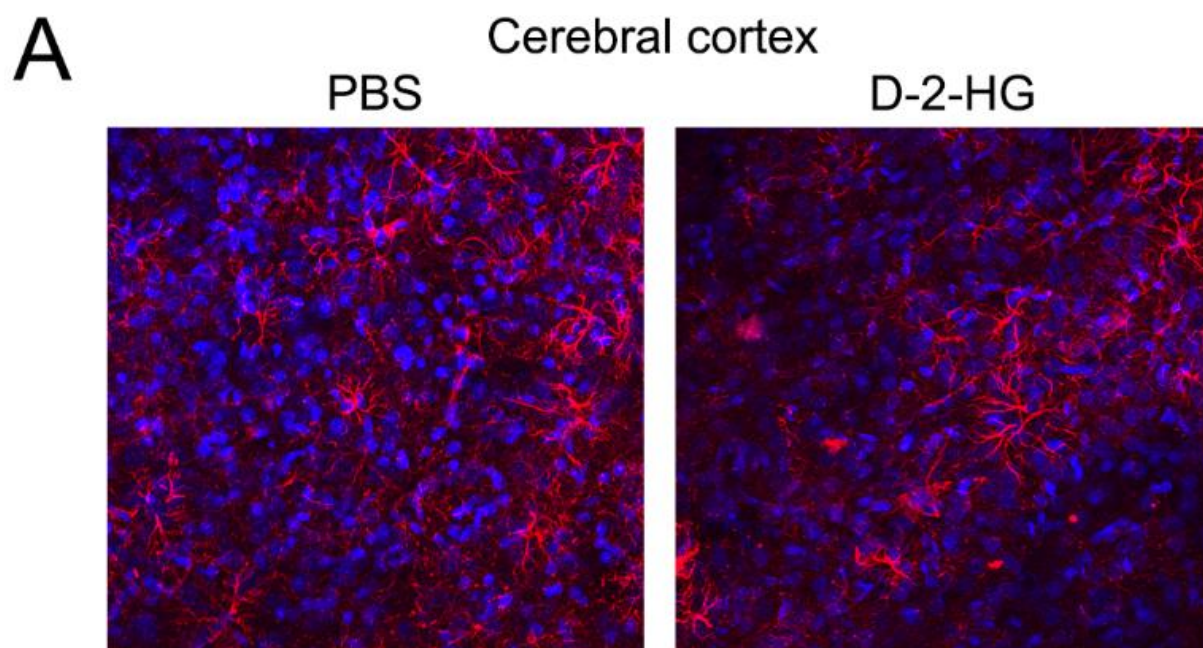


Figure 8



PARTE III
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

III.1. DISCUSSÃO

Indivíduos afetados pela D-2-HGA, apresentam uma sintomatologia clínica predominantemente neurológica, que pode incluir crises epiléticas graves, hipotonia e retardo mental e psicomotor. Os achados neuropatológicos evidenciados em estudos de ressonância magnética nuclear cerebral dos pacientes geralmente mostram alargamento dos ventrículos laterais, aumento dos espaços subaracnóides frontais, sinais de atraso na maturação cerebral e anormalidades nos gânglios da base e na substância branca (van der Knaap et al. 1999b, a). Apesar de estudos recentes terem elucidado as bases moleculares que causam as duas formas de D-2-HGA (Kranendijk et al. 2010a, b), as alterações celulares e os mecanismos patológicos que levam ao dano cerebral e quadro neurológico severo permanecem pouco esclarecidos. No entanto, foi sugerido que os fenótipos patológicos dos pacientes afetados resultam dos efeitos tóxicos do D-2-HG no sistema nervoso central, o que corrobora com o fato de que os pacientes com D-2-HGA tipo II, que apresentam maior acúmulo desse ácido, exibam comprometimento neurológico mais severo do que os acometidos por D-2-HGA tipo I. Nesse contexto, a semelhança estrutural do D-2-HG com glutamato e o α -cetogluturato, dois metabólitos centrais no sistema glutamatérgico, sugere que a fisiopatologia da doença possa envolver alterações desse sistema ou vias de metabolismo do α -cetogluturato. Neste contexto, estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que este metabólito prejudica a homeostase redox e a bioenergética mitocondrial, bem como causa alterações do sistema glutamatérgico em ratos em desenvolvimento (30 dias de vida) e pacientes com D-2-HGA (Da Silva et al. 2002; Kölker et al. 2002; Latini et al. 2003, 2005; Junqueira et al. 2004; da Rosa et al. 2014; Rodrigues et al. 2017). Esses resultados talvez expliquem a acidemia láctica presente em pacientes afetados por essa doença, indicando disfunção mitocondrial (van der Knaap et al. 1999b, a). No entanto, os resultados experimentais até agora descritos foram obtidos em ratos adolescentes.

Dessa forma, visando melhor compreender os sintomas neurológicos observados na D-2-HGA principalmente a tipo 2 que acometesse recém-nascidos ou afetados na primeira infância, e levando em conta a inexistência de trabalhos científicos que avaliem a neurotoxicidade do D-2-HG em modelo animal no período neonatal, investigamos se a administração intracerebroventricular deste metabólito poderia perturbar o estado redox e induzir alterações histopatológicas no córtex cerebral e estriado destes animais. Ressalta-se que a escolha destas estruturas cerebrais ocorreu

pelo fato destas serem as principais afetadas neste EIM (Misra et al. 2005; Kranendijk et al. 2012).

Inicialmente, investigamos se a administração intracerebral *in vivo* do D-2-HG em ratos neonatos poderia induzir a produção de espécies ativas. Determinamos então os níveis de DCFH que reflete predominantemente espécies reativas de oxigênio (EROS) e os níveis de nitratos e nitritos que são reflexo da produção de espécie reativas de nitrogênio (ERN) (Halliwell, B., Gutteridge 2015d). Verificamos que a administração icv de D-2-HG aumentou significativamente a oxidação de DCFH em córtex cerebral e estriado, bem como os níveis de nitratos e nitritos em cérebro total. Nossos resultados estão de acordo com os descritos por da Rosa e colaboradores (2014) que demonstraram *in vivo* um aumento de ERN em ratos Wistar de 30 dias de vida, e também com os de Kölker e colaboradores (2002) que observaram que o D-2-HG aumenta a geração de ERO *in vitro* em neurônios de pintos.

O próximo passo de nossa investigação foi determinar se esse aumento de espécies reativas poderia causar dano oxidativo lipídico e proteico. Observamos que o D-2-HG promoveu o aumento significativo dos níveis de MDA em córtex cerebral e estriado, corroborando com os achados *in vitro* e *in vivo* relatados anteriormente que demonstraram que o D-2-HG aumenta os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no cérebro de ratos de 30 dias (Latini et al. 2003; da Rosa et al. 2014). Uma vez que o MDA é um produto final da peroxidação de ácidos graxos insaturados, esses dados indicam que o D-2-HG induz dano oxidativo a esta importante classe de biomoléculas no cérebro. É importante notar que a lipoperoxidação pode comprometer as membranas 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 and Ramana 2013).

Também verificamos que o D-2-HG promoveu uma redução significativa do conteúdo de grupos sulfidrilas em estriado e aumentou a formação de grupamentos carbonila no córtex cerebral. Sabendo que os grupamentos carbonila são formados pela oxidação de resíduos proteicos da cadeia lateral de aminoácidos (Pro, Arg, Lys e Thr) e que dois terços dos grupos sulfidrilas nas células estão ligados a proteínas (Levine et al. 1994; Requejo et al. 2010), assume-se que o D-2-HG induz oxidação de proteínas em ambas as estruturas avaliadas. Nesse contexto, é também possível que a oxidação das proteínas causada pelo D-2-HG aqui observada pode estar relacionada ao aumento nas

concentrações de MDA, já que este composto reage rapidamente com grupos nucleofílicos de proteínas carboniladas, levando a formação de adutos (ligações covalentes entre grupos proteicos secundários a dano oxidativo) (Orioli et al. 2005; Fritz and Petersen 2013; Fedorova et al. 2014). Presumimos que o dano oxidativo lipídico e proteico possa dever-se ao aumento na produção de ERO e ERN provocadas por esse ácido orgânico.

Relativamente às defesas antioxidantes, nossos dados demonstraram que o D-2-HG provoca uma diminuição significativa nas concentrações de GSH no córtex cerebral, o que também poderia ser atribuído ao aumento da produção de radicais livres observado neste tecido. Embora não tenhamos até o presente momento as razões pelas quais os níveis de GSH não se alteraram no estriado, é possível que a regeneração desse potente antioxidante seja mais rápida nesse tecido que corresponde ao tecido cerebral mais vascularizado no cérebro. Tendo em vista que o GSH desempenha um papel fundamental na manutenção do estado redox intracelular por ser o antioxidante não enzimático mais abundante no cérebro e também ser 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 em prevenir o dano oxidativo associado ao processo de produção de radicais livres (Halliwell, B., Gutteridge 2015a). Assim, uma diminuição destas concentrações torna o córtex cerebral mais suscetível ao dano oxidativo as suas biomoléculas.

Quanto as atividades das enzimas antioxidantes somente foram medidas no córtex cerebral. Verificamos que a administração do D-2-HG a ratos neonatos provocou aumento significativo da atividade das enzimas CAT e SOD no córtex cerebral, sem alterar a atividade da GPx. Embora não tenhamos investigado os mecanismos que levaram ao aumento de algumas atividades enzimáticas, é possível que o aumento das atividades dessas enzimas tenha ocorrido devido à indução da expressão das mesmas a nível gênico por um mecanismo compensatório em resposta ao aumento na formação de espécies reativas, principalmente do radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Neste particular, é sabido que as ERO regulam a expressão de inúmeros genes, incluindo aqueles que codificam para enzimas antioxidantes por vias de sinalização específicas (Rushmore et al. 1991; Lakshminarayanan et al. 1998; Halliwell, B., Gutteridge 2015a). Assim, o aumento da atividade da SOD poderia também ser secundário ao aumento das concentrações do radical superóxido, convertendo-o ao

peróxido de hidrogênio, enquanto o aumento da atividade da CAT facilitaria a conversão do peróxido de hidrogênio a água.

Outros achados importantes do presente estudo foram que o pré-tratamento dos ratos neonatos com o antioxidante melatonina, uma hora antes da administração icv de D-2-HG, foi capaz de prevenir completamente, tanto em córtex quanto em estriado, os efeitos pró-oxidantes do metabólito sobre o aumento dos níveis de MDA, formação de grupamentos carbonila e a diminuição do conteúdo de grupos sulfidrilas e dos níveis de GSH, bem como evitou o aumento da oxidação de DCFH. Esses resultados reforçam a hipótese de que o dano oxidativo lipídico e proteico, bem como a diminuição das defesas antioxidantes nos tecidos cerebrais, sejam devidos ao aumento na produção de especialmente ERO, mais particularmente os radicais hidroxila e peroxil que são sequestrados pela melatonina (Reiter et al. 2001; Anisimov et al. 2006; Halliwell, B., Gutteridge 2015c). Por outro lado, o pré-tratamento com melatonina não foi capaz de normalizar o aumento das atividades das enzimas CAT e SOD pelo D-2-HG, sugerindo outras espécies ativas que não o superóxido e o peróxido de hidrogênio ou mesmo outros mecanismos para esse aumento.

Tendo em vista que o D-2-HG é estruturalmente similar ao glutamato, podendo potencialmente estimular receptores glutamatérgicos, particularmente os do tipo NMDA que promovem a entrada de cálcio nos neurônios estimulando secundariamente a síntese de ERO e ERN, testamos os efeitos do MK-801 antagonista clássico desses receptores, sobre as alterações da homeostase redox causadas pelo D-2-HG. É importante enfatizar que 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), esse influxo de cálcio também pode levar ao aumento produção de ERO por ação direta do excesso desse íon a nível mitocondrial (Reynolds and Hastings 1995; Nicholls 2004). Nossos resultados mostraram que o MK-801 preveniu totalmente a lipoperoxidação (aumento de MDA), o dano oxidativo as proteínas (aumento de carbonilas e diminuição de sulfidrilas) e a produção suprafisiológica de ERO (aumento na oxidação de DCFH) em ambas as estruturas estudadas. Porém, esse antagonista não foi capaz de alterar a atividade de nenhuma das

enzimas antioxidantes analisadas no córtex cerebral. Esses achados apontam para a participação dos receptores NMDA na indução de estresse oxidativo em córtex cerebral e estriado de ratos neonatos, possivelmente pela supra-estimulação desses receptores pelo D-2-HG.

Pacientes com D-2-HGA apresentam uma série de anormalidades na arquitetura estrutural de diversas regiões cerebrais (van der Knaap et al. 1999b, a; Kranendijk et al. 2012), sendo assim, examinamos se a administração do D-2-HG poderia causar anormalidades no córtex e estriado de ratos neonatos. A análise histopatológica através da coloração por HE, 24 horas após a injeção de D-2-HG, demonstrou que o metabólito provoca importante vacuolização e edema no córtex cerebral dos animais, com efeitos menos intensos no estriado. Nesse contexto, enfatize-se que a formação de vacúolos pode ser secundária a disfunção do metabolismo energético (Strauss and Morton 2003), excitotoxicidade (Goodman et al. 1977; Forstner et al. 1999; Hoffmann and Zschocke 1999) ou ainda ser causado por alterações da homeostase redox (Cubells et al. 1994; Wilt et al. 2000; Saxena et al. 2010). Nossos resultados obtidos em cérebros neonatos estão em consonância com um estudo anterior que observou vacuolização e outras anormalidades histológicas provocadas por D-2-HG no cérebro de ratos jovens (30 dias de vida) (da Rosa et al. 2014).

Também observamos, 15 dias após a injeção de D-2-HG, que este metabólito causou um aumento na expressão de GFAP no estriado dos animais, indicando reatividade glial, uma condição desencadeada por dano ao SNC e caracterizada pela ativação e hipertrofia de astrócitos com aumento da expressão de GFAP e outros marcadores, e, em casos graves, proliferação intensa dessas células (Sofroniew and Vinters 2010; Anderson et al. 2014). Em condições fisiológicas, tais alterações astrocíticas têm o potencial de proteger os neurônios circundantes, mas em casos extremos os astrócitos podem perder funções essenciais, produzindo moléculas potencialmente tóxicas, comprometendo e exacerbando o dano neuronal, como observado em diversas doenças neurodegenerativas (Nagele et al. 2004; McGeer and McGeer 2008; De Keyser et al. 2008; Olivera-Bravo et al. 2011).

Uma vez que as concentrações cerebrais de D-2-HG em pacientes com D-2-HGA são desconhecidas, é difícil estabelecer a importância fisiopatológica dos resultados encontrados, de modo que nossos achados devam ser tomados com cuidado. No entanto, já que as concentrações de ácidos orgânicos que se acumulam nas células

neurais em acidemias orgânicas são geralmente mais elevadas do que as do plasma e do líquido cefalorraquidiano (*trapping theory*) de pacientes com várias acidemias orgânicas (Hoffmann et al. 1993; Sauer et al. 2010), é possível que as concentrações de D-2-HG estão bastante elevadas no SNC dos pacientes afetados e que nosso modelo possa ter mimetizado situação semelhante, embora não tenhamos quantificado as concentrações desse ácido orgânico após a administração icv do mesmo. Além disso, a D-2-HGA é considerada uma acidemia orgânica cerebral, em que os sintomas neurológicos e anormalidades cerebrais são predominantes ou exclusivas e os metabólitos acumulados (no caso o D-2-HG) é produzido dentro do cérebro e tem dificuldade de deixar esse tecido (Sauer et al. 2010), onde potencialmente pode exercer seus efeitos neurotóxicos perturbando a homeostase redox celular e causando alterações histopatológicas.

Em conclusão, este é o primeiro relato mostrando que a administração *in vivo* de D-2-HG a ratos neonatos prejudica a homeostase redox nas principais estruturas afetadas pela D-2-HGA. Estes efeitos foram prevenidos pelo potente antioxidante melatonina e pelo antagonista de receptores NMDA de glutamato MK-801, implicando que a geração de espécies reativas e a superestimulação destes receptores de glutamato podem contribuir para as alterações do estado redox celular. Os dados aqui apresentados, aliados a estudos anteriores em modelos *in vitro* (Latini et al. 2003) e *in vivo* (da Rosa et al. 2014) em roedores, e ainda *in vitro* em humanos (Rodrigues et al. 2017), indicam que um desequilíbrio da homeostase redox pode potencialmente contribuir, pelo menos em parte, para as alterações neurológicas encontradas nos pacientes afetados por essa doença. Finalmente, nossos achados histopatológicos denotam que o D-2-HG provoca alterações histológicas nas duas principais estruturas que são afetadas nos pacientes. Por estas razões, é possível que os resultados da presente investigação, agindo sinergicamente com outros fatores intrínsecos (gravidade e tipo de mutações) e extrínsecos, podem potencialmente contribuir para explicar a fisiopatologia dos sintomas neurológicos e anormalidades cerebrais observadas nos pacientes afetados. Caso nossos resultados neste modelo animal *in vivo* possam ser confirmados em tecidos (fibroblastos cultivados) de indivíduos afetados por D-2-HGA, é tentador especular que antioxidantes poderiam ser suplementados aos pacientes afetados como uma terapia adjuvante potencial para prevenir ou atenuar o dano oxidativo que parece estar atrelado à patologia desta doença.

III.2. CONCLUSÕES

Verificamos que a injeção icv de D-2-HG:

- Induziu o aumento da produção de ERO e ERN, determinado através da oxidação de DCFH e os níveis de nitratos e nitritos, respectivamente, em córtex cerebral e estriado ratos Wistar neonatos.
- Provocou dano oxidativo as proteínas e lipídeos em ambas as estruturas analisadas.
- Causou diminuição da principal defesa antioxidante (GSH) no córtex cerebral.
- Aumentou as atividades das enzimas antioxidantes CAT e SOD, sem alterar a atividade da GPx no córtex cerebral. Esse efeito pode ser atribuído a um provável mecanismo de compensação ao aumento da produção de espécies reativas.
- A melatonina e o Mk-801 demonstraram efeitos protetores ao impedir o aumento na produção de espécies reativas e os danos oxidativos a proteínas e lipídeos do córtex cerebral e estriado, bem como prevenir a diminuição dos níveis de GSH no córtex cerebral.
- Promoveu extensiva vacuolização e edema no córtex cerebral dos animais, com efeitos menos intensos no estriado. Além disso mediou um aumento na expressão de GFAP, indicando que reatividade glial possa também ter papel na patogenia da doença.

Como conclusão geral propomos que os prejuízos à homeostase redox somado as alterações histológicas promovidas pelo D-2-HG possam explicar, ao menos em parte, as manifestações neurológicas e as anormalidades estruturais presente no SNC de pacientes com D-2-HGA. Por fim, julgamos que os efeitos de compostos antioxidantes e fármacos que ajam sobre o sistema glutamatérgico deveriam ser melhor investigados visto que apresentaram efeitos benéficos nos parâmetros avaliados no presente estudo e poderiam ter repercussões terapêuticas positivas aos pacientes afetados por esta grave doença.

REFERÊNCIAS

- ACHOURI Y, NOËL G, VERTOMMEN D, et al (2004) Identification of a dehydrogenase acting on D-2-hydroxyglutarate. *Biochem J* 381:35–42. doi: 10.1042/BJ20031933
- Alfadhel M, Al-Thihli K, Moubayed H, et al (2013) Drug treatment of inborn errors of metabolism: a systematic review. *Arch Dis Child* 98:454–461. doi: 10.1136/archdischild-2012-303131
- Anderson MA, Ao Y, Sofroniew M V. (2014) Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett* 565:23–29. doi: 10.1016/j.neulet.2013.12.030
- Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, et al (2006) Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta* 1757:573–89. doi: 10.1016/j.bbabi.2006.03.012
- Aratani Y, Miura N, Ohno N, Suzuki K (2012) [Role of neutrophil-derived reactive oxygen species in host defense and inflammation]. *Med Mycol J* 53:123–8
- Ayata C, Ayata G, Hara H, et al (1997) Mechanisms of reduced striatal NMDA excitotoxicity in type I nitric oxide synthase knock-out mice. *J Neurosci* 17:6908–17
- Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D (2014) Genetics, Biochemistry, and Molecular Bases of Variant Human Phenotypes. In: Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, et al. (eds) *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY
- Bickel H (1987) Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme* 38:14–26
- Brown GC (2010) Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 23:153–165. doi: 10.1016/j.niox.2010.06.001
- Chalmers, RA and Lawson A (1982) Organic acids in man: analytical chemistry, biochemistry, and diagnosis of the organic acidurias. *Arch Dis Child* 58:240
- Chalmers RA, Purkiss P, Watts RW, Lawson AM (1980) Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. *J Inher Metab Dis* 3:27–43
- Cubells JF, Rayport S, Rajendran G, Sulzer D (1994) Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. *J Neurosci* 14:2260–71
- da Rosa MS, Seminotti B, Amaral AU, et al (2014) Disruption of redox homeostasis and histopathological alterations caused by in vivo intrastriatal administration of D-2-hydroxyglutaric acid to young rats. *Neuroscience* 277:281–293. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.011
- Da Silva CG, Bueno ARF, Schuck PF, et al (2004) Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Neurochem Int* 44:45–52. doi: 10.1007/978-3-7091-6081-7_14
- Da Silva CG, Ribeiro CAJ, Leipnitz G, et al (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 - Mol Basis Dis* 1586:81–91. doi: 10.1016/S0925-4439(01)00088-6
- De Keyser J, Mostert JP, Koch MW (2008) Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci* 267:3–16. doi: 10.1016/j.jns.2007.08.044
- Delanty N, Dichter MA (1998) Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand*

- Duran M, Kamerling JP, Bakker HD, et al (1980) L-2-Hydroxyglutaric aciduria: an inborn error of metabolism? *J Inherit Metab Dis* 3:109–12
- 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. doi: 10.1002/mas.21381
- Forstner R, Hoffmann GF, Gassner I, et al (1999) Glutaric aciduria type I: ultrasonographic demonstration of early signs. *Pediatr Radiol* 29:138–43. doi: 10.1007/s002470050558
- Fritz KS, Petersen DR (2013) An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. *Free Radic Biol Med* 59:85–91. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.025
- Gibson KM, Craigen W, Herman GE, Jakobs C (1993a) D-2-hydroxyglutaric aciduria in a newborn with neurological abnormalities: a new neurometabolic disorder? *J Inherit Metab Dis* 16:497–500
- Gibson KM, ten Brink HJ, Schor DS, et al (1993b) 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* 34:277–80. doi: 10.1203/00006450-199309000-00007
- Goodman SI, Norenberg MD, Shikes RH, et al (1977) Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. *J Pediatr* 90:746–50
- Gregersen N, Ingerslev J, Rasmussen K (1977) Low molecular weight organic acids in the urine of the newborn. *Acta Paediatr Scand* 66:85–9
- Halliwell, B., Gutteridge J (2015a) Oxygen: boon yet bane. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc., New York, NY, pp 1–29
- Halliwell, B., Gutteridge J (2015b) Antioxidants from the diet. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc., New York, NY, pp 153–197
- Halliwell, B., Gutteridge J (2015c) Antioxidant defenses synthesized in vivo. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc., New York, NY, pp 77–151
- Halliwell, B., Gutteridge J (2015d) Oxidative stress and redox regulation. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc., New York, NY, pp 199–2083
- Halliwell B (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *PLANT Physiol* 141:312–322. doi: 10.1104/pp.106.077073
- Hamann I, Petroll K, Grimm L, et al (2014) Insulin-like modulation of Akt/FoxO signaling by copper ions is independent of insulin receptor. *Arch Biochem Biophys* 558:42–50. doi: 10.1016/j.abb.2014.06.004
- Hoffmann GF, Gibson KM, Trefz FK, et al (1994) Neurological manifestations of organic acid disorders. *Eur J Pediatr* 153:S94-100
- Hoffmann GF, Meier-Augenstein W, Stöckler S, et al (1993) Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *J Inherit Metab Dis* 16:648–69
- Hoffmann GF, von Kries R, Klose D, et al (2004) Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur J Pediatr* 163:76–80. doi: 10.1007/s00431-003-1246-3
- Hoffmann GF, Zschocke J (1999) Glutaric aciduria type I: from clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy. *J Inherit Metab Dis* 22:381–91

- Irani K (2000) Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 87:179–83
- Junqueira D, Brusque AM, Porciúncula LO, et al (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. doi: 10.1016/j.jns.2003.10.005
- Kölker S, Pawlak V, Ahlemeyer B, et al (2002) NMDA receptor activation and respiratory chain complex V inhibition contribute to neurodegeneration in D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Eur J Neurosci* 16:21–28. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02055.x
- Kranendijk M, Salomons GS, Gibson KM, et al (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 - Mol Basis Dis* 1812:1380–1384. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.08.006
- Kranendijk M, Struys EA, Gibson KM, et al (2010a) Evidence for genetic heterogeneity in D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Hum Mutat* 31:279–283. doi: 10.1002/humu.21186
- Kranendijk M, Struys EA, Salomons GS, et al (2012) Progress in understanding 2-hydroxyglutaric acidurias. *J Inher Metab Dis* 35:571–587. doi: 10.1007/s10545-012-9462-5
- Kranendijk M, Struys EA, van Schaftingen E, et al (2010b) IDH2 Mutations in Patients with D-2-Hydroxyglutaric Aciduria. *Science (80-)* 330:336–336. doi: 10.1126/science.1192632
- Lakshminarayanan V, Drab-Weiss EA, Roebuck KA (1998) H₂O₂ and tumor necrosis factor- α induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- κ B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem* 273:32670–8
- Latini A, Da Silva CG, Ferreira GC, et al (2005) Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab* 86:188–199. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.05.002
- Latini A, Scussiato K, Rosa RB, et al (2003) D-2-hydroxyglutaric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Eur J Neurosci* 17:2017–2022. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02639.x
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346–57
- Mak CM, Lee H-CH, Chan AY-W, Lam C-W (2013) Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Crit Rev Clin Lab Sci* 50:142–62. doi: 10.3109/10408363.2013.847896
- Mayatepek E, Hoffmann GF, Baumgartner R, et al (1996) Atypical vitamin B12-unresponsive methylmalonic aciduria in sibship with severe progressive encephalomyelopathy: a new genetic disease? *Eur J Pediatr* 155:398–403
- McGeer PL, McGeer EG (2008) Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23:474–483. doi: 10.1002/mds.21751
- Misra VK, Struys EA, O'brien W, et al (2005) Phenotypic heterogeneity in the presentation of D-2-hydroxyglutaric aciduria in monozygotic twins. *Mol Genet Metab* 86:200–5. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.06.005
- Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, et al (2004) Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25:663–74. doi:

10.1016/j.neurobiolaging.2004.01.007

- Nicholls DG (2004) Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Curr Mol Med* 4:149–77
- Olivera-Bravo S, Fernández A, Sarlabós MN, et al (2011) Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I. *PLoS One* 6:e20831. doi: 10.1371/journal.pone.0020831
- Orioli M, Aldini G, Beretta G, et al (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* 827:109–18. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.04.025
- Rashed M, Ozand PT, al Aqeel A, Gascon GG (1994) Experience of King Faisal Specialist Hospital and Research Center with Saudi organic acid disorders. *Brain Dev* 16 Suppl:1–6
- 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* 34:237–56. doi: 10.1385/CBB:34:2:237
- Requejo R, Chouchani ET, Hurd TR, et al (2010) Measuring mitochondrial protein thiol redox state. *Methods Enzymol* 474:123–47. doi: 10.1016/S0076-6879(10)74008-8
- Reynolds IJ, Hastings TG (1995) Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci* 15:3318–27
- Rodrigues DGB, de Moura Coelho D, Sitta Â, et al (2017) Experimental evidence of oxidative stress in patients with L-2-hydroxyglutaric aciduria and that L-carnitine attenuates in vitro DNA damage caused by D-2-hydroxyglutaric and L-2-hydroxyglutaric acids. *Toxicol Vitro* 42:47–53. doi: 10.1016/j.tiv.2017.04.006
- Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB (1991) The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 266:11632–9
- Sauer SW, Opp S, Mahringer A, et al (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* 1802:552–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.03.003>
- Saxena G, Bharti S, Kamat PK, et al (2010) Melatonin alleviates memory deficits and neuronal degeneration induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 94:397–403. doi: 10.1016/j.pbb.2009.09.022
- Sofroniew M V, Vinters H V (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7–35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8
- Southorn PA, Powis G (1988) Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 63:381–9
- 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* 121C:53–70. doi: 10.1002/ajmg.c.20008
- Struys EA, Jansen EEW, 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* 50:1391–5. doi: 10.1373/clinchem.2004.033399
- van der Knaap MS, Jakobs C, Hoffmann GF, et al (1999b) D-2-Hydroxyglutaric aciduria:

- biochemical marker or clinical disease entity? *Ann Neurol* 45:111–9
- van der Knaap MS, Jakobs C, Hoffmann GF, et al (1999a) D-2-hydroxyglutaric aciduria: further clinical delineation. *J Inher Metab Dis* 22:404–13
- Vernon HJ (2015) Inborn Errors of Metabolism. *JAMA Pediatr* 169:778. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.0754
- Wall SB, Oh J-Y, Diers AR, Landar A (2012) Oxidative Modification of Proteins: An Emerging Mechanism of Cell Signaling. *Front Physiol* 3:369. doi: 10.3389/fphys.2012.00369
- Webb R, Hughes MG, Thomas AW, Morris K (2017) The Ability of Exercise-Associated Oxidative Stress to Trigger Redox-Sensitive Signalling Responses. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 6:63. doi: 10.3390/antiox6030063
- Wilt SG, Dugger N V, Hitt ND, Hoffman PM (2000) Evidence for oxidative damage in a murine leukemia virus-induced neurodegeneration. *J Neurosci Res* 62:440–50. doi: 10.1002/1097-4547(20001101)62:3<440::AID-JNR14>3.0.CO;2-M
- Yadav UCS, Ramana K V (2013) Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev* 2013:690545. doi: 10.1155/2013/690545