

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

Josyane de Andrade Silveira

**Efeitos tóxicos do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico sobre as  
defesas antioxidantes, metabolismo energético e neurodesenvolvimento em ratos  
neonatos**

Porto Alegre

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Silveira, Josyane De Andrade  
Efeitos tóxicos do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico sobre as defesas antioxidantes, metabolismo energético e neurodesenvolvimento em ratos neonatos / Josyane De Andrade Silveira. -- 2023.  
45 f.  
Orientador: Guilhian Leipnitz.

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, 2023.

1. Deficiência da 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA liase. 2. Bioenergética. 3. Estresse oxidativo. 4. ; Neurodesenvolvimento. 5. Cérebro. I. Leipnitz, Guilhian, orient. II. Título.

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

Josyane de Andrade Silveira

**Efeitos tóxicos do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico sobre as defesas antioxidantes, metabolismo energético e neurodesenvolvimento em 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 mestra em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Guilhian Leipnitz

Porto Alegre

2023

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha querida mãe, Marília, que não está mais entre nós, mas que foi a primeira pessoa a acreditar em mim e lutar por mim, desde a barriga. Obrigada por tanto, mãe. Prometo que vou realizar todos os nossos sonhos. Te amo!

Agradeço ao meu pai, que esteve ao meu lado em todos os momentos, que se preocupou comigo, cuidou e zelou por mim, sem pedir nada em troca além do meu sucesso e felicidade. Te amo, pai! Tu és uma inspiração para mim!

Agradeço à Eduarda, minha companheira de vida, que foi incansável e me motivou todos os dias durante esse período. Obrigada por ter enxugado minhas lágrimas e não ter permitido com que eu desistisse em diversos momentos, tu és um presente na minha vida! Te amo!

Aos meus irmãos, Jacqueline e Jeferson, e ao meu afilhado, Hiago, meu muito obrigada! Vocês me arrancaram sorrisos genuínos nos momentos em que estava cansada e que precisava de um quentinho no coração. Nós para sempre!

À minha família e minha psicóloga, obrigada, obrigada e obrigada! Vocês fazem parte dessa jornada e da pessoa que me tornei hoje.

À minha parceira de laboratório, minha dupla, a Raquel da minha Ruth, Manuela, serei eternamente grata! Iniciamos o mestrado juntas, no mesmo dia, e vamos concluir ele juntas, no mesmo dia... e agora vamos iniciar o doutorado juntas... quem diria?! Obrigada, Manu, por passar por todos esses momentos e situações ao meu lado, se não fosse por ti, talvez não tivesse ido tão longe. Que nossa jornada seja longa e repleta de realizações e que nossa amizade floresça mais a cada dia! Mais uma vez obrigada!

Às minhas amigas e parceiras de laboratório, Jaqueline, Camila e Morgana, muito obrigada, nossos momentos de risadas, fofquinhas, tragédias e comilanças tornaram tudo mais fácil e foram muito importantes para mim! Obrigada pelas ajudas nos experimentos e principalmente à Camila: obrigada por ser tão boa no Excel hahaha. Espero que possamos continuar trilhando um lindo caminho juntas!

Aos ICs do laboratório, Nathália, Chrístopher e Isabela, obrigada por toda ajuda e por toda paciência, mesmo nos dias que eu não sabia explicar muito bem o que precisava ser feito, ou quando eu pedia muitas coisas e mal dava tempo para vocês respirarem! Vocês foram incríveis e tem um papel importante na conclusão desse trabalho.

Aos meus amigos do departamento, Rafael Teixeira, Rafael Palavro, Ângela, Vanessa, Ediana, Andrey, Junior e Alex, vocês tornaram meus dias melhores e tornaram o trabalho menos difícil, então, muito obrigada!

Aos meus amigos, Renan, Narelle, Kariane, Daniela e Lucca, vocês são incríveis! Obrigada por fazerem parte da minha vida e por tornarem ela melhor! Nossos momentos juntos foram o alívio que eu precisava no meio do estresse. Obrigada! Amo vocês!

Ao meu querido orientador e amigo, professor Guilhian Leipnitz: TU É O CARA! Obrigada por ter acreditado em mim e por não desistir de mim. Eu aprendi e continuo aprendendo tanto contigo, e sou tão grata por isso. Obrigada por me reconfortar e por me

manter na linha, tu és um ser humano incrível e de uma inteligência ímpar. Espero que algum dia eu possa ser pelo menos 1% do profissional e da pessoa que tu és! Obrigada por tudo, mais uma vez!

Aos meus dois filhos bicológicos, Luna Maria e José Otávio, obrigada por colorirem meu dia e minha vida, e por estarem ao meu lado em todos os momentos, vocês foram meu suporte em muitos momentos. Amo vocês!

E por último queria agradecer a mim mesma, por não desistir, por seguir lutando e acreditando, mesmo quando as coisas estavam difíceis e tudo parecia impossível, eu não desisti e hoje eu estou aqui e posso dizer que consegui vencer mais essa etapa. E que venha a próxima!

## Sumário

<b>PARTE I</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1. Erros Inatos do Metabolismo</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2. Deficiência da 3-Hidróxi-3-Metilglutaril-CoA Liase</b> .....	<b>12</b>
1.2.1. Diagnóstico e Tratamento.....	14
1.2.2. Fisiopatologia .....	14
<b>1.3. Homeostase Redox</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3. Metabolismo Energético Cerebral</b> .....	<b>16</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>18</b>
<b>3. OBJETIVOS E METAS</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1. Geral</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2. Específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1. Animais</b> .....	<b>19</b>
<b>4.2. Estudos <i>In Vivo</i></b> .....	<b>20</b>
4.2.1. Preparação das amostras para análise <i>in vivo</i> dos parâmetros bioquímicos do metabolismo energético e estresse oxidativo.....	20
<b>4.3. Técnicas Bioquímicas</b> .....	<b>20</b>
4.3.1. Estresse oxidativo .....	20
4.3.2. Metabolismo energético .....	22
<b>4.4. Avaliação do Desenvolvimento Neuromotor</b> .....	<b>23</b>
<b>4.5. Dosagem de Proteínas</b> .....	<b>25</b>
<b>4.6. Análise Estatística</b> .....	<b>25</b>
<b>PARTE II</b> .....	<b>26</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1. O HMG causa dano à homeostase redox em estriado de ratos</b> .....	<b>27</b>
<b>5.2. O HMG causa danos à homeostase redox em córtex cerebral de ratos</b> .....	<b>28</b>
<b>5.3. O HMG causa alterações na bioenergética em estriado de ratos</b> .....	<b>30</b>
<b>5.4. O HMG causa alterações na bioenergética em córtex cerebral de ratos</b> .....	<b>31</b>
<b>5.5. O HMG altera marcadores de neurodesenvolvimento em ratos</b> .....	<b>32</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>41</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>

## **Lista de abreviaturas**

HL – 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA liase  
HMG – 3-hidróxi-3-metilglutárico  
EIM – erros inatos do metabolismo  
HMG-CoA - 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA  
ATP – adenosina trifosfato  
ERO – espécies reativas de oxigênio  
CTE – cadeia transportadora de elétrons  
NADPH - fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina  
CS - citrato sintase  
CAT - catalase  
ERN - espécies reativas de nitrogênio  
G6PDH - glicose-6-fosfato desidrogenase  
GPx - glutaciona peroxidase  
GR - glutaciona redutase  
GSH - glutaciona  
GSSG - persulfeto de glutaciona  
GST - glutaciona S-transferase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio  
icv - intracerebroventricular  
MDH - malato desidrogenase  
NO• - óxido nítrico  
NQO1 - quinona desidrogenase  
O<sub>2</sub> - oxigênio molecular  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - ânion superóxido  
OH• - radical hidroxila  
ONOO<sup>-</sup> - peroxinitrito  
OXPHOS - fosforilação oxidativa  
SOD - superóxido dismutase  
SDH - succinato desidrogenase  
CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

HOCl - ácido hipocloroso

$^1\text{O}_2$  - oxigênio *singlet*

## Resumo

A deficiência da 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA liase (HL), também chamada de acidemia 3-hidróxi-3-metilglutárica, é uma doença neurometabólica que afeta o catabolismo da leucina e a cetogênese. Os pacientes apresentam elevados níveis urinários predominantemente do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG). Os sintomas incluem principalmente achados neurológicos como déficit cognitivo, hipotonia, macrocefalia e convulsões. Esse quadro neurológico piora em situações de descompensação metabólica, quando ocorrem elevações drásticas nas concentrações do HMG. Apesar da gravidade dos achados clínicos na deficiência da HL, podendo levar o paciente até mesmo ao óbito, os mecanismos responsáveis pela neurofisiopatologia não estão totalmente elucidados. Estudos anteriores mostraram que o HMG induz estresse oxidativo e disfunção bioenergética *in vitro* e *in vivo* em cérebro de ratos jovens. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi de investigar os efeitos da administração intracerebroventricular do HMG (1  $\mu\text{mol/g}$ ) sobre parâmetros de estresse oxidativo e bioenergética em córtex cerebral e estriado de ratos neonatos, 6 horas após injeção. Também foram avaliados marcadores de neurodesenvolvimento no dia pós-natal 9. Vimos que o HMG diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase, glicose-6-fosfato desidrogenase e glutathione redutase (GR) no estriado. Já em córtex cerebral, observamos uma diminuição apenas da atividade de GPx e GR, e um aumento na atividade da CAT causados pelo HMG. No entanto, em ambas as estruturas não foram encontradas alterações nos níveis de glutathione reduzida. Já nos parâmetros de metabolismo energético, o HMG diminuiu a atividade enzimática da citrato sintase e da malato desidrogenase, além dos complexos II, II-III e IV da cadeia respiratória em estriado. Ainda vimos que o HMG diminuiu apenas a atividade enzimática da succinato desidrogenase, bem como dos complexos II, II-III e IV da cadeia respiratória em córtex cerebral. Finalmente, observamos que o HMG alterou os testes de geotaxia negativa, reflexo de endireitamento postural, marcha, testes de suspensão dos membros posteriores, aversão à queda e preensão dos membros anteriores. Nossos achados sugerem que o HMG causa estresse oxidativo, disfunção bioenergética e alterações no neurodesenvolvimento que podem explicar a neurofisiopatologia da deficiência da HL.

**Palavras-chaves:** Deficiência da 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA liase; Bioenergética; Estresse oxidativo; Neurodesenvolvimento; Cérebro.

## Abstract

3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL) deficiency, also called 3-hydroxy-3-methylglutaric acidemia, is a neurometabolic disease that affects leucine catabolism and ketogenesis. Patients present with high urinary levels of predominantly 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG). Symptoms include mainly neurological findings such as cognitive impairment, hypotonia, macrocephaly, and seizures. This neurological condition worsens in situations of metabolic decompensation, which is characterized by a dramatic increase in HMG concentrations. Despite the severity of the clinical findings in HL deficiency, which can even lead the patient to death, the mechanisms responsible for the neuropathophysiology are not fully elucidated. Previous studies have shown that HMG induces oxidative stress and bioenergetic dysfunction *in vitro* and *in vivo* in the brain of young rats. Therefore, the objective of the present study was to investigate the effects of intracerebroventricular administration of HMG (1  $\mu\text{mol/g}$ ) on parameters of oxidative stress and bioenergetics in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats. Neurodevelopment parameters were also evaluated. We found that HMG decreased the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase (GR) in the striatum. In the cerebral cortex, we observed a decrease only in GPx and GR activities and an increase in CAT activity caused by HMG. However, in both brain structures, no changes in reduced glutathione levels were found. Regarding energy metabolism parameters, HMG decreased the enzymatic activity of citrate synthase and malate dehydrogenase, in addition to the complexes II, II-III and IV of the respiratory chain in the striatum. We also observed that HMG decreased the enzymatic activity of succinate dehydrogenase, as well as of the complexes II, II-III and IV of the respiratory chain in the cerebral cortex. Finally, we observed that HMG altered negative geotaxis, righting, gait, hindlimb suspension, cliff avoidance, and forelimb grasping. Our findings suggest that HMG causes oxidative stress, bioenergetic dysfunction, and neurodevelopmental changes that may explain the neurophysiology of HL deficiency.

**Keywords:** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency; Bioenergetics; Oxidative stress; Neurodevelopment; Brain.

# **PARTE I**

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Erros Inatos do Metabolismo**

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são um grupo de distúrbios genética e fenotipicamente heterogêneos causados por defeitos de proteínas, geralmente uma enzima, em vias metabólicas específicas. O bloqueio dessas vias leva ao acúmulo de intermediários potencialmente tóxicos e à depleção de produtos endógenos nos tecidos e líquidos biológicos do paciente (Mak et al., 2013; Vernon, 2015).

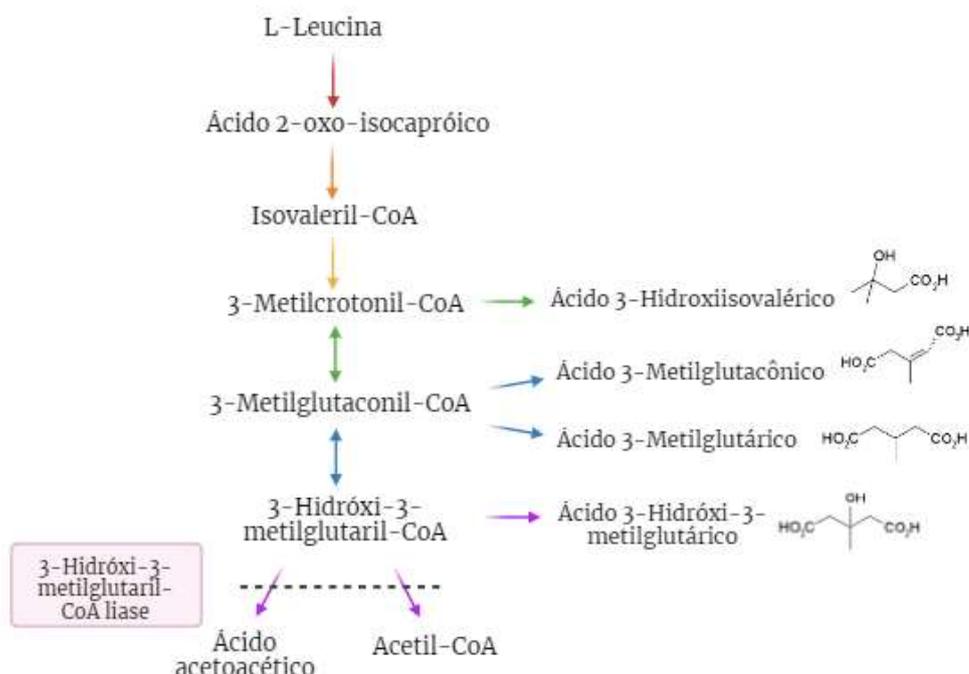
Em 1909, Sir Archibald Edward Garrod cunhou e citou pela primeira vez o termo EIM. Ele foi o primeiro a desenvolver o conceito de “individualidade química” e relacionar os efeitos da endogamia a diferentes fenótipos de doenças hereditárias. Com base nas leis de Mendel e em seus estudos sobre a patogênese da alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para essas doenças. Ele descreveu a alcaptonúria como um distúrbio genético raro caracterizado por um defeito metabólico recessivo no catabolismo da tirosina. Como resultado, as pessoas com alcaptonúria acumulam grandes quantidades de ácido homogentísico em seus tecidos e líquidos corporais (Arnold, 2018; Mak et al., 2013). Desde então, os estudos sobre os EIM tiveram avanços importantes, atualmente sendo identificados mais de 1.000 EIM na literatura (Ferreira et al., 2019). Eles podem ser causados por diferentes distúrbios bioquímicos, tais como defeitos no ciclo da ureia, defeitos na oxidação de ácidos graxos, acidemias orgânicas e doenças mitocondriais. A maioria deles envolve processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018). Embora individualmente raras, em conjunto essas doenças afetam aproximadamente 1 a cada 500-1000 recém-nascidos vivos (Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018).

Os sintomas podem resultar do acúmulo de substratos potencialmente tóxicos, deficiência do produto ou ambos. O início da doença pode ocorrer no período neonatal ou adulto, geralmente dependendo da atividade residual da enzima defeituosa (Ezgu, 2016). No entanto, a maioria dos sintomas dos EIM já é observada nos recém-nascidos. Os neonatos geralmente são saudáveis ao nascer, mas acabam desenvolvendo os sintomas em dias ou horas depois do nascimento. Os sintomas apresentados são inespecíficos e podem ser: desnutrição, dificuldade respiratória, letargia ou convulsões. Essas condições podem ser facilmente confundidas com sepse, doença cardiopulmonar, dentre outras. Portanto, é difícil diagnosticar EIM com base apenas nos sintomas (El-Hattab, 2015). Muitas dessas doenças podem ser diagnosticadas com testes bioquímicos e determinação

de metabólitos na urina. Além disso, a triagem neonatal oferece uma oportunidade para detectar EIM durante o estágio assintomático e melhorar o prognóstico da doença. A espectrometria de massa é de grande importância no diagnóstico dessas doenças, pois permite a rápida detecção e quantificação de vários metabólitos (Vernon, 2015). Em termos de terapia, muitos EIMs são passíveis de intervenções dietéticas visando a remoção de substâncias tóxicas acumuladas e respondem à suplementação deficiente de metabólitos para prevenir o estresse metabólico (Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018).

## 1.2. Deficiência da 3-Hidróxi-3-Metilglutaril-CoA Liase

A deficiência da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA liase (HL; EC 4.1.3.4), ou acidemia 3-hidróxi-3-metilglutárica, é um EIM de herança autossômica recessiva descrita pela primeira vez por Faull e colaboradores (1976). A HL catalisa a clivagem do 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) a acetoacetato e acetil-CoA, que consiste no último passo da cetogênese e do catabolismo da leucina (Figura 1). A deficiência da HL tem alta prevalência na Arábia Saudita e Península Ibérica (Portugal e Espanha), e é uma das acidemias orgânicas mais frequentes no Brasil (Menao et al., 2009; Santarelli et al., 2013; Grünert et al., 2020; Wajner et al., 2009).



**Figura 1** – Rota do catabolismo da L-Leucina com bloqueio ao nível da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA liase. Figura adaptada de Vockley et al. (2013).

O principal metabólito acumulado na deficiência da HL é o ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG), derivado da hidrólise do HMG-CoA. Na urina de pacientes controlados, as concentrações de HMG variam entre 200 e 4.000 mmol / mol de creatinina (concentrações em indivíduos normais nos primeiros meses de vida: 50-90 mmol / mol de creatinina). Contudo, durante crises de descompensação metabólica, esse metabólito pode alcançar concentrações urinárias de 1.500-19.000 mmol / mol de creatinina. Com a reversibilidade da reação catalisada pela enzima 3-metilglutaconil-CoA hidratase, o ácido 3-metilglutacônico também se encontra acumulado nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes. Além disso, o ácido 3-metilglutacônico pode ser hidrogenado a ácido 3-metilglutárico. Também devido à reversibilidade da enzima 3-metilcrotonil-CoA carboxilase, altas concentrações de 3-metilcrotonil-CoA são encontradas e este metabólito pode ainda ser hidratado, gerando ácido 3-hidroxiisovalérico (Figura 1). Além disso, durante as crises de descompensação metabólica, são detectadas altas concentrações dos ácidos glutárico e adípico. Outros metabólitos importantes encontrados acumulados no sangue e na urina dos pacientes são as acilcarnitinas (Vockley et al., 2013).

Os sintomas se manifestam geralmente no período neonatal (Vockley et al., 2013). Em um estudo realizado em 2017 com 37 pacientes portadores da deficiência da HL, foi visto que 92 % dos pacientes apresentaram sintomas devido à descompensação metabólica a partir do primeiro ano de vida, onde 50 % deles apresentou episódios convulsivos e vômitos recorrentes e 38 % apresentaram hepatomegalia (Grünert et al., 2017). Durante episódios agudos de descompensação metabólica (jejum prolongado ou situações hipercatabólicas), os pacientes apresentam acidose metabólica com hipoglicemia hipocetótica, hiperlactacidemia, vômitos, apneia, hipotonia e letargia que podem progredir ao coma (Pospisilova et al., 2003; Santarelli et al., 2013; Vockley et al., 2013). Outras manifestações clínico-laboratoriais frequentes incluem hepatomegalia com elevação dos níveis de amônia e de transaminases no plasma, além de cardiomiopatia (Leung et al., 2009; Reimao et al., 2009; Vockley et al., 2013). Enfatize-se aqui que a deficiência da HL é fatal em aproximadamente 20 % dos casos. Os achados de ressonância magnética evidenciam lesões na substância branca cerebral que, em alguns casos, podem ser reversíveis com o tratamento baseado na restrição alimentar de leucina (Reimao et al., 2009; Yalcinkaya et al., 1999; Yylmaz et al., 2006; Zafeiriou et al., 2007).

Além disso, foi verificado o envolvimento dos núcleos caudado, denteado, globo pálido, bem como do trato corticospinal (Yalcinkaya et al., 1999; Yilmaz et al., 2006).

#### 1.2.1. Diagnóstico e Tratamento

A deficiência da HL deve ser investigada em pacientes que apresentam hipoglicemia hipocetótica e acidose metabólica sem causa bem definida. A doença é geralmente detectada através do aumento dos metabólitos acumulados nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes (especialmente na urina) medidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. A determinação da atividade da HL é importante para a confirmação, podendo ser medida espectrofotometricamente em leucócitos, fibroblastos e plaquetas. A análise molecular da mutação envolvida também pode ser realizada para a confirmação do diagnóstico (Vockley et al., 2013).

Com relação ao tratamento, os pacientes devem evitar situações de jejum e ingestão excessiva de gordura. Além disso, a administração de glicose deve ser feita em vigência de episódios de hipoglicemia que geralmente ocorrem durante as crises (Douillard et al., 2012). A restrição de leucina, além de diminuição da ingestão de gordura e a administração de L-carnitina auxiliam no desenvolvimento dos pacientes (Vockley et al., 2013).

#### 1.2.2. Fisiopatologia

Apesar de a deficiência da HL ser caracterizada por sintomas neurológicos graves, a patogênese dessa doença ainda não está estabelecida. Acredita-se que a hipoglicemia causada pela inibição da gliconeogênese por HMG-CoA e pelo elevado consumo de glicose devido à falta de corpos cetônicos circulantes possa estar implicada nas alterações neurológicas características da doença (Douillard et al., 2012). A hipoglicemia associada à diminuição na síntese de corpos cetônicos faz com que o cérebro fique sem substratos energéticos. Além disso, já foi demonstrado que a hipoglicemia pode causar a inibição da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, causando depleção de ATP, bem como induzir a geração de espécies reativas através da ativação de receptores glutamatérgicos por aumento no influxo de cálcio (Singh et al., 2004; Suh et al., 2007). Também tem sido sugerido que os metabólitos acumulados nos pacientes afetados por essa doença sejam tóxicos, contribuindo para os sintomas apresentados (Vockley et al., 2013), embora os mecanismos pelos quais esses ácidos orgânicos possam levar aos sintomas ainda não tenham sido totalmente elucidados. Nesse contexto, demonstramos previamente que os metabólitos acumulados, incluindo o HMG, induzem dano oxidativo lipídico e proteico e diminuem as defesas antioxidantes não enzimáticas *in vitro* e *in vivo* em cérebro de ratos

(Fernandes et al., 2013; Leipnitz et al., 2008a; Leipnitz et al., 2008b). Além disso, foi mostrado que o HMG ainda causa danos à dinâmica mitocondrial e à comunicação entre retículo endoplasmático e mitocôndria em cérebro de ratos (da Rosa et al., 2019).

### 1.3. Homeostase Redox

Diferentes definições podem ser vistas na literatura para “radicais livres”, entretanto, a mais simples e melhor aceita é a de que um radical livre é qualquer espécie capaz de uma existência independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, que o elétron ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular (Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2015).

Já as espécies reativas de oxigênio (ERO) compreendem um grupo de moléculas, tanto radicais livres quanto não radicais, que derivam do O<sub>2</sub>, abrangendo espécies iniciais formadas pela sua redução (O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e produtos reativos secundários (Turrens, 2003; Winterbourn, 2008; Lambert e Brand, 2009; Pisoschi e Pop, 2015). A redução do O<sub>2</sub> por um elétron resulta na formação de superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). A principal fonte desse radical é a respiração mitocondrial, devido ao vazamento de elétrons de centros redox da cadeia transportadora de elétrons (CTE). Além disso, o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> também pode ser gerado por enzimas como NADPH oxidases, oxigenases dependentes de citocromo P450, ciclooxigenases e xantina oxidases, bem como pela redução direta do O<sub>2</sub> por coenzimas e xenobióticos reduzidos, por exemplo.

A formação desse radical pode mediar reações oxidativas em cadeia. O O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pode sofrer dismutação e gerar peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o qual também pode ser formado diretamente a partir da transferência de dois elétrons para o O<sub>2</sub> por urato oxidases, glicose oxidases e D-aminoácido oxidases. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode reagir com metais de transição reduzidos e levar à formação do radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) (Turrens, 2003; Pisoschi e Pop, 2015) ou ser convertido por peroxidases e resultar na formação de ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio *singlet* (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) e outras espécies (Winterbourn, 2008; Brieger et al., 2012).

O O<sub>2</sub><sup>•-</sup> também pode reagir com o óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) e gerar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Essas últimas moléculas consistem nas chamadas espécies reativas de nitrogênio (ERN). As ERNs são derivadas de NO<sup>•</sup>, gerado a partir de L-arginina pela óxido nítrico sintase ou através da redução de nitrato inorgânico (Turrens, 2003; Winterbourn, 2008; Pisoschi e Pop, 2015).

As espécies reativas são continuamente produzidas pelo organismo como resultado do metabolismo celular normal. Em níveis baixos e regulados, desempenham funções fisiológicas essenciais, estando envolvidas tanto na sinalização celular (proliferação, diferenciação, crescimento, sobrevivência, apoptose etc.) como em processos biossintéticos (produção de hormônio tireoidiano, por exemplo). Além disso, também são importantes na defesa do hospedeiro contra microrganismos. No entanto, em altas concentrações podem causar dano oxidativo e nitrosativo a biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídeos (Turrens, 2003; Winterbourn, 2008; Lambert e Brand, 2009; Birben et al., 2012; Brieger et al., 2012; Atashi, Modarressi e Pepper, 2015).

Considerando os efeitos nocivos das espécies reativas, fazem-se necessários mecanismos de defesas conhecidos como defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, que podem tanto ser produzidos pelo organismo como obtidos do ambiente através da dieta. As defesas antioxidantes incluem: agentes que removem cataliticamente as espécies reativas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx); agentes que controlam a formação de espécies reativas, que incluem proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes como as transferrinas que controlam os níveis de íons de ferro, e as heme oxigenases que controlam os níveis do grupo heme; agentes que preferencialmente reagem com espécies reativas e, assim, impedem que elas causem dano a outras importantes biomoléculas, como a glutathione reduzida (GSH),  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, albumina, entre outros; além de outros compostos e proteínas que protegem biomoléculas de sofrerem danos através de outros mecanismos (Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2015). Certas condições patológicas podem levar ao desequilíbrio entre produção e remoção de espécies reativas, seja pelo aumento da produção ou pela diminuição da capacidade antioxidante, causando o chamado estresse oxidativo e podendo acarretar dano em diferentes biomoléculas, como DNA, lipídios e proteínas, e ainda causar morte celular por apoptose (Turrens, 2003; Lambert e Brand, 2009; Ray, Huang e Tsuji, 2012; Pisoschi e Pop, 2015).

### **1.3. Metabolismo Energético Cerebral**

A principal função fisiológica da mitocôndria é a geração de ATP a partir da fosforilação oxidativa, porém funções adicionais, tais como geração e desintoxicação de ERO, regulação dos níveis de cálcio e síntese e catabolismo de metabólitos, têm sido

descritas (Brand and Nicholls 2011). O chamado potencial de membrana mitocondrial é essencial para o funcionamento dessa organela, uma vez que controla a taxa de respiração mitocondrial, a síntese de ATP e a geração de ERO (Nicholls e Budd 2000). Na respiração mitocondrial, três complexos que realizam a transferência de elétrons, os complexos I, III e IV, bombeiam prótons através da membrana interna mitocondrial para o espaço intermembrana. O potencial redox dos elétrons que passam por esses complexos é utilizado para gerar o gradiente eletroquímico de prótons (força próton motriz) que forma o potencial de membrana. A ATP sintase é a via de retorno dos prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial, o que possibilita a síntese de ATP por essa enzima (Brand e Nicholls 2011; Nicholls 2004; Nicholls e Budd 2000).

A glicose é a principal fonte de energia para o cérebro e a regulação do seu metabolismo é crítica para o funcionamento cerebral, principalmente para a síntese de neurotransmissores e manutenção do gradiente de íons (MERGENTHALER et al., 2013). Também já foi visto que o metabolismo de glicose está envolvido na modulação do estresse oxidativo e que as enzimas do seu metabolismo participam diretamente da sinalização celular. Sendo assim, além de ser importante fonte de ATP e fornecer carbono para a síntese de macromoléculas, a glicose também modula diversas funções nos neurônios e nas células gliais (Zhang et al., 2021). Além da glicose proveniente da circulação sanguínea, o glicogênio astrocitário também parece ser um importante combustível no cérebro, pois já foi visto que a sua quantidade está diretamente relacionada com o aprendizado (Suzuki et al., 2011). Também deve ser destacado o lactato, que parece ser o principal combustível energético dos neurônios e desempenha um papel essencial na formação da memória de longo prazo (Suzuki et al., 2011).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A deficiência da HL é caracterizada predominantemente por sintomas neurológicos, cuja fisiopatologia não está bem estabelecida. Neste contexto, muito pouco foi estudado sobre os efeitos tóxicos exercidos pelo HMG, metabólito acumulado na doença, sobre sistemas que são essenciais (metabolismo energético e produção de espécies reativas) para o funcionamento normal do sistema nervoso central. Ainda, deve ser enfatizado que o córtex cerebral e gânglios da base são estruturas comumente afetadas nos pacientes, o que torna relevante o estudo da vulnerabilidade dessas diferentes áreas cerebrais aos efeitos do HMG.

Portanto, acreditamos que a elucidação dos mecanismos tóxicos do HMG pode contribuir para uma melhor compreensão do dano cerebral bem como dos achados clínico-laboratoriais observados na deficiência da HL, com possíveis repercussões terapêuticas que possam melhorar o prognóstico da doença.

### **3. OBJETIVOS E METAS**

#### **3.1. Geral**

Considerando que a fisiopatologia do dano neurológico encontrado na deficiência da HL não está totalmente elucidada, o presente trabalho investigou os efeitos *in vivo* da administração de HMG sobre parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético em córtex cerebral e estriado de ratos neonatos 6 h após a injeção. Também foram estudados os efeitos do HMG sobre parâmetros de neurodesenvolvimento no dia pós-natal 9.

#### **3.2. Específicos**

Investigar os efeitos da injeção intracerebroventricular (icv) de HMG em córtex cerebral e estriado de ratos neonatos sobre:

- Estresse oxidativo: atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glutatona S-transferase (GST) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), além das concentrações de glutatona reduzida (GSH);

- Metabolismo energético: atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico (citrate sintase-CS, malato desidrogenase-MDH, e succinato desidrogenase-SDH), e dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial I, II-III e IV.

Investigar os efeitos da injeção icv de HMG sobre:

- Desenvolvimento neuromotor, motricidade e cognição.

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar de 7 dias de vida machos criados e mantidos em padrão sanitário convencional controlado no biotério do CREAL – UFRGS com fotoperíodo de 12 h claro/escuro (07:00 / 19:00h) e temperatura controlada (21 °C). Os animais foram mantidos em gaiolas com dimensões 41 x 34 x 17,8 cm (máximo 10 neonatos/caixa) devidamente identificadas de acordo com a Resolução Normativa CONCEA Nº 15, de 2013, em cama de maravalha de pinus selecionada e autoclavada e alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Nuvilab CR-1®-Nuvital) e água *ad libitum*. A troca da maravalha dos ratos foi realizada pelos funcionários do Biotério do Departamento de Bioquímica duas vezes por semana (segundas e quintas-feiras). O consumo de água e ração foi verificado diariamente, onde foi feita a manutenção das

mamadeiras e comedouro três vezes por semana. Os animais foram mantidos na presença da mãe até sua eutanásia.

## **4.2. Estudos *In Vivo***

Os estudos bioquímicos serão realizados após a administração intracerebroventricular (icv) do HMG (dose de 1  $\mu\text{mol/g}$ , 0,25  $\mu\text{L/g}$ ) em ratos neonatos. Injeções com PBS nos mesmos volumes também foram feitas no grupo controle (Olivera et al., 2008). A injeção foi feita de forma manual no quarto ventrículo dos animais (Olivera et al, 2008). Os ratos foram eutanasiados por decapitação 6 h após a injeção para avaliação de parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético. O protocolo foi aprovado pelo CEUA com o projeto de número 33376.

### **4.2.1. Preparação das amostras para análise *in vivo* dos parâmetros bioquímicos do metabolismo energético e estresse oxidativo**

#### *Preparação de sobrenadantes*

Os animais foram mortos por decapitação com guilhotina sem anestesia, tendo o cérebro removido e o córtex cerebral e estriado dissecados. Os tecidos foram homogeneizados em tampão SETH (sacarose 250 mM, EDTA 2 mM e Trizma base 10 mM), pH 7,4, para avaliação de parâmetros de metabolismo energético, ou em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo KCl 140 mM, no caso da avaliação de parâmetros de estresse oxidativo. Os homogeneizados obtidos foram centrifugados a 750 xg durante 10 min a 4 °C e os sobrenadantes obtidos utilizados para a realização das técnicas.

## **4.3. Técnicas Bioquímicas**

### **4.3.1. Estresse oxidativo**

#### *Defesas antioxidantes não enzimáticas*

#### *Concentrações de glutathiona reduzida (GSH)*

As concentrações de GSH foram determinadas através do método descrito por Browne e Armstrong (1998). As amostras foram diluídas em 10 volumes de tampão fosfato de sódio, pH 8,0, contendo EDTA 5 mM. Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  dessa preparação 100  $\mu\text{L}$  de o-ftaldialdeído (1 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> preparado em metanol) e a mistura foi incubada durante 15 min à temperatura ambiente e posteriormente lida em espectrofluorímetro a 350 nm (excitação) e 420 nm (emissão). As concentrações de GSH

foram calculadas a partir de uma curva padrão de GSH (0,001-1 mM) como nmol . mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### *Defesas antioxidantes enzimáticas*

*Superóxido dismutase (SOD)*: A atividade da SOD foi determinada de acordo com Marklund (MARKLUND, 1985). Esta análise se baseia na capacidade do pirogalol de se auto-oxidar, um processo altamente dependente de superóxido, que é o substrato da SOD. Desta forma, a auto-oxidação do pirogalol é inibida pela SOD, cuja atividade pode ser medida indiretamente em um espectrofotômetro em 420 nm. O meio de reação continha 50 mM de tampão TRIS / 1 mM EDTA, pH 8,2, 80 U/mL de CAT, 0,38 mM de pirogalol e aproximadamente 1 µg de proteína. A calibração da curva foi realizada com SOD purificada como padrão para calcular a atividade da SOD nas amostras. A atividade da SOD foi calculada como U . mg de proteína<sup>-1</sup>.

*Catalase (CAT)*: Foi determinada através do método de Aebi (1984). Em 100 µL do sobrenadante serão adicionados 10 µl de Triton 0,1 % seguido de agitação, esta mistura será conservada em gelo durante 15 min. Em 50 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, foram adicionados 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (v/v). Foram pipetados 600 µL deste meio e 25 µL de amostra em cubeta e foi realizada a leitura da queda da absorvância do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em espectrofotômetro a 240 nm, à temperatura ambiente (22 °C ± 2), durante 100 s. Para o cálculo da CAT se utilizará o coeficiente de extinção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 43,6 mM<sup>-1</sup> . cm<sup>-1</sup>. Os resultados da atividade da CAT foram expressos em U . mg proteína<sup>-1</sup>.

*Glutathione peroxidase (GPx)*: A atividade da GPx foi avaliada de acordo com Wendel (1981), usando hidroperóxido de tert-butila como substrato e monitorando a oxidação do NADPH a 25 °C a 340 nm. O meio de reação continha sobrenadantes de tecido (aproximadamente 75 µg de proteína), tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, com EDTA 1 mM, azida de sódio 0,4 mM, GSH 2 mM, GR 0,1 U/mL, NADPH 0,1 mM e hidroperóxido de tert-butila 0,5 mM. A queda da absorvância a 340 nm foi acompanhada durante 240 s e a atividade da GPx foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção do NADPH a 340 nm de 6,2 mM<sup>-1</sup> . cm<sup>-1</sup>. A atividade da GPx foi calculada como U . mg de proteína<sup>-1</sup>.

*Glutathione reductase (GR)*: A atividade da glutathione reductase (GR) foi determinada pelo monitoramento da queda de NADPH usando glutathione oxidada (GSSG) e NADPH como substratos (Carlberg e Mannervik, 1985). A fluorescência foi lida a 340 nm em um meio com tampão de fosfato de sódio 200 mM, pH 7,5, contendo

6,3 mM EDTA, 1mM GSSG, 0,1mM NADPH e 30  $\mu$ L de sobrenadantes (0,03-0,05 mg de proteína). A atividade foi calculada com U . mg de proteína<sup>-1</sup>.

*Glutathione S-transferase (GST)*: O ensaio de atividade da glutathione S-transferase (GST) é baseado na conjugação de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) a GSH catalisada por GST formando um produto que é monitorado em um espectrofotômetro a 340 nm (Habig et al. 1974). O meio da reação continha tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 6,5, 50 mM CDNB, 25 mM GSH e 30  $\mu$ L de sobrenadantes (0,08–0,14 mg de proteína). A atividade foi calculada com U . mg de proteína<sup>-1</sup>.

*Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)*: A atividade da G6PDH foi avaliada segundo Leong e Clark (1984), observando a formação de NADPH em um espectrofotômetro a 340 nm. O meio de reação continha 100 mM de tampão Tris-HCl, pH 7,5, 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM de NADP<sup>+</sup>, 0,1 mM de glicose- 6-fosfato e 15  $\mu$ L de sobrenadante (0,04–0,06 mg de proteína). A atividade foi calculada com U . mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### 4.3.2. Metabolismo energético

##### *Atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico*

As atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico (CAC) foram determinadas usando homogeneizado total das amostras. A atividade da citrato sintase foi medida de acordo com Shepherd e Garland (1969) através da redução do DTNB a  $\lambda=412$  nm. A atividade da succinato desidrogenase (SDH) foi determinada como descrito por Fischer e colaboradores (1985) através da redução do DCPIP. A atividade da malato desidrogenase (MDH) foi medida de acordo com Kitto (1969) seguindo a redução do NADH com comprimento de onda de excitação e emissão em 340 e 466 nm, respectivamente. As atividades das enzimas do CAC foram calculadas como nmol . min<sup>-1</sup> . mg proteína<sup>-1</sup>, mmol . min<sup>-1</sup> . mg proteína<sup>-1</sup> ou  $\mu$ mol . min<sup>-1</sup> . mg proteína<sup>-1</sup>.

##### *Determinação das atividades dos complexos da cadeia respiratória*

As atividades das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (complexos I, II-III e IV) foram medidas em sobrenadantes com concentração de proteína variando de 1,5 a 4,0 mg proteína/mL. A atividade da NADH:citocromo *c* oxidoreductase (complexos I) foi avaliada como descrito por Schapira et al. (1990). As atividades da succinato: DCIP-

oxidoreductase (complexo II) e da succinato:citocromo *c* oxidoreductase (complexo II-III) foram determinadas de acordo com o método de Fischer et al. (1985), e da citocromo *c* oxidase (complexo IV) de acordo com Rustin et al. (1994). Os métodos descritos para avaliar estas atividades foram modificadas, como previamente descrito por da Silva et al. (2002). As atividades dos complexos da cadeia respiratória foram calculadas como nmol/min/mg proteína.

#### **4.4. Avaliação do Desenvolvimento Neuromotor**

O teste do neurodesenvolvimento foi realizado no dia pós-natal 9 (DPN9) por meio de geotaxia negativa, reflexo de endireitamento, marcha, aversão à queda, suspensão dos membros posteriores e teste de preensão dos membros anteriores. Cada reflexo foi avaliado em triplicata entre 15:00 e 17:00h por um avaliador “cego” para o experimento. O tempo (latência) para realizar a tarefa para cada animal foi registrado e a latência máxima foi atribuída quando a tarefa não foi concluída.

##### *Geotaxia negativa*

O objetivo deste teste é o de avaliar as funções vestibulares e sensório-motoras em filhotes. Os ratos foram colocados em uma prancha inclinada a 30° com a cabeça para baixo e então o tempo médio (latência) para girar 180° e colocar a face para cima foi observado (Ruhela et al., 2019). O período máximo para este teste foi de 30 segundos.

##### *Reflexo de endireitamento postural*

Este teste de reflexo avalia a função motora e de coordenação. Cada filhote foi mantido firmemente em decúbito dorsal, com as quatro patas na posição vertical, e o tempo necessário para alcançar a posição prona com todas as quatro patas no chão foi registrada (Durán-Carabali et al., 2018). O período máximo para filhotes atingirem esse objetivo foi de 30 segundos.

##### *Marcha*

O teste de marcha permite a avaliação da função locomotora em roedores. Os filhotes foram colocados no centro de um círculo de 15 cm de diâmetro, e a latência para os animais deixarem o círculo com os dois membros anteriores foi registrado (Nguyen et al., 2017). O tempo máximo permitido para os filhotes saírem do círculo é de 30 segundos.

##### *Aversão à queda*

Este teste avalia o desenvolvimento de respostas protetoras. Os filhotes foram cuidadosamente colocados com as patas dianteiras e focinho na borda de uma plataforma

plana de acrílico (30 cm de altura). O resultado esperado é uma resposta protetora de aversão à queda, onde o filhote de rato se afasta da beira da plataforma. Os seguintes valores de pontuação foram atribuídos para a resposta do teste: 0 para queda da borda da plataforma ou inércia, 1 para fazer um esforço para sair da borda da plataforma, mas mantendo os membros pendurados para baixo, 2 para movimentos efetivos que permitiram ao filhote afastar-se da borda da plataforma (Nguyen et al., 2017).

#### *Suspensão dos membros posteriores*

Este teste avalia a função neuromuscular monitorando a posição do membro posterior e da cauda dos ratos neonatos durante os primeiros 15 segundos da tarefa. O teste foi realizado como descrito anteriormente por El-Khodor e colegas (El-Khodor et al., 2008), com pequenas modificações. Usando um béquer de 50 mL, os filhotes foram cuidadosamente colocados virados para baixo no béquer com as patas traseiras penduradas na borda do béquer, onde a postura dos membros posteriores e a cauda foi observada. A postura adotada foi pontuada de acordo com os seguintes critérios: uma pontuação de 0 indica uma falha dos membros posteriores do filhote em segurar no béquer ou um abaixamento contínuo da cauda e aperto dos membros posteriores; uma pontuação de 1 mostra fraqueza inerente e praticamente aperto constante dos membros posteriores com a cauda para cima; uma pontuação de 2 significa que ambos os membros posteriores estão muito próximos para e frequentemente tocam um ao outro; em uma pontuação de 3, os membros posteriores estão próximos um do outro, mas raramente se tocam; a pontuação de 4 representa a separação adequada dos membros posteriores com uma cauda estendida.

#### *Teste de preensão de membros anteriores*

O teste de preensão de membros anteriores está relacionado aos reflexos espinhais e inibição corticoespinal de áreas motoras não primárias. O teste envolve em pressionar levemente uma haste na palma de cada pata dianteira do filhote, observando o reflexo de preensão do animal, conforme descrito anteriormente por Nguyen et al. (2017). De acordo com a resposta reflexa do filhote, os seguintes valores de pontuação serão atribuídos: 0 para não agarrar; 1 por agarrar com apenas uma pata; e 2 para agarrar com ambas as patas.

#### **4.5. Dosagem de Proteínas**

A determinação da concentração de proteínas foi feita através do método de Lowry e colaboradores (1951), usando como padrão a albumina sérica bovina.

#### **4.6. Análise Estatística**

Os dados foram analisados por teste  $t$  de Student para amostras não pareadas quando os dados apresentaram uma distribuição normal. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste de Mann-Whitney ou de Wilcoxon. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada através do programa SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## **PARTE II**

## 6. DISCUSSÃO

A deficiência da HL é um EIM que afeta a cetogênese e o catabolismo da leucina e é caracterizada bioquimicamente por altas concentrações de ácidos orgânicos, predominantemente o HMG, nos líquidos biológicos dos pacientes. É uma acidemia orgânica de alta prevalência na Espanha, Portugal, Marrocos e Brasil. A mutação mais frequentemente observada no gene *HMGCL*, que codifica a HL, nesses países é a variante c.109G>T (mutação sem sentido) (Grunert e Sass, 2021). Enfatize-se aqui que durante crises de descompensação metabólica, geralmente iniciadas por períodos de infecção ou vacinação, os níveis do HMG aumentam acentuadamente e os sintomas têm piora significativa, muitas vezes levando o paciente ao óbito. O quadro clínico inclui principalmente sintomas neurológicos, como déficit cognitivo, hipotonia e convulsões, e anormalidades cerebrais com foco no córtex cerebral e gânglios da base (Grunert e Sass, 2021). Outros tecidos, como o fígado e coração, também são afetados, porém em menor número de pacientes (Leipnitz et al., 2015). O tratamento é baseado na restrição de leucina ou proteínas na dieta acompanhada de suplementação com carnitina, porém não é eficaz para todos os pacientes (Grunert e Sass, 2021).

Apesar de já ter sido demonstrado que o HMG induz estresse oxidativo e disfunção energética (Leipnitz et al., 2015), os achados sobre efeitos desse metabólito em cérebro de ratos neonatos ainda são escassos. Portanto, avaliamos neste trabalho os efeitos *ex vivo* do HMG sobre parâmetros de estresse oxidativo e bioenergética no cérebro de ratos Wistar neonatos. Também investigamos o desenvolvimento neuromotor, motricidade e cognição a fim de verificar se o metabólito poderia causar alterações no neurodesenvolvimento.

Decidimos avaliar os parâmetros bioquímicos em córtex cerebral e estriado, pois representam estruturas cerebrais comumente afetadas nos pacientes afetados pela deficiência da HL. Mais especificamente, um estudo recente mostrou que em torno de 20 % dos pacientes apresentam atrofia cortical e cerca de 45 % têm anormalidades nos gânglios basais. Ainda cabe destacar que outros achados neurológicos, como convulsões e hipotonia são observadas em 30 a 40% dos pacientes. Dessa forma, é importante avaliar possíveis efeitos diferenciais induzidos pelo HMG nas estruturas cerebrais mencionadas acima (Grunert et al., 2017).

Verificamos inicialmente que o HMG alterou as atividades de diferentes enzimas antioxidantes em estriado e córtex cerebral de ratos. O HMG diminuiu as atividades da GPx e da GR tanto em estriado quanto em córtex cerebral. Também diminuiu a atividade da SOD, CAT, GST e G6PDH apenas em estriado enquanto em córtex cerebral a atividade das mesmas não foi alterada, exceto pela CAT, que apresentou aumento. Visto que a SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, a diminuição da atividade dessa enzima em ambas as estruturas cerebrais sugere um aumento dos níveis de ânion superóxido no cérebro dos ratos neonatos (Halliwell e Gutteridge, 2000). Referente à diminuição da atividade GPx nas duas estruturas cerebrais e à diminuição da CAT em estriado, deve ser considerado que ambas as enzimas degradam o peróxido de hidrogênio ao passo que a GPx também é capaz de degradar peróxidos de lipídios (Halliwell e Gutteridge, 2000). Portanto, nossos achados sugerem que o HMG aumenta os níveis de peróxido de hidrogênio e de produtos de peroxidação lipídica, sendo este um processo geralmente desencadeado pelo ataque de radicais livres a ácidos graxos poliinsaturados (Halliwell e Gutteridge, 2000). Em nosso trabalho, não estudamos os mecanismos responsáveis pela diminuição dessas atividades enzimáticas, porém hipotetizamos que espécies reativas geradas a partir da ação do HMG podem estar atacando oxidativamente os resíduos de aminoácidos da estrutura dessas enzimas, causando a sua inibição (Halliwell e Gutteridge, 2015). Por outro lado, vimos que o HMG aumentou a atividade da CAT apenas em córtex cerebral de ratos. Este resultado foi inesperado, porém pode ser especulado que a expressão gênica dessa enzima tenha sido aumentada nessa região cerebral como um mecanismo compensatório a fim de neutralizar o excesso de espécies reativas. Uma das vias de sinalização possivelmente ativadas nesse caso é a do fator Nrf2 (fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2), uma vez que esse fator, quando translocado para o núcleo, ativa a expressão gênica de mais de uma centena de enzimas, incluindo enzimas antioxidantes (Seminotti et al. 2021). No entanto, não conseguimos explicar, a partir de nossos dados, porque apenas a CAT no córtex teve um aumento após exposição ao HMG e o mesmo efeito não foi observado em estriado. Pode ser sugerido que os níveis do HMG que tenham alcançado o estriado a partir da injeção icv aplicada em nosso modelo sejam diferentes das alcançadas em córtex cerebral.

Outro efeito inesperado encontrado é que o HMG não modificou as concentrações da GSH em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas. Isso porque as atividades de diferentes enzimas relacionadas com o metabolismo da GSH (GPx, GST, GR e G6PDH)

foram inibidas pelo HMG. Dessa forma, podemos sugerir que a síntese de GSH está aumentada, o que representaria uma adaptação celular a fim de neutralizar o excesso de espécies reativas. Neste sentido, é possível que a enzima glutamato cisteinil ligase, que é a enzima limitante da síntese de GSH, esteja com sua expressão gênica aumentada (Zou et al., 2016).

No próximo passo de nossa investigação, avaliamos os efeitos do HMG sobre as atividades de algumas enzimas do ciclo do ácido cítrico e de complexos da cadeia respiratória mitocondrial. O HMG diminuiu a atividade da CS em estriado e a atividade da SDH em córtex cerebral. A inibição da CS, além de indicar que o HMG causa um comprometimento energético, também sugere uma diminuição da massa mitocondrial, uma vez que estudos têm demonstrado que a atividade dessa enzima é proporcional ao número de mitocôndrias (Grings et al. 2017). Já a diminuição da atividade da SDH em córtex indica uma disfunção bioenergética a nível do complexo II da cadeia respiratória, uma vez que esta enzima faz parte desse complexo da cadeia respiratória (Nelson e Cox, 2022). Em concordância com isso, vimos que o HMG diminuiu as atividades dos complexos II e II-III em córtex cerebral. Já no estriado, o HMG também diminuiu as atividades dos complexos II e II-III, indicando que há uma falha energética a nível de cadeia respiratória também nessa região cerebral. Além disso, a administração do HMG inibiu a atividade do complexo IV tanto em estriado quanto em córtex cerebral. Neste particular, o complexo IV tem sido relatado como sendo o principal ponto de regulação da cadeia respiratória mitocondrial (Moura et al., 2015), indicando que o HMG possivelmente prejudica a síntese de ATP.

Em um estudo anterior de nosso grupo foi visto que a injeção icv de HMG, na dose de 0,5  $\mu\text{mol/g}$ , diminuiu a atividade da GPx e da CS em córtex cerebral de ratos de 1 dia de vida, corroborando nossos dados aqui demonstrados. É interessante considerar ainda que no estudo anterior foi observado que o HMG diminuiu o conteúdo de sinaptofisina e apresentou uma forte tendência em aumentar o conteúdo de caspase-3 clivada, o que mais uma vez sugere a toxicidade elevada deste ácido orgânico (da Rosa et al., 2019).

A avaliação de marcadores do desenvolvimento neuromotor e cognitivo é de suma importância para aferir o impacto de um dano perinatal em modelos animais experimentais (Horvath et al., 2015), podendo representar uma ferramenta essencial para rastrear o desenvolvimento dos animais injetados com o HMG. Optamos por aplicar a

injeção do HMG na idade de 7 dias de vida, pois esta idade representa bebês nascidos a termo (Semple, et al., 2013). Nessa idade, achados mostram que a maturação cerebral do rato é similar à de um recém-nascido humano a termo, uma vez que é verificado um maior ganho de massa encefálica no rato, o que ocorre em humanos logo após o nascimento (Semple, et al., 2013; Dobbing e Sands, 1979). Além disso, entre 7 e 10 dias de vida no rato, ocorre um pico na gliogênese, aumento na densidade axonal e dendrítica, e uma consolidação do sistema imune (Semple, et al., 2013). Esses processos ocorrem em bebês no período final da gestação até logo após o nascimento (Semple, et al., 2013). Assim, determinamos os efeitos do HMG sobre diferentes testes de neurodesenvolvimento no DPN9. Os testes utilizados para estudar o desenvolvimento neuromotor dos ratos foram o endireitamento, teste de aversão à borda e geotaxia negativa. Nossos dados mostram que os animais que receberam a injeção de HMG apresentaram uma resposta sensorio-motora deficiente, evidenciada por uma menor latência na realização de geotaxia negativa e endireitamento, e uma pontuação diminuída no teste de aversão à borda. Também avaliamos se a administração de HMG poderia causar distúrbios no desenvolvimento neuromotor associados à locomoção (teste de marcha) e força do tônus muscular (suspensão dos membros posteriores). A injeção do HMG provocou uma diminuição acentuada da capacidade de marcha e da força muscular nos animais, o que está de acordo com as manifestações clínicas de alterações motoras observadas em pacientes com a deficiência da HL, onde se destaca a hipotonia, sendo um dos achados mais prevalentes nos estágios iniciais da doença (Grünert et al., 2017).

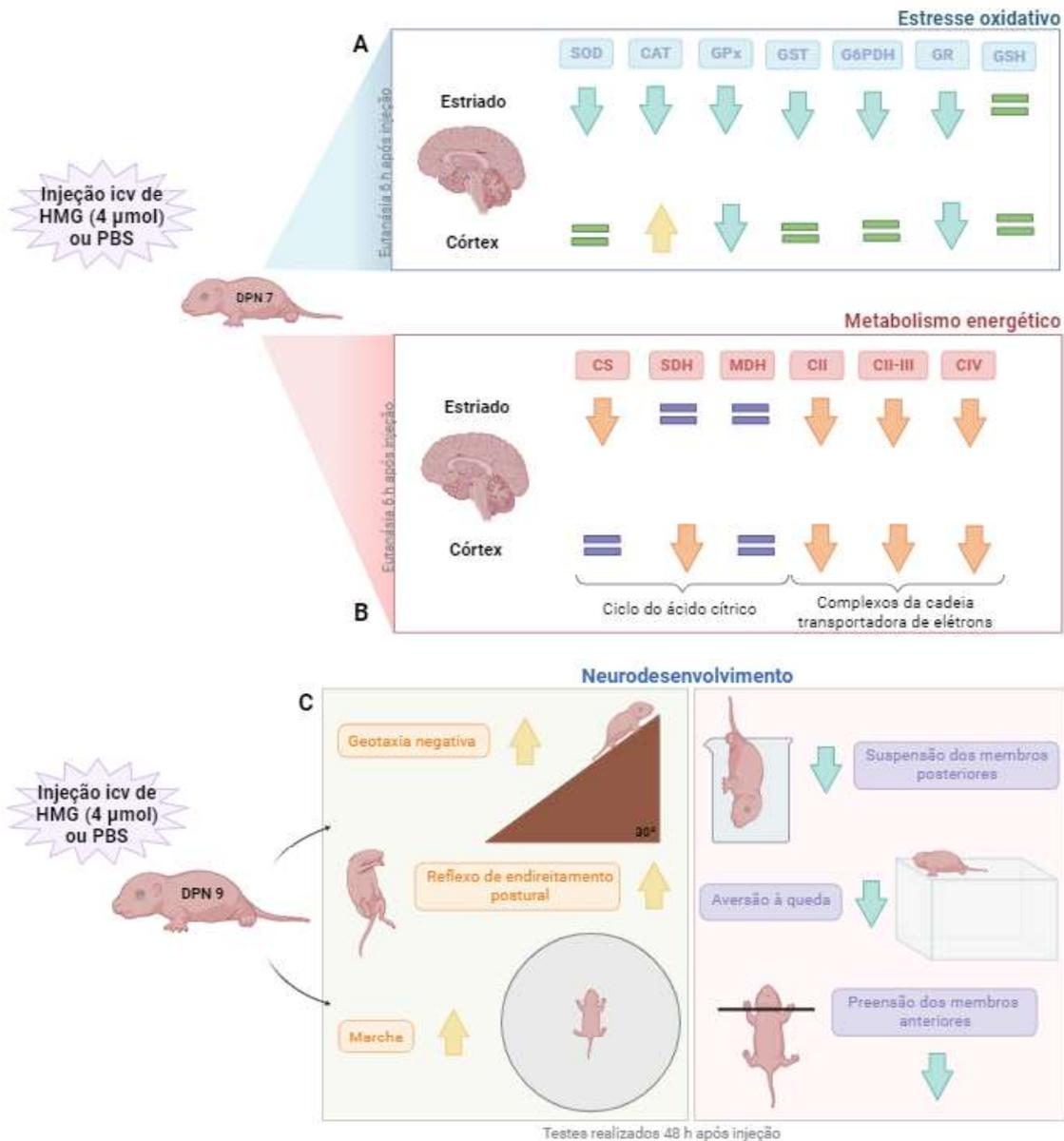
Estudos anteriores mostraram que a administração de outros compostos potencialmente tóxicos durante o início da vida ou no período gestacional também tiveram um impacto importante durante o neurodesenvolvimento de roedores. Em um primeiro estudo, foi visto que filhotes de fêmeas que receberam por via oral os compostos piretróides bifentrina e  $\beta$ -ciflutrina durante o período gestacional e a lactação tinham o neurodesenvolvimento e comportamento alterados do DPN3 a 12 (Syed et al., 2016). Em outro trabalho, foi relatado que a administração icv do ácido L-2-hidroxiglutárico, metabólito acumulado na acidemia L-2-hidroxiglutárica, em ratos de 1 dia de vida, causou um comprometimento no neurodesenvolvimento no DPN7 (Ribeiro et al., 2022). Esses achados mostram que a exposição a compostos tóxicos durante o período neonatal induz alterações acentuadas no neurodesenvolvimento a longo prazo.

É difícil estabelecer a relevância fisiopatológica dos nossos resultados, uma vez que não há trabalhos descrevendo as concentrações do HMG no plasma e tecidos de indivíduos afetados pela deficiência da HL. No entanto, deve-se notar que um estudo mostrou que a injeção intraperitoneal de HMG (10  $\mu\text{mol/g}$  de peso corporal) levou a concentrações em torno de 20  $\mu\text{M}$  no estriado de ratos jovens, indicando que este ácido atravessa a barreira hematoencefálica. Por outro lado, a concentração de 20  $\mu\text{M}$  pode ser considerada baixa quando comparada às observadas para ácidos orgânicos acumulados em outras acidemias orgânicas. Essas observações sugerem que o HMG, mesmo quando em baixas concentração, induz efeitos tóxicos graves. Portanto, pode-se presumir que os mecanismos patológicos provocados pelo HMG aqui demonstrados contribuem para a fisiopatologia da deficiência da HL.

A partir de nossos dados não podemos estabelecer os mecanismos exatos pelos quais o HMG causa danos à homeostase redox, bioenergética e neurodesenvolvimento em ratos neonatos. No entanto, um trabalho anterior de nosso grupo mostrou que o antagonista glutamatérgico MK-801 preveniu o estresse oxidativo causado pelo HMG em cérebro de ratos jovens, sugerindo que este ácido pode ativar os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, causando excitotoxicidade (Fernandes et al., 2013). Em concordância com isso, a estrutura química do HMG é similar à do glutamato, o agonista natural desses receptores. Além disso, dados da literatura já evidenciaram que a inibição de complexos da cadeia respiratória leva ao vazamento de elétrons podendo, conseqüentemente, aumentar a produção de EROs, tais como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge, 2015). Dessa forma, é possível que a inibição dos complexos da cadeia respiratória pelo HMG, conforme mostrado nesse estudo, esteja levando à geração dessas espécies. A inibição de complexos da cadeia respiratória mitocondrial e de outras enzimas fundamentais para o metabolismo energético células já foi previamente verificada para outros ácidos orgânicos acumulados em diferentes EIMs (Roginski et al., 2020; de Moura Alvorcem et al., 2022).

Concluindo, relatamos pela primeira vez que o HMG, principal metabólito acumulado na deficiência da HL, induz estresse oxidativo e disfunção bioenergética em tecidos cerebrais em ratos neonatos (Figura 11). Também verificamos que o HMG prejudicou o neurodesenvolvimento em ratos neonatos (Figura 11). No caso de esses achados serem confirmados em células ou tecidos de pacientes, é possível que o uso de

agentes antioxidantes possa ser uma terapia adjuvante promissora para melhorar o prognóstico dos pacientes.



**Figura 11.** (A) A administração intracerebroventricular (icv) do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG; 1  $\mu\text{mol/g}$ ) altera as atividades de enzimas antioxidantes em estriado e córtex cerebral de ratos neonatos; (B) O HMG ainda diminuiu as atividades de enzimas do ciclo do ácido cítrico e dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial; (C) O HMG também modificou parâmetros de neurodesenvolvimento. CII: complexo II; CII-III: complexo II-III; CIV: Complexo IV; CAT: catalase; CS: citrato sintase; G6PDH: glicose-

6-fosfato desidrogenase; GPx: glutaciona peroxidase; GR: glutaciona redutase; GSH: glutaciona reduzida; GST: glutaciona-s-transferase; MDH: malato desidrogenase; SDH: succinato desidrogenase.

## **7. PERSPECTIVAS**

- Avaliar os efeitos da administração icv de HMG sobre os níveis de RNAm e conteúdo proteico das enzimas antioxidantes em córtex cerebral e estriado de ratos neonatos.

- Avaliar os efeitos da administração icv de HMG sobre os níveis de RNAm e conteúdo proteico do fator Nrf2, o qual modula a expressão gênica de enzimas antioxidantes, em córtex cerebral e estriado de ratos neonatos.

- Avaliar os efeitos da administração icv de HMG sobre os níveis de RNAm e conteúdo de proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial em córtex cerebral e estriado de ratos neonatos.

- Avaliar os efeitos da administração icv de HMG sobre os níveis de RNAm e conteúdo de proteínas envolvidas na apoptose e dano celular em córtex cerebral e estriado de ratos neonatos.

- Avaliar os efeitos de antioxidantes, como a N-acetilcisteína, melatonina e o JP4-039 (antioxidante sintético direcionado para a mitocôndria), sobre os efeitos tóxicos do HMG em córtex cerebral e estriado de ratos neonatos, bem como sobre as alterações de neurodesenvolvimento.

## 8. REFERÊNCIAS

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* v. 105, p. 121–126, 1984.
- Arnold, G. L. Inborn errors of metabolism in the 21st century: past to present. *Annals of Translational Medicine*, v. 6, n. 24, p. 467–467, 2018.
- Atashi, F; Modarressi, A; Pepper, MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells and Development*, v. 24, n. 10, p. 1150-1163, 2015.
- Birben, E; Sahiner, UM; Sackesen, C; Erzurum, S; Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
- Brand, M. D.; Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, v. 435, Pt 2, p. 297, 2011.
- Brieger, K; Schiavone, S; Miller, JR, FJ.; Krause, KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly*, v. 142, p. w13659, 2012.
- Carlberg, I., Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* v. 113, 484–90, 1985.
- de Moura Alvorcem, L. et al. Ethylmalonic acid impairs bioenergetics by disturbing succinate and glutamate oxidation and induces mitochondrial permeability transition pore opening in rat cerebellum. *Journal of Neurochemistry* v. 158, p. 262-281, 2021.
- Dobbing, J., e Sands, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early human Development* v. 3,1, p. 79-83, 1979.
- El-Hattab, A. W. Inborn Errors of Metabolism. *Clin. Perinatol.* v. 42, p. 413–439, 2015.
- Ezgu, F. Inborn Errors of Metabolism, in *Adv. Clin. Chem.* v. 73, p. 195-250, 2016.
- Ferreira, C. R., Karnebeek C. D. M. van, Vockley J., Blau N. A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genet. Med.* v. 21, 102–106, 2019.
- Fernandes, C. G. et al. In vivo experimental evidence that the major metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency induce oxidative stress in striatum of developing rats: a potential pathophysiological mechanism of striatal damage in this disorder. *Molecular Genetics and Metabolism* v. 109,2, p. 144-53, 2013.
- Ferreira, C. R. et al. A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genetics in Medicine*, v. 21, n. 1, p. 102–106, 2019.
- Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* v. 153, p. 23–36, 1985.

Grings, M.; Moura, A.P.; Parmeggiani, B.; Marcowich, G.F.; Amaral, A.U.; Wyse, A.T.S.; Wajner, M.; Leipnitz, G. Disturbance of brain energy and redox homeostasis provoked by sulfite and thiosulfate: potential pathomechanisms involved in the neuropathology of sulfite oxidase deficiency. *Gene*, v. 531, n. 2, p. 191-198, 2013.

Grings, M; Moura, AP; Parmeggiani, B; Motta, MM; Boldrini, RM; August, PM; Matté, C; Wyse, ATS; Wajner, M; Leipnitz, G. Higher susceptibility of cerebral cortex and striatum to sulfite neurotoxicity in sulfite oxidase-deficient rats. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*, v. 1862, n. 11, p. 2063-2074, 2016.

Grings, M.; Moura, A.P.; Parmeggiani, B.; Pletsch, J.T.; Cardoso, G.M.F.; August, P.M.; Matté, C.; Wyse, A.T.S.; Wajner, M.; Leipnitz, G. Bezafibrate prevents mitochondrial dysfunction, fibroblasts system disturbance, glial reactivity and neuronal damage induced by sulfite administration in striatum of rats: implications for a possible therapeutic strategy for sulfite oxidase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*, v. 1863, n. 9, p. 2135-2148, 2017.

Grings, M; Seminotti, B; Karunanidhi, A; Ghaloul-Gonzalez, L; Mohsen, AW; Wife, P; Palmfeldt, J; Vockley, J; Leipnitz, G. ETHE1 and MOCS1 deficiencies: disruption of mitochondrial bioenergetics, dynamics, redox homeostasis and endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk in patient fibroblasts. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 12651, 2019.

Grünert, S. C. e Jörn, O.S. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: one disease - many faces. *Orphanet Journal of Rare Diseases* vol. 15,1 p. 48. 14, 2020.

Halliwell, B. Antioxidants: The Basics-what they are and how to evaluate them. *Adv. Pharmacol.* v. 38, p. 3–20, 1996.

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

Halliwell, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75, 637, 2013.

Halliwell, B., Gutteridge J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 2015.

Kitto G.B. Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart. pp 106–116, 1969.

Leipnitz, G.; Vargas, C. R.; Wajner, M. Disturbance of redox homeostasis as a contributing underlying pathomechanism of brain and liver alterations in 3-hydroxy-3-

methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 38, n. 6, p. 1021–1028, 2015.

Leong S.F., Clark J.B. Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem J* v. 218, p. 131–138, 1984.

Lowry O. H., Rosebrough N. J, Randall R. J., Lewis, A. Protein measurement with folin phenol reagent. *Biol. Chemistry* v. 193, p. 265–275, 1951.

Mak C. M., Lee H. C. H., Chan A. Y. W., Lam C. W. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: Review and update. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* v. 50, p. 142–162, 2013.

Marklund, S. L. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. *FEBS Letters*, v. 184, n. 2, p. 237–239, 1985.

Mergenthaler, P. et al. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in Neurosciences*, v. 36, n. 10, p. 587, 2013.

Nelson, D.L.; Cox, MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 8. ed. W. H. Freeman, 2022.

Nicholls, D. G. Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* v. 3, p. 35–40, 2004.

Nicholls, D. G., Budd S. L. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* v. 80, p. 315–360, 2000.

Olivera, S. et al. *Neurobiology of Disease*, v. 32, n. 3, p. 528–534, 2008.

Popsilova, E. et al. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 26, p. 433–441, 2003.

Pisoschi, A. M.; Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, p. 55–74, 5 2015.

Raymond, K., Flores, Pires R., Souza, C. F. M. de, Giugliani R., Vargas C. R. Selective screening for organic acidemias by urine organic acid GC-MS analysis in Brazil: Fifteen-year experience. *Clin. Chim. Acta* v. 400, p. 77–81, 2009.

Roginski, A. C. et al. Disturbance of bioenergetics and calcium homeostasis provoked by metabolites accumulating in propionic acidemia in heart mitochondria of developing rats. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* v. 1866, 5, p. 165682, 2020.

Rustin, P. et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica Chimica Acta*, v. 228, n. 1, p. 35–51, 1994.

Santarelli, F. et al. A neonatal case of 3-hydroxy-3-methylglutaric-coenzyme A lyase deficiency. *Italian Journal of Pediatrics*, v. 39, n. 1, p. 33, 2013.

Saudubray, J. M.; Garcia-Cazorla, À. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatric Clinics of North America*, 2018.

Semple, B. D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology* v. 106-107, p. 1-16, 2013.

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

Suh, S. W.; Hamby, A. M.; Swanson, R. A. *Glia*, v. 55, n. 12, p. 1280–1286, 2007.

Vockley, J. et al. *Branched Chain Organic Acidurias*. Em: Valle, D. L. et al. (Eds.). *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2013.

Suzuki, A. et al. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 810–823, 2011.

Syed, F.; John, P. J.; Soni, I. Neurodevelopmental consequences of gestational and lactational exposure to pyrethroids in rats. *Environmental Toxicology*, v. 31, n. 12, p. 1761–1770, 2016.

Vargas, C. R. et al. Incidence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase (HL) deficiency in Brazil, South America. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 31, Suppl 3, p. 511–515, 2008.

Vockley, J. et al. *Branched Chain Organic Acidurias*. Em: VALLE, D. L. et al. (Eds.). *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2019.

Wajner M., Coelho D. de M., Ingrassia R., Oliveira A. B. de, Busanello E. N. B., *Clin Chim Acta* v. 400, n. 1-2, p. 77-81, 2009.

Yalçinkaya, C. et al. MRI and MRS in HMG-CoA lyase deficiency. *Pediatric Neurology*, v. 20, n. 5, p. 375–380, 1999.

Yılmaz, Y. et al. Corticospinal tract involvement in a patient with 3-HMG coenzyme A lyase deficiency. *Pediatric Neurology*, v. 35, n. 2, p. 139–141, 2006.

Wendel, A. Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, v. 77, p. 325–333, 1981.

Vernon, H. J. Inborn errors of metabolism: Advances in diagnosis and therapy. *JAMA Pediatrics*, v. 169, n. 8, p. 778–82, 2015.

Zafeiriou, D. I. et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a lyase deficiency with reversible white matter changes after treatment. *Pediatric Neurology*, v. 37, n. 1, p. 47–50, 2007.

Zou, Y., Wang, J., Peng, J., Wei, H. Oregano Essential Oil Induces SOD1 and GSH Expression through Nrf2 Activation and Alleviates Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in IPEC-J2 Cells. *Oxid Med Cell Longev*. v. 2016, p. 5987183, 2016.

Zhang, S., Lachance, B. B., Mattson M. P., Jia X. Glucose metabolic crosstalk and regulation in brain function and diseases. *Prog. Neurobiol*. v. 204, p. 102089, 2021.