

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA COM L-CARNITINA EM
MODELO ANIMAL E EM PACIENTES PORTADORES DE ACIDEMIA
GLUTÁRICA DO TIPO I**

TESE DE DOUTORADO

GILIAN BATISTA BALBUENO GUERREIRO

PORTO ALEGRE, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA COM L-CARNITINA EM
MODELO ANIMAL E EM PACIENTES PORTADORES DE ACIDEMIA
GLUTÁRICA DO TIPO I**

**Tese de doutorado apresentado por Gilian Batista
Balbueno Guerreiro para obtenção do grau de doutor
em Ciências Farmacêuticas**

Orientador(a): Prof.^a. Dr.^a Carmen Regla Vargas

Co-orientador(a): Prof. Dr. Moacir Wajner

PORTO ALEGRE, 2019

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25 de março de 2019, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araújo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Renata Padilha Guedes
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Guerreiro, Gilian Batista Balbuena
INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA COM L-CARNITINA
EM MODELO ANIMAL E EM PACIENTES PORTADORES DE ACIDEMIA
GLUTÁRICA DO TIPO I / Gilian Batista Balbuena
Guerreiro. -- 2019.

160 f.

Orientador: Carmen Regla Vargas.

Coorientador: Moacir Wajner.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Acidemia Glutárica Tipo I. 2. Estresse Oxidativo. 3. L-carnitina. 4. Inflamação. 5. Erros inatos do metabolismo. I. Vargas, Carmen Regla, orient. II. Wajner, Moacir, coorient. III. Título.

“No que diz respeito ao empenho,
ao compromisso, ao esforço e à
dedicação, não existe meio termo.
Ou você faz uma coisa bem feita
ou não faz”.

(Ayrton Senna da Silva)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Farmácia e ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, juntamente com seus colaboradores e professores, responsáveis por fornecer todo o suporte para o desenvolvimento desta tese.

À professora Carmen Regla Vargas, pela orientação, inspiração e carinho ao longo destes 8 anos, desde minha iniciação científica até o momento. Certamente minha formação profissional passa diretamente pelos seus valiosos ensinamentos.

Ao professor Moacir Wajner pelos seus conselhos e ajuda.

Aos colegas de laboratório Bruna, Desi, Jéssica, Tati, Carlos, Grazi, Marion, Alana, Camila, Maira, Tati Hauschild, Maira. Muito obrigado pela oportunidade de compartilhar conhecimento, pela ajuda em todos os momentos e, principalmente, pela amizade.

Aos que já passaram pelo grupo de pesquisa Carlos Wayhs (Mano), Carol Mescka, Daiane, Ana Carolina e Aline que muito me ensinaram e colaboraram com meu trabalho.

À Angela e à Daniella, pela incansável ajuda.

À minha (grande) família, que sempre esteve junto, depositando as melhores energias.

Ao meu irmão Giovan, meu melhor amigo e companheiro de estrada. Mais uma vitória nossa. À minha pequena irmã Sophia, que há pouco tempo veio iluminar nossas vidas.

Aos meus pais, Gilvan e Solange, por me proporcionar os meios pelos quais eu fui capaz de chegar até aqui. Com sacrifício e luta me proporcionaram as melhores oportunidades para ter uma carreira de excelência. Espero todos os dias retribuir esse amor.

Ao amor da minha vida, minha esposa e companheira Laura, que há 9 anos compartilha dos mesmos sonhos, deixa minha vida mais leve e me ajuda a superar os pequenos obstáculos que surgem. Como sempre digo, que bom que te encontrei.

Finalmente, à base da minha família, os pilares mais fortes e responsáveis por me fazer conhecer desde pequeno o que é o amor, respeito e caráter. Aos meus avós Anadir e Gelci, meu mais sincero obrigado.

À Deus pela vida, pelas oportunidades e por ter colocados todos esses em meu caminho.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia (LAB. 503) e no laboratório 38 do Departamento de Bioquímica da UFRGS, em colaboração com o Serviço de Genética Médica do HCPA, Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e a Unidade de Experimentação Animal do HCPA, os quais disponibilizaram os recursos técnicos e de infraestrutura necessários para a realização do mesmo. Este trabalho foi financiado com auxílio da FAPERGS, CNPq e da FIPE/HCPA. Agradecemos aos pacientes e seus familiares, assim como o corpo clínico do SGM/HCPA

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	123
RESUMO.....	145
ABSTRACT	157

PARTE I

1.INTRODUÇÃO	21
2. ESTADO DA ARTE.....	23
2.1 Erros Inatos do Metabolismo (EIM).....	23
2.2 Acidemias Orgânicas	255
2.3 Acidemia Glutárica tipo I (AG1).....	266
2.3.1 Achados neuropatológicos, clínicos e sintomatologia	277
2.3.2 Diagnóstico	299
2.3.3 Tratamento.....	299
2.3.4 Mecanismos de dano cerebral	30
2.4 Modelo Animal de AG1	31
2.5 L-carnitina (L-car).....	31
2.6 Estresse Oxidativo	33
2.6.1 Espécies reativas do oxigênio e radicais livres	33
2.6.2 Defesas enzimáticas e não-enzimáticas	34
2.6.3 Antioxidantes	355
2.6.4 Estresse oxidativo e doenças neurológicas	366
2.7 Inflamação.....	377
3. OBJETIVOS	399
3.1. OBJETIVO GERAL.....	399

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	399
3.2.1. Capítulo 1	39
3.2.2. Capítulo 2	399
3.2.3. Capítulo 3.....	40

PARTE II

4. RESULTADOS	41
4.1 CAPÍTULO 1: Oxidative damage in glutaric aciduria type I patients and the protective effects of L-carnitine treatment	43
4.2 CAPÍTULO 2: L-carnitine prevents oxidative stress in striatum of glutaryl-coa dehydrogenase deficient mice submitted to lysine overload	577
4.3 CAPÍTULO 3: Resultados preliminares da quantificação de marcadores plasmáticos de neurodegeneração em pacientes com acidemia glutárica tipo I tratados com L-carnitina.....	95

PARTE III

5. DISCUSSÃO	117
6. CONCLUSÕES	13333
7. REFERÊNCIAS.....	137
8. ANEXOS	149
8.1. Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	149
8.2. Anexo 2: Parecer Comitê de Ética em Pesquisa	158
8.3. Anexo 3: Parecer Comitê de Ética em Pesquisa em Uso de Animais.....	159
8.4. Anexo 4: Comprovante de submissão artigo para o periódico BBA – Molecular Basis of Disease.....	160

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$: oxigênio *singlet*

3HG: ácido 3-hidroxi-glutárico

3HMG: acidemia 3-hidroxi-3-metil-glutárica

8-OH-dG: *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*

AG1: Acidemia glutárica tipo I

AG: ácido glutárico

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE: barreira hematoencefálica

C5DC: glutarilcarnitina

CG/MS: Cromatografia gasosa – espectroscopia de massas

DCFH: 2-7-Dihidrodiclorofluoresceína

Di-tyr: Di-tirosina

DXB: doença da urina do xarope do bordo

EIM: Erros inatos do metabolismo

ERN: espécies reativas do nitrogênio

ERO: espécies reativas do oxigênio

GCDH: Glutaril-CoA desidrogenase

Gcdh^{-/-}: Camundongo nocaute deficiente de GCHD

GM-CSF: Fator estimulador de colônias macrófagos-granulócitos

GSH: Glutathione

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

ID: índice de dano

IFN- γ : *Interferon gamma*

IL-10: Interleucina 10

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

L-2HG: acidemia L-2-hidroxi-glutárica

LC/MS/MS: Cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massas em tandem

L-car: L-carnitina

MDA: malondialdeído;

MMA: acidemia metilmalônica

NCAM: molécula de adesão neuronal

NFκB: factor de transcrição kappa

NO: óxido nítrico

O₂⁻: radical superóxido

O₂: oxigênio molecular

OH: radical hidroxila

ONOO⁻: peroxinitrito

PDGF-AA: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PKU: fenilcetonúria

PPA: acidemia propiônica

TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF-α: Fator de necrose tumoral α

WT: camundongo selvagem

RESUMO

A acidemia glutárica tipo 1 (AG1) é uma doença hereditária do metabolismo dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano, causada por uma deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase, levando a um bloqueio nesta rota metabólica e ocasionando um acúmulo de ácidos glutárico (AG), 3-hidroxi-glutárico e de seus conjugados com glicina e carnitina, especialmente a glutarilcarnitina (C5DC). O prognóstico dessa doença depende do diagnóstico precoce e instituição de um tratamento baseado suplementação L-carnitina (L-car). Vários estudos têm demonstrado o potencial antioxidante e anti-inflamatório da L-car em diversos erros inatos do metabolismo (EIM), inclusive em algumas acidemias orgânicas. Apesar disso, na AG1 esses efeitos ainda não foram avaliados. Assim, é importante que seja investigado o papel do estresse oxidativo e o perfil inflamatório na AG1 nos pacientes afetados e em modelo animal da doença, bem como estudar se o atual tratamento com L-car (100 mg/kg/dia) é capaz de proteger o organismo dos danos associados ao estresse oxidativo. Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo geral avaliar o dano oxidativo e os efeitos da L-car em pacientes portadores de AG1 e em modelo animal da doença, utilizando camundongos nocautes *Gcdh*^{-/-}, avaliar o perfil inflamatório nos pacientes e, também, avaliar o efeito *in vitro* da L-car sobre o dano ao DNA induzido pelo ácido glutárico. No primeiro capítulo, foi observado um aumento significativo de AG e C5DC nos pacientes portadores de AG1, que também se mostraram deficientes em carnitina antes da suplementação. Isoprostanos (dano a lipídios), di-tirosina (dano a proteína), espécies urinárias de guaninas oxidadas (dano ao DNA) e, por último, níveis de espécies reativas do nitrogênio se mostraram significativamente aumentadas nos pacientes com a doença. Esses pacientes também apresentaram uma capacidade antioxidante reduzida. A suplementação com L-car induziu efeitos benéficos nesses processos reduzindo os níveis dos biomarcadores aumentados, bem como melhorando a capacidade antioxidante desses pacientes. O AG foi capaz de induzir o dano ao DNA *in vitro* em três diferentes concentrações. Testada também em três concentrações, a L-car foi capaz de prevenir *in vitro* esse dano, de maneira dose-dependente. Foi observado, também, um aumento nas citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, GM-CSF e TNF- α nos pacientes. Evidenciando seu papel antioxidante, a L-car foi correlacionada negativamente com os níveis de

isoprostanos e positivamente com a capacidade antioxidante. No segundo capítulo, foi verificado em camundongos *Gcdh*^{-/-} uma deficiência em carnitina, elevadas concentrações de C5DC e um aumento na produção de espécies reativas do oxigênio. Ainda, foi encontrado um aumento nos biomarcadores de lipoperoxidação e dano à proteínas no estriado cerebral, além de uma alteração nas enzimas antioxidantes SOD e GPx, em relação aos animais selvagens. Da mesma forma que nos pacientes, foi verificado um efeito benéfico da L-car frente a todas essas alterações em estriado cerebral neste modelo animal. Neste capítulo, DCFH (2-7-Dihidrodiclorofluoresceína) foi positivamente correlacionada com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e negativamente com conteúdo de sulfidrilas e carnitina livre. Esta última, quantificada no sangue, foi negativamente correlacionada com C5DC. No terceiro e último capítulo desta tese, foram quantificados níveis plasmáticos de marcadores de neurodegeneração em pacientes AG1. Verificou-se que níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e catepsina-D estavam significativamente aumentadas em pacientes afetados pela AG1 e tratados com L-car em relação ao grupo controle. Verificou-se, também que os níveis de C5DC estavam significativamente aumentados nos pacientes. Finalmente, a catepsina-D foi positivamente correlacionada com níveis de C5DC. Desta forma, a L-car demonstrou ser útil no tratamento da AG1, não apenas por corrigir a deficiência secundária e induzir a excreção dos metabólitos tóxicos acumulados, mas também por prevenir o dano oxidativo, tanto a nível periférico em pacientes quanto a nível central em camundongos *Gcdh*^{-/-}.

Palavras –chave: Acidemia Glutárica Tipo I; Glutaril-CoA desidrogenase; Estresse Oxidativo; Inflamação; L-carnitina

ABSTRACT

Glutaric acidemia type I (GA1) is an inherited metabolic disease caused by a deficiency of the enzyme glutaryl-CoA dehydrogenase, involved in the catabolism of the amino acids lysine, hydroxylysine and tryptophan. The result is an accumulation of glutaric acid (GA), 3-hydroxyglutaric acid and its conjugated with glycine and carnitine, especially, glutarilcarnitine (C5DC). The prognosis of GA1 depends of the early diagnosis and the institution of a treatment with L-carnitine (L-car) supplementation. Several studies have demonstrated an important antioxidant and anti-inflammatory effects of L-car in some inborn errors of metabolism (IEM), including some organic acidurias. Besides that, these effects did not been evaluated in GA1. Thus, it is important to investigate the role of oxidative stress and the inflammatory profile in GA1 affected patients and in animal model of this disease, as well as to study whether the current treatment ($100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) is able to protect the organism from damage associated with oxidative stress. Therefore, the present work has the general objective of to evaluate the oxidative damage and the effects of L-car in GA1 patients and in knockout animal model, using *Gcdh*^{-/-} mouse, evaluate the inflammatory profile in these patients and also the *in vitro* effect of L-car on DNA damage induced by GA. In the first chapter, significant increases of GA and C5DC were observed in GA1 patients, who were also deficient in carnitine before the supplementation. Isoprostanes (lipid damage), di-tyrosine (protein damage), urinary oxidized guanine species (DNA damage) and the reactive nitrogen species were significantly increased in these patients, as well as, a reduced antioxidant capacity were observed. L-car supplementation induced beneficial effects in these processes by reducing the levels of the increased biomarkers, as well as improving the antioxidant capacity of GA1 patients. GA was able to induce DNA damage *in vitro* at three different concentrations. Also tested at three concentrations, L-car was able to prevent *in vitro* this damage in a dose-dependent manner. An increase in the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8, GM-CSF and TNF- α in GA1 patients was also observed. Evidencing the antioxidant role to L-car, it was negatively correlated with the isoprostane levels and positively with the antioxidant capacity. In the second chapter it was verified that *Gcdh*^{-/-} mouse present carnitine deficiency, C5DC levels elevated and an increase in reactive oxygen species

production. Besides that, an increase in biomarkers of lipid peroxidation and protein damage and an alteration in the antioxidants enzymes SOD and GPx, in relation to the wild animals was observed in striatum from *Gcdh*^{-/-} mouse. As found in GA1 patients, it was verified a beneficial effect of L-car against all these alterations in striatum of this GA1 animal model. In this chapter dihydrodichlorofluorescein (DCFH) was positively correlated with thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and negatively with sulfhydryl content and free carnitine. This last one, quantified in the blood, was negatively correlated with C5DC. In the third and final chapter of this work, plasmatic levels of neurodegeneration markers were quantified in GA1 patients. Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) and cathepsin-D were found to be significantly increased affected by GA1 patients treated with L-car in relation to the control group. It was also found that C5DC levels were significantly increased in these patients. Finally, cathepsin-D was positively correlated with C5DC levels. Thus, L-car demonstrated to be useful in GA1 treatment not only by correcting secondary deficiency and by inducing the excretion of accumulated toxic metabolites, but also for preventing oxidative damage, both at the peripheral level in GA1 patients and at the central level in *Gcdh*^{-/-} mouse.

Keywords: Glutaric Aciduria Type I; Glutaryl-CoA dehydrogenase; Oxidative Stress; Inflammation; L-carnitine

PARTE I

Introdução, Estado da arte e
Objetivos

1. INTRODUÇÃO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são caracterizados por uma deficiência em uma proteína, geralmente com atividade enzimática, que ocasionam bloqueios em rotas metabólicas específicas de aminoácidos, proteínas e outras biomoléculas. Quando analisados individualmente, os EIM podem ser considerados raros, mas em conjunto, podem ser considerados um importante problema de saúde pública, afetando cerca de 1-2% da população mundial e despertando interesse em opções terapêuticas, diagnósticas e, claro, na melhora da qualidade de vida dos pacientes afetados (BARIC; FUMIC; HOFFMANN, 2001; SCRIVER et al., 2001).

A acidemia glutárica tipo I (AG1) é um EIM, da subclasse das acidemias orgânicas, que é causada pela deficiência de uma enzima, a glutaril-CoA desidrogenase (GCDH), fundamental para na rota metabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano. Essa deficiência leva a um bloqueio na rota metabólica desses aminoácidos, causando acúmulo de ácidos orgânicos no metabolismo, resultantes desse bloqueio, como os ácidos glutárico (AG), 3-hidróxi-glutárico e, algumas vezes, o ácido glutacônico (BARIC; FUMIC; HOFFMANN, 2001; COUCE et al., 2013). A AG1 é uma acidemia orgânica cerebral grave, uma vez que os pacientes afetados apresentam poucas ou quase nenhuma manifestações sistêmicas, com uma sintomatologia quase exclusivamente cerebral. Entre esses sinais e sintomas apresentados, destacam-se macrocefalia, crises encefalopáticas, discinesia, distonia, hipotonia, convulsões, rigidez muscular e espasticidade. Atrofia cortical frontotemporal, formação espongiiforme e diminuição da substância branca, além de degeneração do estriado estão entre os principais achados neuropatológicos dessa doença (FUNK et al., 2005; HARTING et al., 2009; KOLKER et al., 2015; STRAUSS; MORTON, 2003).

Assim, estudos que visam compreender os mecanismos pelos quais o dano cerebral, principalmente o dano estriatal agudo ocorrem são de fundamental importância. Além do diagnóstico precoce, um bom prognóstico para essa doença está atrelado a instituição rápida de um tratamento adequado, baseado na restrição da ingestão de lisina e triptofano e suplementação com L-carnitina (L-car)

(GOODMAN; F.E., 2001; PFEIL et al., 2013). A suplementação com L-car promove a remoção (detoxificação) de grupamentos acil acumulados e restaura a deficiência secundária dessa substância apresentada por pacientes afetados pela AG1.

Nos últimos anos, além desses aspectos, muito se tem discutido a respeito do potencial antioxidante e anti-inflamatório da L-car (DEON et al., 2015a; MESCKA et al., 2016b; RODRIGUES et al., 2017). Nesse sentido, seu uso pode ser benéfico em pacientes portadores de AG1, uma vez que a literatura demonstra o envolvimento de estresse oxidativo e inflamação na fisiopatologia dessa acidemia orgânica e em outras doenças neurodegenerativas que cursam com mecanismos de dano cerebral muito semelhantes aos encontrados na AG1 e outros EIM (COLÍN-GONZALES et al., 2015; SEMINOTTI et al., 2014, 2016).

2. ESTADO DA ARTE

2.1 Erros Inatos do Metabolismo (EIM)

O conceito de erro inato do metabolismo diz respeito a qualquer defeito hereditário causado pela deficiência parcial ou total de uma enzima. Além disso, um EIM pode ocorrer devido a falhas e defeitos de outras proteínas que não exercem função enzimática, como as proteínas de transporte, fatores de coagulação e transcrição de genes, imunoglobulinas, hormônios, receptores, entre outros (SCRIVER et al., 2001).

Essa deficiência ocasiona um bloqueio em uma determinada rota metabólica, resultando, assim, em acúmulo dos substratos da enzima e de seus derivados, bem como deficiência na síntese do produto da reação. O resultado de todo esse processo é o aparecimento de sintomatologia grave com diminuição nas capacidades físicas e mentais, podendo, em muitos casos, ser letal. Além disso, essa interrupção na rota normal pode levar à desvios para rotas metabólicas alternativas, onde haverá formação e acúmulo de produtos secundários tóxicos, que poderão comprometer os processos celulares, causando perda de função ou morte celular (SCRIVER et al., 2001).

O termo EIM foi inicialmente utilizado em 1908 por Sir Archibald E. Garrod que acreditava que doenças como Alcaptonúria tinham como causas defeitos genéticos relacionados ao metabolismo intermediário de biomoléculas, com heranças recessivas e crônicas. Ainda, os tratamentos disponíveis na época não proporcionavam melhoras clínicas significativas aos pacientes, reforçando ainda mais a hipótese de um defeito genético (CLARKE, 1996).

Este conjunto de doenças corresponde a cerca de 10% do total das desordens genéticas conhecidas e podem abranger defeitos de síntese, degradação, transporte ou armazenamento de moléculas no organismo. Quando analisados individualmente, essas doenças são consideradas raras quando comparadas à outras patologias que acometem os seres humanos. Todavia, quando visto de forma global, ou seja, analisando os EIM como um todo, sem separar por doença, os EIM afetam aproximadamente 1 a 2% da população, constituindo-se um importante problema de

saúde pública, sendo necessário, assim, uma maior atenção à essa parcela de doenças (BARIC; FUMIC; HOFFMANN, 2001).

Para a maioria dessas desordens, a prevenção da morte ou de sequelas neurológicas permanentes nos pacientes é dependente de um diagnóstico precoce e, obviamente, da instituição rápida de uma terapia adequada (BURTON B, 1998; JIMENEZ-SANCHEZ; CHILDS; VALLE, 2001). Esse grande número de alterações genéticas ocasiona diferentes distúrbios de sintomatologias muito variadas, com quadros clínicos complexos e diversificados, onde os pacientes acometidos por uma mesma desordem ou em um mesmo conjunto de doenças poderão apresentar desde formas assintomáticas variando até formas extremamente graves, letais ainda na infância (BURTON B, 1998).

A literatura classifica os EIM de diferentes formas, inclusive diferenciando entre os defeitos de moléculas grandes e defeitos de moléculas pequenas (SCRIVER et al., 2001). Levando em consideração o fenótipo clínico dos pacientes, os EIM podem ser classificados em três grandes grupos, conforme tabela 1 (SAUDUBRAY; CHARPENTIER, 1996).

Tabela 1. Classificação dos EIM pelo fenótipo clínico dos pacientes, segundo Saudubray e Charpentier 1996.

Grupo	Classificação	Exemplos
1	Distúrbios de síntese ou catabolismo de moléculas complexas	Doença de Fabry, Doença de Gaucher
2	Distúrbios do metabolismo intermediário	Aminoacidopatias (fenilcetonúria), Acidemias orgânicas (acidemia metilmalônica e propiônica, acidemia glutárica tipo I), defeitos do ciclo da ureia (citrulinemia e argininemia)
3	Distúrbios na utilização e produção de energia	Doenças mitocondriais

2.2 Acidemias Orgânicas

As acidemias ou acidúrias orgânicas constituem um grupo heterogêneo de doenças metabólicas hereditárias que envolvem tipicamente as vias metabólicas na degradação dos aminoácidos, carboidratos ou lipídeos. Esses EIM são caracterizados pelo acúmulo de um ou mais ácidos orgânicos (carboxílicos) nos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes afetados e, apesar de algumas doenças serem bem descritas, a frequência das acidemias orgânicas como um todo ainda é subestimada. Esse fato reflete a falta de capacitação e desconhecimento da equipe de saúde a respeito desse conjunto de desordens, o que leva a diagnósticos imprecisos e subnotificação (CHALMERS; LAWSON, 1983; WAJNER et al., 2001).

Ainda, para que o diagnóstico seja realizado corretamente, se fazem necessários, além de maior conhecimento da comunidade médica, centros especializados de triagem em que, para grande parte da população, não são acessíveis, principalmente as mais carentes, uma vez que a investigação dessas patologias demanda o uso de tecnologias que necessitam de grande investimento. Ou seja, esta é uma realidade de países em desenvolvimento, como o Brasil, onde o programa de triagem neonatal ainda cobre um pequeno número de doenças (DE CARVALHO et al., 2007; LEÃO; JOSÉ; AGUIAR, 2008). Em países mais desenvolvidos, como Holanda, Inglaterra e Alemanha, considerados referências em triagem neonatal, as frequências desses distúrbios giram próximos de 1:2.000 a 1:6.000 recém-nascidos vivos, variando em cada região (HOFFMANN et al., 2004).

Os pacientes afetados por uma doença desse grupo apresentam predominantemente disfunções neurológicas graves, ocorrendo de forma súbita geralmente após situações onde há uma desregulação metabólica, como episódios de febre, infecções e após imunizações. As principais alterações clínicas encontradas são convulsões, coma, ataxia, hipotonia, hipertonia, irritabilidade, tremores, atraso no desenvolvimento psicomotor, retardo mental, entre outras, secundárias ao dano neurológico característico nessas doenças (SCRIVER et al., 2001).

Acidose metabólica, acidose láctica, cetose, cetonúria, hiperglicemia, hiperamonemia, hipo / hiperglicemia, aumento nas concentrações de determinados ácidos graxos no sangue periférico, entre outras alterações bioquímicas, estão entre

os principais achados laboratoriais de acidúrias orgânicas e são extremamente úteis no auxílio ao diagnóstico (WAJNER et al., 2001).

Ainda, o diagnóstico por imagem tem auxiliado muito na detecção desses EIM, uma vez que achados neurológicos como macrocefalia, atrofia frontotemporal e alterações na substância branca dessas doenças, podem ser visualizados com auxílio de tomografia computadorizada e ressonância magnética nuclear (FUNK et al., 2005; HERINGER et al., 2010; KOLKER et al., 2015).

2.3 Acidemia Glutárica tipo I (AG1)

A acidemia glutárica do tipo I é um EIM causado pela deficiência severa da atividade da enzima glutaril-CoA desidrogenase (GCDH), uma importante enzima da rota metabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano, que catalisa a desidrogenação do glutaril-CoA em glutaconil-CoA e, posteriormente, a descarboxilação de glutaconil-CoA em crotonil-CoA (HOFFMANN; ZSCHOCKE, 1999; SCRIVER et al., 2001).

Como demonstrado na figura 1, o bloqueio nessa rota metabólica leva ao acúmulo dos ácidos glutárico (AG), principal metabólito acumulado e relacionado com os danos cerebrais encontrados na AG1, ácido 3-hidróxi-glutárico (3HG) e, algumas vezes, o ácido glutacônico nos tecidos e líquidos corporais, os quais podem alcançar concentrações de até 400 μ M no soro. Ainda, podem ser encontrados aumento nas concentrações desses metabólitos conjugados com glicina e carnitina, a exemplo da glutarilcarnitina (C5DC), resultado da esterificação da carnitina com o ácido glutárico. O acúmulo desses ácidos orgânicos caracteriza bioquimicamente a doença (BARIC; FUMIC; HOFFMANN, 2001; COUCE et al., 2013; HOFFMANN; ZSCHOCKE, 1999).

No cromossomo 19p. 13.2 está localizado o gene responsável pela codificação dos aminoácidos que darão origem a GCDH (BARADARAN; GALEHDARI; AMINZADEH, 2014; GOODMAN et al., 1977; SCRIVER et al., 2001). Apesar de diversas mutações já terem sido identificadas ao longo dos anos, até o momento, não foi encontrado correlação entre alguma dessas mutações específicas conhecidas com o fenótipo clínico dos pacientes afetados pela AG1. No futuro, com o avanço das técnicas moleculares de diagnóstico, espera-se correlacionar esses achados

moleculares para um melhor prognóstico dessa doença. (LISYOVA et al., 2016; SHADMEHRI et al., 2018).

A AG1 é uma das mais frequentes acidemias orgânicas, tendo sua prevalência estimada em 1:30.000 a 1:100.000 recém nascidos vivos (KOLKER et al., 2015; KÖLKER et al., 2000; SCRIVER et al., 2001; WAJNER et al., 2001).

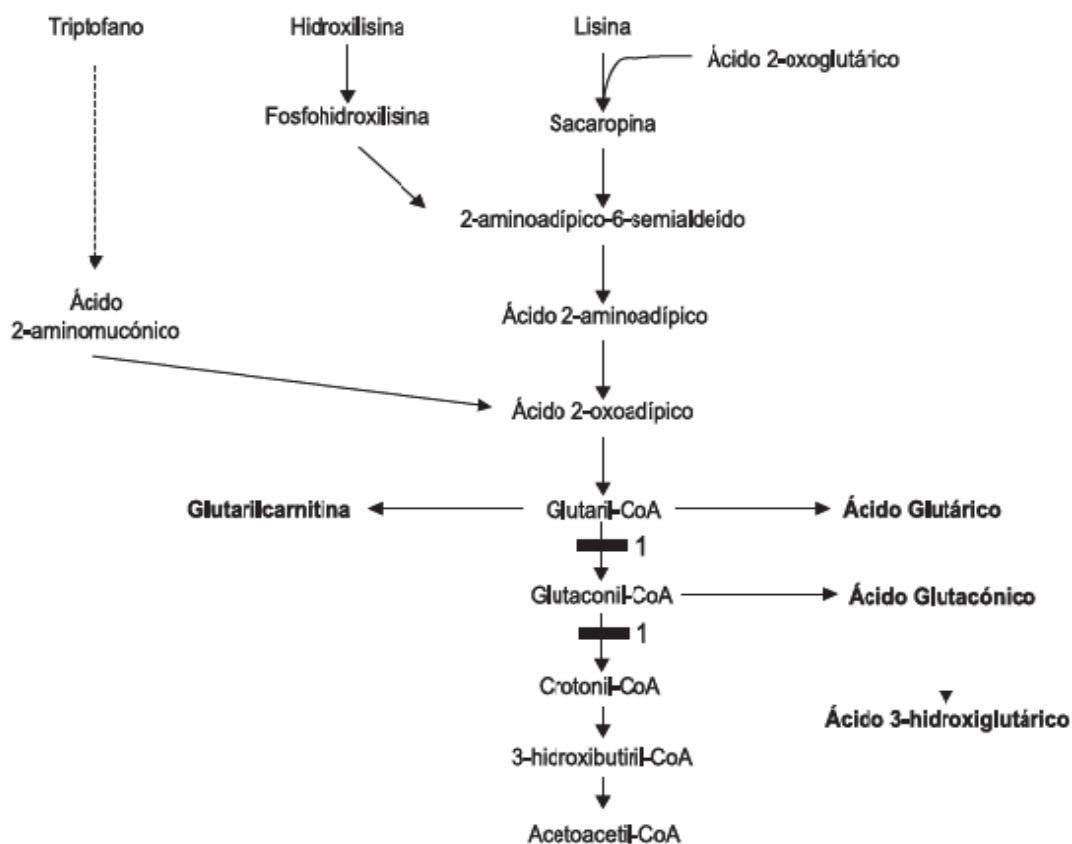


Figura 1: Rota metabólica AG1 (Adaptado de Scriver et al, 2001). Deficiência de GCDH, representado pelo número 1, levando ao bloqueio na rota metabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano. Esse bloqueio leva ao acúmulo dos ácidos glutárico (em maior proporção), glutacônico e 3-hidroxi-glutárico. Representada ainda a conjugação do ácido glutárico com carnitina, formando glutarilcarnitina.

2.3.1 Achados neuropatológicos, clínicos e sintomatologia

A AG1 é considerada uma doença neurometabólica uma vez que os sintomas apresentados por pacientes afetados por essa desordem são principalmente

neurológicos, com poucas ou quase nenhuma manifestações sistêmicas (GOODMAN et al., 1977). No período neonatal os pacientes apresentam macrocefalia (achado mais comum), crises encefalopáticas, discinesia, distonia (movimentos de origem involuntária), hipotonia, convulsões de início súbito, dificuldade de alimentação, rigidez muscular e espasticidade, estes últimos relacionados a destruição estriatal que ocorre na AG1 após episódios de encefalopatia aguda (KÖLKER et al., 2004; STRAUSS; MORTON, 2003). Além disso, é muito frequente que os pacientes afetados por essa desordem metabólica apresentem diminuição do nível de consciência, ataxia, irritabilidade, retardo mental e demência (KOLKER et al., 2015; KULKENS et al., 2005).

O aparecimento dessa sintomatologia tem associação com descompensações metabólicas, desencadeadas após processos de infecção, febre ou, até mesmo, imunizações em um período onde o cérebro está em desenvolvimento e, dessa forma, com vulnerabilidade elevada (GOODMAN; F.E., 2001). O paciente, inicialmente assintomático, passa por um período chamado fase pré-encefalopática, que pode transcorrer entre os 6 meses até os primeiros anos da infância. Após a crise encefalopática e com todos os efeitos secundários a ela, o paciente acaba por ter sua capacidade motora comprometida. Existem relatos na literatura de raros pacientes que não apresentaram essa crise na fase de desenvolvimento cerebral e mantiveram suas capacidades motoras inalteradas ou pouco alteradas, levando a sintomatologia mais branda (pequenos tremores) ou até mesmo assintomáticas (HERINGER et al., 2010; HOFFMANN; ZSCHOCKE, 1999; LINDNER et al., 2006).

Bioquimicamente, esses pacientes apresentam níveis séricos elevados de AG, 3-HG e de seus conjugados com glicina e carnitina, especialmente a C5DC. Além disso, os indivíduos durante as crises podem apresentar severa acidose metabólica, acidemia láctica, hiperamonemia, cetose e cetonúria que, se não corrigido a tempo, podem levar o paciente à lesões cerebrais irreversíveis ou até mesmo ao óbito (GOODMAN; F.E., 2001; KOLKER et al., 2015).

Os principais achados neuropatológicos da deficiência da GCDH incluem atrofia cortical frontotemporal, formação esponjiforme e diminuição da substância branca, além de degeneração do estriado entre os primeiros meses de vida, conforme exemplo ilustrado na figura 2 (BRISMAR; OZAND, 1995; NUNES et al., 2013).

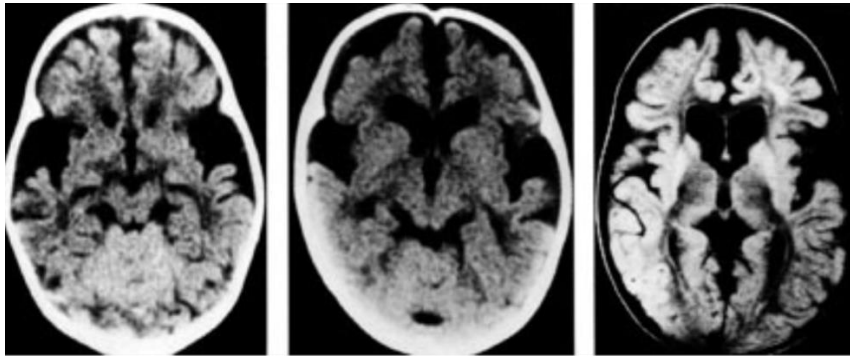


Figura 2. Achado neurológico comum na AG1, caracterizado por diminuição da substância branca, caracterizando um processo neurodegenerativo (adaptado de Nunes et. al., 2013).

2.3.2 Diagnóstico

O diagnóstico da AG1 é usualmente realizado pela detecção de concentrações elevadas dos metabólitos característicos da doença na urina dos pacientes por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS), através da detecção por espectrometria de massas em tandem (LC/MS/MS) de aumento de C5DC no sangue dos indivíduos afetados (usualmente na triagem neonatal) e, também, através da determinação da atividade da enzima GCDH em leucócitos ou fibroblastos dos pacientes (BARIC et al., 1998; GOODMAN; F.E., 2001; PFEIL et al., 2013).

O diagnóstico molecular é utilizado para identificar as diferentes mutações, através do sequenciamento completo do gene GCDH (19p13.2). Ao todo, mais de 150 mutações já foram detectadas em indivíduos portadores de AG1, a maioria resultando em uma troca de aminoácidos dessa enzima. Apesar de fornecer um resultado rápido e preciso, ainda é um método caro e que necessita de centros especializados para sua realização (BARADARAN; GALEHDARI; AMINZADEH, 2014).

2.3.3 Tratamento

Uma vez realizado o diagnóstico, o tratamento é instituído por uma dieta hipercalórica restrita nos aminoácidos precursores diretos dos ácidos orgânicos acumulados na doença (lisina, hidroxilisina e triptofano), além de suplementação de

L-carnitina (L-car), no intuito de corrigir a deficiência secundária dessa substância e proporcionar uma detoxificação dos metabólitos tóxicos. Em pacientes responsivos, pode ser administrado riboflavina, o cofator da GCDH (TUNCEL et al., 2018). Os casos comuns de cetoacidose devem ser manejados com suprimento de uma dieta isenta dos aminoácidos envolvidos na doença, principalmente a lisina, administração via parenteral de glicose (soro glicosado 5%) e bicarbonato de sódio. Essas são medidas de emergência que servem para evitar o catabolismo, evitando crises encefalopáticas agudas que culminam com dano cerebral, principalmente com o dano estriatal (AFROZE; YUNUS, 2014; BARIC et al., 1998).

Ainda que todas essas medidas sejam realizadas, o tratamento convencional ainda não é capaz de evitar por completo a disfunção orgânica irreversível com o aumento da idade (TUNCEL et al., 2018). Devido a isso, diversos medicamentos têm sido avaliados na terapia da AG1, como anti-inflamatórios, anticonvulsivantes e antioxidantes (BARIC et al., 1998; BURLINA et al., 2004; GOKMEN-OZEL et al., 2012).

2.3.4 Mecanismos de dano cerebral

Os mecanismos responsáveis pelo dano cerebral encontrados na AG1 ainda são poucos conhecidos apesar de alguns estudos terem demonstrado efeitos neurotóxicos causados pelos AG e 3HG, tais como alterações nos sistemas glutamatérgico e GABAérgico, inibição do metabolismo energético mitocondrial e estresse oxidativo. Diversos desses estudos foram realizados *in vivo*, utilizando modelos animais químicos e nocautes, e *in vitro* na tentativa de entender esses processos e auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e de manejo da doença (AMARAL et al., 2012a, 2012b, 2015; KOLKER et al., 2001; LATINI et al., 2005; RODRIGUES et al., 2015; SEMINOTTI et al., 2014, 2016; WAJNER et al., 2004). Todavia, resultados em pacientes afetados pela AG1 ainda são escassos.

No contexto de estresse oxidativo como mecanismo de dano neurológico na doença, evidências experimentais utilizando modelo animal com camundongos nocaute, sugerem que os metabólitos tóxicos acumulados na AG1, especialmente o AG, podem induzir a geração de radicais livres que, por sua vez, podem estar associados a fisiopatologia da doença (DE OLIVEIRA MARQUES et al., 2003;

FERREIRA et al., 2007; FIGHERA et al., 2006; LATINI et al., 2005, 2007; LEIPNITZ et al., 2005; MAGNI et al., 2009).

2.4 Modelo Animal de AG1

Para facilitar a realização de estudos que pudessem melhor elucidar os mecanismos causadores do dano cerebral e ajudar na compreensão da patogenia da doença, Köeller et al (KOELLER et al., 2002) desenvolveram um modelo *nocaut* para o gene da GCDH (*Gcdh*^{-/-}), onde os animais apresentavam um fenótipo bioquímico com elevadas concentrações dos ácidos orgânicos acumulados na doença, AG, 3-HG e de seus conjugados com glicina e carnitina, similar ao fenótipo encontrado nos pacientes afetados. Todavia, as alterações neurológicas, inclusive a degeneração estriatal característica da AG1, geralmente encontradas nesses indivíduos, não foram reproduzidas de maneira satisfatória nesse modelo (KOELLER et al., 2002).

Para aperfeiçoar o modelo proposto e gerar um padrão mais fidedigno, em 2006 Zinnanti et al propuseram uma adaptação com a administração oral de uma sobrecarga de lisina, principal aminoácido precursor dos metabólitos neurotóxicos, adicionada à dieta normal dos animais *nocautes* (ZINNANTI et al., 2006). A partir dessa adaptação, foi verificado que as concentrações de AG no cérebro dos camundongos *Gcdh*^{-/-} aumentaram significativamente e que os mesmos apresentaram lesão estriatal semelhante aos pacientes afetados pela AG1. Ainda, nesses mesmos animais, essa alteração no modelo inicial foi capaz de induzir a perda de seletividade da barreira hematoencefálica (BHE) (ZINNANTI et al., 2006). Dessa forma, essa adaptação passou a vigorar como padrão para o modelo inicialmente proposto.

2.5 L-carnitina (L-car)

A L-car (ácido 4-n-trimetilamônio-3-hidróxi-butírico), cuja estrutura química está representada na figura 3, é um componente endógeno natural, de baixo peso molecular, que desempenha um importante papel fisiológico no transporte de ácido graxos de cadeia longa do citoplasma para o interior da mitocôndria, para a produção de ATP através da β -oxidação (BAHL; BRESSLER, 1989). Já foi identificada em uma variedade de tecidos de mamíferos podendo estar presente na forma de carnitina livre, correspondente a cerca de 80-85% em plasma de indivíduos saudáveis, ou de

carnitina acilada, que representa a ligação com grupamentos acil da acil coenzima A (NELSON; COX, 2011). A maior parte da carnitina encontrada no organismo é proveniente da dieta, de fontes que incluem, principalmente, a carne vermelha, ovos, peixes, leite e seus derivados e laticínios. Um pequeno montante é sintetizado pelo fígado, rins e cérebro a partir da lisina e metionina, aminoácidos precursores dessa molécula. Devido a isso, ela não é considerada um nutriente essencial na dieta (HOPPEL, 2003).

A L-car é bastante utilizada no tratamento das acidemias orgânicas, entre as quais a AG1, uma vez que corrige a deficiência secundária de carnitina e promove a remoção (detoxificação) de grupamentos acil acumulados, através da ação da enzima carnitina aciltransferase, que catalisa a formação de glutarilcarnitina e outros ésteres de carnitina, restaurando, dessa forma, a concentração de Coa livre intramitocondrial (razão acil CoA/CoA livre mitocondrial) (BAHL; BRESSLER, 1989; HOPPEL, 2003; WALTER, 2003). As doses geralmente empregadas variam entre 100 a 200 mg/kg/dia (NYHAN; BARSHOP; OZAND, 2005). Sabe-se que a deficiência dessa substância pode ser grave, provocando efeitos sobre o sistema nervoso central (HOPPEL, 2003).

Além de sua importância em processos bioenergéticos, nos últimos anos, alguns trabalhos têm demonstrado efeitos antioxidantes e antiperoxidativos para a L-car, incluindo em alguns EIM (AUGUSTYNIAK; SKRZYDLEWSKA, 2009; DEON et al., 2015b; GUERREIRO et al., 2015a; MESCKA et al., 2016a; RIBAS; VARGAS; WAJNER, 2014; SOLARSKA et al., 2010).

Nesse contexto, Mescka et al relataram efeitos benéficos da L-car sobre o dano oxidativo a lipídios e proteínas em pacientes portadores de doença da urina do xarope do bordo (DXB) (MESCKA et al., 2013a). Nessa mesma doença foi verificado por Guerreiro et al, em urina de pacientes, um potencial dessa molécula em proteger contra o dano a biomoléculas e melhorar a capacidade antioxidante desses pacientes (GUERREIRO et al., 2015a). Na fenilcetonúria, umas das aminoacidopatias mais frequentes na população, a L-car foi altamente efetiva na proteção contra os danos oxidativos causados pelo acúmulo de fenilalanina, em pacientes (DEON et al., 2015c; SITTA et al., 2009). Em inúmeros estudos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, essa molécula demonstrou importante efeito protetor contra o dano ao DNA, em diferentes doenças como as acidemias L-2-hidróxiglutárica e propiônica e metilmalônica, (RIBAS et al., 2010b; RODRIGUES et al., 2017).

Alguns estudos demonstraram que a L-car possui uma ação anti-peroxidativa que pode ser atribuída a sua capacidade de quelar íons Fe^{+2} , atuando na reação de Fenton de modo a evitar a formação de espécies reativas. Diversos mecanismos têm sido propostos, entre eles uma ação sequestradora sobre as espécies reativas do oxigênio (efeito *scavenger*) e um efeito estabilizador do dano em membranas celulares (GULCIN, 2006; REZNICK et al., 1992).

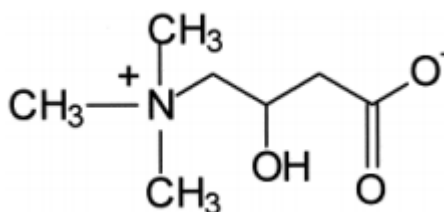


Figura 3. Estrutura química da L-carnitina

2.6 Estresse Oxidativo

2.6.1 Espécies reativas do oxigênio e radicais livres

As espécies reativas do oxigênio (ERO) são originadas no nosso organismo como subprodutos inevitáveis do metabolismo aeróbico ou a partir de influências exógenas, como dieta inadequada, consumo exagerado de álcool, fumo, uso de quimioterápicos, exposição às radiações ionizante e eletromagnética (SOUTHORN; POWIS, 1988; WULF, 2001). Estas moléculas possuem a característica de originarem reações em cadeia pela sua reatividade com as moléculas vizinhas. Tais espécies podem ser radicalares, denominadas radicais livres, e não-radicalares (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007).

Os radicais livres são moléculas ou átomos, capazes de uma existência independente, que possuem elétrons não pareados, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Essa característica os torna extremamente reativos e com uma grande capacidade de combinar-se inespecificamente com diversas moléculas da estrutura celular e oxidar biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007; MAXWELL, 1995).

Utiliza-se o termo ERO ao fazer referência aos radicais formados pela redução do oxigênio molecular (O_2), o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e, também aos não radicais derivados do oxigênio, como o oxigênio *singlet* (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BOVERIS; CHANCE, 1973). Além das ERO, existem, ainda, as espécies reativas do nitrogênio (ERN), sendo representado principalmente pelo óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007).

2.6.2 Defesas enzimáticas e não-enzimáticas

Para evitar a ação tóxica das ERO e ERN, os seres vivos desenvolveram, ao longo de sua evolução, mecanismos de defesa, tanto enzimáticos, representados pela atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx), quanto não-enzimáticos, representados por diversos compostos como a glutathiona reduzida (GSH), bilirrubina, ubiquinol, entre outros compostos antioxidantes (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007; HALLIWELL, 2006; MATES; SANCHEZ-JIMENEZ, 1999). A tabela 2 resume o mecanismo de algumas importantes defesas antioxidantes citadas segundo Halliwell e Guterridge (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007).

Tabela 2. Resumo do mecanismo das principais defesas antioxidantes.

Defesa antioxidante	Mecanismo	Reação
SOD	Catalisa a dismutação de dois radicais $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 e O_2 .	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} \rightleftharpoons H_2O_2 + O_2$
CAT	Catalisa a decomposição de H_2O_2 a O_2 (oxigênio no estado fundamental).	$2 H_2O_2 \rightleftharpoons 2 H_2O + O_2$
GPx	Responsável pela remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos (LOOH) para seus álcoois correspondentes (LOH). Essa reação é realizada através do acoplamento de sua redução a H_2O com a oxidação da GSH, que doa elétrons e é oxidado para GSSG.	$LOOH + 2GSH \rightleftharpoons GSSG + H_2O + LOH$
GSH	Antioxidante endógeno não enzimático que atua junto a vitamina C e E. Ainda, desempenha papel importante na reação da GPx.	

2.6.3 Antioxidantes

Uma substância pode ser definida como um antioxidante quando a mesma estiver presente em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável e ser capaz de diminuir ou prevenir de forma significativa a oxidação desse substrato (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007).

Nosso organismo está, normalmente, em equilíbrio entre a produção e degradação de radicais livres, que existem em baixas concentrações em todos os tecidos biológicos (WULF, 2001). Todavia, determinadas situações patológicas podem levar à diminuição das defesas antioxidantes, aumento na produção de radicais livres ou, ainda, levar há uma condição em que a combinação dessas duas situações está presente. O resultado desse desequilíbrio é denominado estresse oxidativo, como demonstrado na figura 4 (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007). O estresse oxidativo pode resultar em danos a diversas biomoléculas no organismo, tais como lipídios, proteínas e DNA, acarretando em alterações em suas estruturas ou funções e, conseqüentemente, interferindo na homeostase celular (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007).

Por ser um órgão que consome grandes quantidades de oxigênio para o seu correto funcionamento e pelo fato de que o metabolismo envolvido com os receptores de glutamato e dopamina ser grande gerador de ERO, que levam a depleção de antioxidantes em muitas regiões desse tecido, o cérebro é bastante suscetível ao efeitos do estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007).



Figura 4. Estresse oxidativo (Scandalios, 2002).

2.6.4 Estresse oxidativo e doenças neurológicas

Nos últimos anos, muita atenção tem sido focada nos radicais livres como mediadores do dano tecidual em doenças humanas. O estresse oxidativo já foi demonstrado em diversas doenças crônico-inflamatórias como diabetes e arterosclerose, doenças vasculares, neoplásicas e neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla (BEN-MENACHEM; KYLLERMAN; MARKLUND, 2000; LIU et al., 2017; PETROU; TERZIDAKI, 2017; REZNICK et al., 1992). Dessa forma, estudos têm sugerido que o estresse oxidativo também pode contribuir para o dano neurológico observado em algumas acidúrias orgânicas e outros EIM, uma vez que o acúmulo de metabólitos tóxicos que ocorre nessas desordens pode levar a uma excessiva produção de espécies reativas que por sua vez podem estar envolvidas no mecanismo de dano cerebral e posterior surgimento de sintomatologia característica desse conjunto de doenças (KOLKER et al., 2000; KÖLKER et al., 2004; LATINI et al., 2007).

Nesse contexto, estudos demonstraram que os ácidos glutárico e 3-hidróxi-glutárico são capazes de estimular a produção de espécies reativas do oxigênio e a lipoperoxidação, bem como diminuir as defesas antioxidantes em cérebro de camundongos *Gcdh*^{-/-}, que são considerados o modelo animal ideal para o estudo da patogênese da AG1 (DE OLIVEIRA MARQUES et al., 2003; FERREIRA et al., 2007; FIGHERA et al., 2006; LATINI et al., 2005, 2007; MAGNI et al., 2009; SEMINOTTI et al., 2012, 2016). É importante ressaltar que, até o momento, não existem na literatura estudos em modelos animais de AG1 e, também, em pacientes afetados com essa doença relacionados aos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da terapia com L-car. Logo, os resultados obtidos neste trabalho poderão ser potencialmente úteis para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para a AG1, especialmente para prevenir o dano cerebral e ajudar na compreensão dos processos de neurodegeneração nesta doença.

2.7 Inflamação

A inflamação é caracterizada por ser uma resposta inespecífica a uma agressão, considerada, portanto, uma defesa do organismo contra agentes agressores de origem química, física ou biológica (TILLEY; COFFMAN; KOLLER, 2001), sendo, portanto, a resposta mais precoce quando há uma lesão tissular ou quadro infeccioso. Os processos inflamatórios são, de certa forma, uma desordem complexa envolvendo diferentes células e componentes moleculares (MURIACH et al., 2014).

Juntamente com o estresse oxidativo, esses processos são associados com os mecanismos causadores de diversas patologias, como desordens neurodegenerativas e doenças neurometabólicas (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007). Apesar da inflamação ser um processo responsável pela defesa contra essas agressões, quando há uma resposta que seja exacerbada ou inadequada, formam, juntamente com outros fatores, os componentes significativos de muitas doenças, entre os quais podemos incluir os EIM (RANG; DALE, 2008). Em pacientes com desordens metabólicas, a inflamação possui um papel chave, uma vez que desordens metabólicas e crise encefalopática surgem após processos inflamatórios (SCRIVER et al., 2001).

As citocinas são proteínas que possuem papel importante na reposta inflamatória, uma vez que estão envolvidas tanto no desenvolvimento como na manutenção e supressão desse processo. Já foram identificadas um grande número de citocinas, que formam um enorme conjunto de proteínas, englobados pelas interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (TNF), interferonas, quimiocinas e fatores estimuladores de colônia (CSF). De acordo com suas formas de atuar, as citocinas podem ser classificadas de acordo com a tabela 3.

Tabela 3. Classificação das citocinas inflamatórias segundo Tayal et al (TAYAL; KALRA, 2008).

Classificação	Exemplos
Pró-inflamatórias	IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , GM-CSF
Anti-inflamatórias	IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β

As citocinas pró-inflamatórias agem pela ativação de macrófagos, células NK, T e B, além de estimular a proliferação de imunoglobulinas. Já as chamadas citocinas anti-inflamatórias tem suas ações voltadas para diminuir as citocinas pró-inflamatórias e supressão de monócitos (GALIC; RIAZI; PITTMAN, 2012; TAYAL; KALRA, 2008).

Diante disso, vários estudos têm demonstrado níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em EIM. Exemplo disso são os achados referente ao aumento de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com DXB (MESCKA et al., 2015c) e adrenoleucodistrofia ligada ao X (MARCHETTI et al., 2017) encontrados recentemente.

Diante desse contexto, muito se tem buscado por novas abordagens terapêuticas, inclusive pela inclusão de substâncias antioxidantes e anti-inflamatórios que possam ser úteis no tratamento de pacientes acometidos por essas doenças. Já foi reportado em modelo animal que, após injeção de AG, os níveis de TNF- α e IL-1 β estão aumentados em hipocampo de ratos. Além disso, no mesmo estudo, evidenciou-se que a N-acetilcisteína previne o aumento dessas citocinas (RODRIGUES et al., 2013). Todavia, ainda não foi descrito na literatura estudos avaliando o perfil inflamatório em pacientes acometidos pela AG1.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o dano oxidativo, perfil inflamatório e o efeito da L-car em modelo animal e pacientes portadores de AG1.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Capítulo 1:

- Avaliar o dano oxidativo a lipídios, proteínas e DNA em pacientes portadores de AG1;
- Avaliar o atual tratamento com L-car sobre o dano oxidativo em pacientes portadores de AG1;
- Avaliar o perfil inflamatório em pacientes portadores de AG1;
- Avaliar o efeito *in vitro* do AG e da L-car sobre o dano ao DNA em leucócitos periféricos de indivíduos sadios.

3.2.2. Capítulo 2:

Avaliar no estriado cerebral de camundongos selvagens (WT) e *nocautes Gcdh^{-/-}* com 30 dias de vida submetidos à dieta normal (0,9 % de lisina) ou rica em lisina (4,7%) e associada ou não à administração de L-car, investigando seus efeitos antioxidantes, os seguintes parâmetros:

- Dano oxidativo a lipídios e proteínas;

- Defesas antioxidantes enzimáticas;
- Produção de espécies reativas;
- Níveis de carnitina livre e acilcarnitinas, correlacionando com os parâmetros de estresse oxidativo;

3.2.3. Capítulo 3:

- Avaliar os marcadores de neurodegeneração BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) e NCAM (molécula de adesão neuronal), PDGF-AA (fator de crescimento derivado de plaquetas) e catepsina-D (aspártico-protease lisossomal) em plasma de pacientes afetados pela AG1 tratados com L-car;
- Avaliar as concentrações de C5DC em pacientes portadores de AG1, tratados com L-car, correlacionando com os marcadores plasmáticos de neurodegeneração.

PARTE II

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO 1: OXIDATIVE DAMAGE IN GLUTARIC ACIDURIA TYPE I PATIENTS AND THE PROTECTIVE EFFECTS OF L-CARNITINE TREATMENT

Artigo publicado na revista *Journal of Cellular Biochemistry* (fator de impacto = 2.959)

O texto das páginas **45-56** que contém o artigo foi suprimido tendo em vista que o periódico não autoriza arquivo da versão pdf do editor.

4.2 CAPÍTULO 2: L-CARNITINE PREVENTS OXIDATIVE STRESS IN STRIATUM OF GLUTARYL-COA DEHYDROGENASE DEFICIENT MICE SUBMITTED TO LYSINE OVERLOAD

Artigo submetido à revista *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*
(fator de impacto = 5.108)

O texto do capítulo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas **59-94**, foi suprimido por tratar-se de um manuscrito em preparação para publicação em periódico científico internacional. Esse capítulo trata dos resultados em modelo animal de acidemia glutárica tipo I, onde foram avaliados os danos associados ao estresse oxidativo no estriado cerebral de camundongos selvagens (WT) e *noctates Gcdh*^{-/-} com 30 dias de vida submetidos à dieta normal (0,9 % de lisina) ou rica em lisina (4,7%) e associada ou não à administração de L-car.

4. RESULTADOS

4.3 CAPÍTULO 3: RESULTADOS PRELIMINARES DA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES PLASMÁTICOS DE NEURODEGENERAÇÃO EM PACIENTES COM ACIDEMIA GLUTÁRICA TIPO I TRATADOS COM L-CARNITINA.

O texto do capítulo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas **97-115** foi suprimido por tratar-se de um manuscrito em preparação para publicação em periódico científico internacional. Esse capítulo trata da avaliação dos marcadores de neurodegeneração BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) e NCAM (molécula de adesão neuronal), PDGF-AA (fator de crescimento derivado de plaquetas) e catepsina-D (aspártico-protease lisossomal) em plasma de pacientes afetados pela AG1 tratados com L-car;

PARTE III

Discussão e Conclusões

5. DISCUSSÃO

As principais características apresentadas por pacientes afetados pela AG1 são a degeneração progressiva do córtex cerebral juntamente com necrose aguda do estriado, associadas à descompensação metabólica (GOODMAN; F.E., 2001). O paciente, inicialmente assintomático, apresenta como principais sintomas distonia e discinesia, hipotonia, fraqueza muscular e convulsões, que se manifestam após episódios de encefalopatia aguda (BOY et al., 2018; HERINGER et al., 2010; HOFFMANN; ZSCHOCKE, 1999). Bioquimicamente, esses pacientes apresentam níveis séricos elevados de AG, 3-HG e de seus conjugados com glicina e carnitina, especialmente a C5DC. Além disso, os indivíduos durante as crises podem apresentar severa acidose metabólica, acidemia láctica, hiperamonemia, cetose e cetonúria que, se não corrigido a tempo, podem levar o paciente à lesões cerebrais irreversíveis ou até mesmo ao óbito (GOODMAN; F.E., 2001; KOLKER et al., 2015).

De modo comum à maioria das acidemias orgânicas, o mecanismo pelo qual os metabólitos tóxicos acumulados na doença levam ao surgimento destas lesões cerebrais ainda não está bem definido, apesar de ser um campo bem explorado por diversos pesquisadores. Dessa maneira, várias hipóteses vêm surgindo na tentativa de elucidar esse processo e colaborar na descoberta de novas abordagens terapêuticas e incrementar uma melhora na qualidade de vida dos pacientes. Essas hipóteses incluem possíveis danos à integridade da barreira hematoencefálica, excitotoxicidade, alterações no metabolismo energético cerebral e estresse oxidativo (AMARAL et al., 2015; DE OLIVEIRA MARQUES et al., 2003; KOLKER et al., 2001; LATINI et al., 2005; RODRIGUES et al., 2016; SEMINOTTI et al., 2014; WAJNER et al., 2004).

Pelo fato de que a AG1 causa, principalmente, um processo de degeneração aguda do estriado, muitos pesquisadores buscam melhor compreender esses mecanismos comparando os achados desta doença com o que é encontrado para outras doenças neurodegenerativas mais conhecidas e bem estudadas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson. Sabidamente, o dano cerebral encontrado nessas doenças, assim como para AG1, ainda é uma incógnita entre os pesquisadores e muitos trabalhos na literatura demonstram, particularmente, o envolvimento de

radicais livres e colocam o estresse oxidativo como uma das causas para surgimento ou agravamento do dano cerebral encontrado (CHAKRABARTI et al., 2013; DIZDAROGLU, 2015; LIU et al., 2017; PETROU; TERZIDAKI, 2017; THAPA; CARROLL, 2017). Não somente em doenças com envolvimento cerebral, mas também doenças crônicas como diabetes, aterosclerose e doenças cardiovasculares tem sido relacionados com alterações na homeostase redox (MURIACH et al., 2014; WANG et al., 2017; WAYHS et al., 2014).

Assim, não é difícil hipotetizar que o estresse oxidativo possa contribuir para a fisiopatologia dos diferentes erros inatos do metabolismo. Nesse contexto, vários estudos vêm demonstrando que essa hipótese é verdadeira, uma vez que pesquisas envolvendo doenças metabólicas vem sendo realizadas com o intuito de melhor elucidar o papel desse processo e sua relação com os achados neurológicos comuns nesses distúrbios. O objetivo da maioria dessas pesquisas é a busca pelo entendimento dos mecanismos envolvidos e de novas abordagens terapêuticas, que colaborem para um melhor prognóstico dessas doenças (DE ANDRADE et al., 2017; DONIDA et al., 2017; FAVERZANI et al., 2017).

Muitos estudos tem mostrado que os metabólitos acumulados em EIM causam uma excessiva produção de radicais livres, além de reduzir as defesas antioxidantes. Em doenças como fenilcetonúria (PKU) (DEON et al., 2015a; SITTA et al., 2009) e doença do xarope do bordo (DXB) (GUERREIRO et al., 2015a; MESCKA et al., 2016b) e acidemias orgânicas como acidemias propiônicas (PPA) e metilmalônica (MMA)(RIBAS et al., 2010a), 3-hidroxi-3-metil-glutárica (3HMG) (DOS SANTOS MELLO et al., 2015) e L-2-hidroxi-glutárica (L-2HG) (RODRIGUES et al., 2017), já foi verificado que há alterações nos parâmetros de estresse oxidativo, incluindo dano a lipídios, proteínas e DNA.

Em um contexto semelhante, resultados obtidos de estudos com camundongos *Gcdh*^{-/-} sugerem que o AG, metabólito acumulado em grandes concentrações nos tecidos e fluidos corporais dos pacientes afetados pela AG1, pode levar há uma maior produção de radicais livres que, por sua vez, podem estar relacionados com as causas do dano cerebral característico dessa doença (DE OLIVEIRA MARQUES et al., 2003; FERREIRA et al., 2007; FIGHERA et al., 2006; LATINI et al., 2007; LEIPNITZ et al., 2005; MAGNI et al., 2009). É importante salientar que até o presente momento, ainda

não foi investigado o papel do estresse oxidativo e os efeitos da terapia com L-car em pacientes afetados pela AG1, assim como a avaliação dos efeitos desse tratamento também em camundongos *Gcdh*^{-/-}. Tampouco foi realizado um estudo avaliando o perfil inflamatório desses indivíduos.

O primeiro capítulo desse trabalho foi elaborado a partir da investigação de possíveis alterações em biomarcadores de estresse oxidativo e nitrosativo, bem como no perfil inflamatório em pacientes afetados pela AG1 e, também, estudos *in vitro* sobre o dano ao DNA. Essa investigação foi realizada em pacientes tratados (momento do diagnóstico) e não-tratados com L-car, a fim de verificar quais os possíveis benefícios dessa terapia.

A partir dos resultados encontrados na primeira etapa desse trabalho, surgiu a necessidade de melhor entender esses efeitos a nível cerebral, uma vez que a maioria dos sintomas são neurológicos, de maneira a melhorar a compreensão dos efeitos do dano oxidativo e da terapia com carnitina na doença. Dessa forma, no segundo capítulo desse trabalho nós propusemos uma abordagem em torno da terapia com L-car em um modelo animal conhecido e validado, para que fosse possível conduzir estudos a nível central, mais especificamente, no estriado cerebral, tecido mais afetado na doença e envolvido com os sintomas associados AG1. Até a presente data, não existe na literatura artigos científicos avaliando a terapia com L-car à nível central e em modelo *nocaut* animal conforme realizado neste estudo.

A L-car, uma molécula altamente polar e hidrofílica, que desempenha importante funções no metabolismo. Como exemplo, podemos citar a principal função de transporte de ácidos graxos de cadeia longa para dentro da mitocôndria, para serem utilizados na β -oxidação, finalizando na geração de ATP (BAHL; BRESSLER, 1989). Outra função conhecida da L-car no metabolismo é o seu papel na regulação da função neural através da mediação da transferência de grupos acetila para síntese de acetilcolina (BINIENDA; ALI, 2001). Além disso, esse composto vem demonstrando possuir um potencial antioxidante devido a sua capacidade de sequestrar radicais livres (desempenhando a chamada função “*scavenger*”) e reduzir a sua formação, entre eles, o radical superóxido, que está envolvido na formação de outras espécies reativas, que por sua vez, são causadores de lesões às biomoléculas (DERIN et al., 2004; GULCIN, 2006). Esse potencial antioxidante também pode estar relacionado

pelo aumento da atividade de enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes, como a GPx, por exemplo (AUGUSTYNIAK; SKRZYDLEWSKA, 2009; SOLARSKA et al., 2010).

Na primeira etapa deste trabalho foi verificado que pacientes afetados pela AG1 são deficientes em carnitina, em conformidade com que é descrito na literatura (KÖLKER et al., 2000; SCRIVER et al., 2001). Nesses pacientes, a L-car é utilizada para corrigir a deficiência secundária causada pela depleção dos níveis dessa molécula que é utilizada pelo organismo no intuito de promover a remoção do glutaril-CoA e dos outros metabólitos acumulados e desempenhando, portanto, papel fundamental na detoxificação do organismo. Esse processo é mediado através da ação da enzima carnitina aciltransferase, que catalisa a formação de glutarilcarnitina e outros ésteres de carnitina, restaurando, dessa maneira, a concentração de CoA livre intramitocondrial (razão acil CoA/CoA livre mitocondrial) (NELSON; COX, 2011). As doses empregadas no tratamento dessas doenças varia entre 100 a 200 mg/kg/dia, dependendo das necessidades e estados clínicos dos pacientes. Essa deficiência encontrada nos pacientes desse estudo foi corrigida pela suplementação com L-car, na mesma dose preconizada como padrão para o tratamento (100 mg/Kg/dia) (SCRIVER et al., 2001).

Até onde vai nosso entendimento, pela primeira vez foram quantificados em modelo animal de AG1 níveis de carnitina livre e C5DC, o conjugado do ácido glutárico, principal metabólito acumulado nessa doença, com L-car. Esses dados foram mostrados no segundo capítulo do presente trabalho. De fato, assim como encontrado nos pacientes, os camundongos *Gcdh*^{-/-} se mostraram deficientes em carnitina, em relação aos animais WT. Para os animais que foram submetidos a uma sobrecarga de lisina, essa deficiência foi ainda mais grave, corrigida pelo tratamento com L-car. Além disso, os animais *Gcdh*^{-/-} apresentaram níveis elevados de C5DC em relação ao animais selvagens, em concentrações ainda mais altas no grupo onde foi administrada uma sobrecarga de lisina. Esse perfil semelhante ao encontrado nos pacientes se mostrou satisfatório e reproduziu as condições bioquímicas encontradas nos pacientes com AG1.

Nós demonstramos nesse trabalho que os pacientes com AG1 apresentaram dano a lipídios e proteínas. O dano a lipídios foi verificado através da dosagem de

isoprostanos urinários, um subproduto do metabolismo do ácido araquidônico. Os indivíduos alvo deste estudo apresentaram níveis elevados de isoprostanos comparados ao grupo de indivíduos saudáveis. O tratamento com L-car foi capaz de normalizar esses níveis indicando uma proteção do dano a lipídios. Esses resultados corroboram com dados da literatura, todos em modelo animal de AG1, onde já foi verificado que a administração aguda e crônica de AG em ratos levam a um aumento na lipoperoxidação, avaliado por TBARS e quimiluminescência, sugerindo mais uma vez que esse metabólito está envolvido no dano oxidativo (LATINI et al., 2005, 2007). Uma vez que o cérebro é um tecido particularmente suscetível ao dano lipídico devido a sua baixa defesa antioxidante e o alto consumo de oxigênio que esse órgão demanda, salienta-se a importância de estudos com lipoperoxidação em doenças como a AG1, onde há grande envolvimento cerebral. De forma pioneira na literatura demonstramos que a L-car desempenhou um importante efeito protetor contra o dano a lipídios uma vez que o tratamento foi capaz de reduzir os níveis dos marcadores testados.

No que diz respeito ao dano a proteínas, foi verificado nos pacientes um aumento nas concentrações urinárias de di-tirosina (Di-tyr), uma molécula formada a partir da oxidação de resíduos de tirosina adjacentes de proteínas, levando à formação de uma ligação inter-fenólica altamente estável que sofre mais metabolismo (KIRSCHBAUM, 2002). Nós observamos que os pacientes no momento do diagnóstico, quando ainda não faziam tratamento com carnitina, apresentaram um aumento significativo nos níveis de Di-tyr. A oxidação de proteínas por espécies reativas pode levar as enzimas, os receptores e as proteínas de transporte ao mau funcionamento e, eventualmente, a induzir a alteração do metabolismo celular (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007).

Além de ter sido relatado periféricamente em pacientes, o dano à essas biomoléculas foi também avaliado no modelo animal de AG1. No segundo capítulo do nosso trabalho, nós avaliamos o dano a proteínas no estriado dos animais através da dosagem de sulfidrilas e carbonilas, que reflete a oxidação reversível causada por espécies reativas em proteínas que contém um aminoácido com grupamento tiol ou das reações secundárias que levam à carbonilação de proteínas, respectivamente. Já a lipoperoxidação pode ser danosa à membranas celulares, por exemplo, e foi

avaliada no estriado dos camundongos nocautes em nosso trabalho através da dosagem de TBARS, mostrando-se aumentada. Tudo isso acarreta perda de função e, muitas vezes, morte celular. Corroborando com dados da literatura e, principalmente, com nossos achados em pacientes, os animais *Gcdh*^{-/-} apresentaram maior dano à essas biomoléculas que os camundongos WT. Na mesma lógica, no grupo de camundongos onde houve sobrecarga de lisina os níveis de dano foram superiores. Porém, os animais que receberam tratamento com L-car, em dose que mimetiza a dose em humanos, em intervalos de tempo programados, tiveram esses danos no estriado atenuados.

Sabe-se que o dano oxidativo a proteínas está presente em outros EIM. Na DXB, acidemias MMA e PPA, 3HMG e L-HG, o dano a essa biomolécula já foi descrito em pacientes inclusive pela quantificação de elevadas concentrações de Di-tyr, além de alterações em biomarcadores como proteínas carboniladas e conteúdo de sulfridrilas (DEON et al., 2015a; GUERREIRO et al., 2015b; MESCKA et al., 2013b; RIBAS et al., 2010a; SITTA et al., 2009).

Seminotti et al 2013 verificaram que camundongos nocaute submetidos a uma sobrecarga de lisina apresentaram aumento nos níveis de MDA e TBARS, em diferentes tecidos desses animais (SEMINOTTI et al., 2013). Diminuição no conteúdo de sulfidrilas também foi previamente avaliado. Esse aumento foi atribuído ao aumento na produção de AG e 3-HG causado pela sobrecarga de lisina na dieta. Estudos recentes em cérebro de camundongos demonstraram que os ácidos AG e 3-HG foram capazes de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio, além de reduzir as defesas antioxidantes, como os níveis de glutathione e a atividade das enzimas antioxidantes (DE OLIVEIRA MARQUES et al., 2003; FERREIRA et al., 2007; FIGHERA et al., 2006; LATINI et al., 2007; MAGNI et al., 2009).

Quando ERO danificam uma biomolécula, a homeostase e funções normais de uma célula podem sofrer alterações (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007). A literatura mostra que os ácidos orgânicos acumulados na AG1 podem ser capazes de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio e reduzir as defesas antioxidantes, como os níveis de glutathione, e causar alterações na atividade das enzimas antioxidantes. A sobrecarga de lisina na dieta, aliás, já foi verificada como determinante nesses processos, dando ainda mais força para essa teoria (OLIVERA-BRAVO et al., 2018).

De posse desses dados, nós propusemos avaliar em estriado cerebral de camundongos *Gcdh*^{-/-} níveis de DCFH, como indicador da formação de espécies reativas e avaliar as defesas antioxidantes enzimáticas, através da quantificação de SOD e GPx. De fato, camundongos *Gcdh*^{-/-} possuem níveis de DCFH aumentados neste tecido cerebral em relação aos animais normais, sendo isso exacerbado pelo alto consumo de lisina proveniente de suas dietas especiais. O mesmo ocorreu quando foram quantificadas os níveis estriatais das enzimas. Essas defesas antioxidantes enzimáticas possuem diferentes mecanismos para detoxificar e proteger a célula diante de um desequilíbrio na homeostase, uma função normal dos organismos vivos. Todavia, alterações mais danosas, que podem levar a danos irreversíveis causam uma alteração na sua atividade ainda maior. Supondo que um aumento nos níveis de DCFH levam a célula a um desequilíbrio na homeostase redox, caracterizado pelo aumento de ERO, é justificável que isso seja acompanhado de uma alteração na atividade das enzimas antioxidantes como nossos resultados demonstram. Em tempo, a L-car demonstrou novamente efeitos benéficos no estriado cerebral dos animais pois o grupo que foi tratado com essa substância apresentou valores menores para a formação de espécies reativas e uma menor atividade enzimática.

Em relação às defesas antioxidantes, nossos dados demonstram que os pacientes com AG1 apresentaram uma capacidade antioxidante urinária reduzida no momento do diagnóstico e que o tratamento com L-car foi capaz de melhorar seu *status* antioxidante. Uma vez que a capacidade antioxidante alterada reflete uma possível alteração na quantidade de antioxidantes nos tecidos e fluidos biológicos e a capacidade de reação contra os radicais livres, presume-se que os pacientes afetados pela AG1 apresentam no diagnóstico propensão a danos oxidativos.

Uma vez que a carnitina tem importantes propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, aliado ao fato de que a suplementação dietética com L-car ajudou a diminuir o estresse oxidativo em pacientes afetados por PKU, DXB, MMA e PPA (MESCKA et al., 2015b; RIBAS; VARGAS; WAJNER, 2014; SITTA et al., 2009), é plausível afirmar que esse composto possa prevenir ou atenuar totalmente o dano oxidativo e a redução das defesas antioxidantes encontradas em pacientes na primeira etapa do nosso trabalho. Neste contexto, verificamos que as concentrações

de L-car foram positivamente correlacionadas com a capacidade antioxidante (defesas antioxidantes) e negativamente com os isoprostanos urinários (lipoperoxidação), destacando o papel desta molécula como antioxidante. Associado a extrema importância dessa molécula em processos bioenergéticos, muito foco tem sido dado aos possíveis efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da L-car, para diferentes doenças. É importante ressaltar que sua importância para doenças que afetam principalmente o sistema nervoso central. Em vista disso, Mescka et al 2016 quantificaram os níveis de carnitina no tecido cerebral em modelo animal para DXB, demonstrando que essa molécula tem potencial para atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (MESCKA et al., 2016a) e conferir proteção antioxidante a nível central.

O aumento do dano de lipídios, proteínas e DNA e a redução das defesas antioxidantes em pacientes com AG1 podem ser atribuídos ao aumento da geração de espécies reativas nesses pacientes. Além das ERO, ERN também podem ser danosas às biomoléculas (HALLIWELL, 2001). O NO^- , por exemplo, apesar de possuir funções importantes no organismo como segundo mensageiro em algumas vias de sinalização, quando em contato com O_2^- , pode gerar ONOO^- , que, por sua vez, é altamente reativo e pode levar a nitrosilação de aminoácidos e perda de função e atividade de proteínas e enzimas (HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007). Nesse sentido, observamos que os pacientes envolvidos neste estudo apresentaram níveis elevados de ERN no diagnóstico que foram diminuídas pelo tratamento com L-car. Isso, possivelmente, pode ser explicado pelo fato de que a L-car possui propriedades antinitrativas, evitando a nitração causadas pelo ONOO^- em resíduos de tirosina de proteínas (KOLODZIEJCZYK; SALUK-JUSZCZAK; WACHOWICZ, 2011). Isso está de acordo com um estudo recente que demonstra o dano lipídico no modelo nocaute de AG1, que foi atribuído à formação de ERN, uma vez que o inibidor de NOS do éster metílico de L-nitro-L-arginina inibiu esse processo (COLÍN-GONZALES et al., 2015).

Dentre todos os danos que os radicais livres podem causar às biomoléculas, o dano oxidativo ao DNA pode ser considerado o mais grave, uma vez que essa biomolécula está continuamente exposta a agente nocivos (FONTES et al., 2015). Essas lesões podem levar a mutações genéticas, alterações na expressão gênica, aberrações cromossômicas, neoplasias, perda de função e, por fim, morte celular

(HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007). Como proteção, as células possuem mecanismos de reparo para corrigir esses erros, prevenindo o aumento de mutações em organismos vivos, preservando e mantendo o genoma estabilizado. Lesões em ácidos nucleicos causados por espécies reativas tem sido descritas em um grande número de patologias, como o câncer e doenças neurodegenerativas (ALBERTS et al., 2002; BIANCINI et al., 2015, 2017; SHI et al., 2012; VALAVANIDIS; VLACHOGIANNI; FIOTAKIS, 2009; ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2003).

Para avaliar o dano ao DNA, muitas metodologias têm sido padronizadas, como as técnicas de micronúcleo e ensaio cometa, amplamente utilizadas na genética médica, toxicologia ocupacional e ambiental, avaliando os potenciais genotóxicos de substâncias, entre outros (COLLINS, 2014; DA COSTA E SILVA et al., 2018; TICE et al., 2000). O ensaio cometa é uma técnica de baixo custo, utilizada tanto para estudos *in vivo* quanto *in vitro*, que apresenta as vantagens de ser rápida e bastante sensível, com resultados reprodutíveis e serve tanto para quantificar lesões como detectar os efeitos do reparo ao DNA (SINGH et al., 1988).

Recentemente, foi visto que o ácido L-2-hidroxi-glutárico, metabólito que está acumulado na acidemia L-2-HG, induziu o dano ao DNA *in vitro*. A hipótese de dano oxidativo foi confirmada pelo aumento nas concentrações dos biomarcadores de dano a ácidos nucleicos na urina de pacientes acometidos por esta doença (RODRIGUES et al., 2017). De fato, o dano ao DNA em doenças metabólicas é um dado bem descrito na literatura. Na PKU e na DXB, a fenilalanina (Phe) e a leucina, respectivamente, induziram o dano ao DNA *in vitro*. O mesmo foi visto *in vivo*, ao testar pacientes com essas aminoacidopatias. O dano ao DNA também já foi descrito em duas das mais frequentes acidemias orgânicas, a PPA e MMA. Em todas essas doenças, a L-car foi capaz de atenuar o dano ao DNA tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DEON et al., 2015b; MESCKA et al., 2014, 2015b; RIBAS et al., 2010b).

Em nosso estudo, o dano aos ácidos nucleicos foi avaliado *in vivo*, através da dosagem de espécies urinárias de guaninas oxidadas (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, 8-hidroxi-guanosina e 8-hidroxi-guanina, que representam dano ao DNA, RNA e de ambos, respectivamente) em pacientes com AG1, que apresentaram níveis aumentados desse marcador em relação ao grupo controle. Essas espécies são subprodutos resultantes do ataque de ERO aos ácidos nucleicos, especialmente o

radical hidroxila, ao DNA nuclear e mitocondrial, que são liberadas na urina (COOKE; OLINSKI; EVANS, 2006; HALLIWELL; GUTERRIDGE, 2007). A L-car foi capaz de reduzir esses níveis naqueles pacientes que estavam sendo suplementados em comparação aos pacientes no momento do diagnóstico. O aumento nesse biomarcador demonstra que o dano ao DNA encontrado nos pacientes é oriundo de um mecanismo oxidativo (SHI et al., 2012; VALAVANIDIS; VLACHOGIANNI; FIOTAKIS, 2009).

No intuito de melhor entender o papel da L-car nesses processos e confirmar se o dano ao DNA é de fato causado diretamente pelo AG, propusemos um estudo *in vitro*, utilizando a metodologia do ensaio cometa, tendo como referências estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa em diferentes EIM (RIBAS et al., 2010b; RODRIGUES et al., 2017). Leucócitos de indivíduos saudáveis foram incubados com três concentrações diferentes de AG (0,5, 3 ou 6 mM). Essas concentrações foram baseadas nas dosagens desse metabólito no cérebro de camundongos, descritas na literatura (FUNK et al., 2005; KÖLKER et al., 2004). Após a incubação e fixação em lâmina, esses leucócitos são submetidos a eletroforese. A migração dos núcleos de DNA lesionados (segmentos de DNA livre), para fora da célula formam a imagem da cauda de um cometa, por isso o nome desse ensaio. Ao todo são contadas 100 células e cada célula possui um escore de dano que varia de 0 (nenhum dano) até 4 (dano máximo), de acordo com o tamanho da cauda. Os resultados são expressos por índice de dano (ID), que varia de 0 a 400. O AG causou aumento do ID em leucócitos em todas as concentrações testadas, comparados com o grupo controle, de uma maneira dose-dependente. Posteriormente, nós testamos o efeito da L-car sobre o dano ao DNA *in vitro*, utilizando três diferentes concentrações (30, 90 e 150 μ M), que foram co-incubadas com cada concentração de AG. Também de uma maneira dose-dependente, a L-car foi capaz de atenuar o dano causado pelo metabólito em todas as concentrações testadas. A concentração de 150 μ M foi a que melhor atenuou o dano. É importante salientar que mesmo na concentração de 30 μ M, encontrada em pacientes no diagnóstico e 90 μ M, valores apresentados por pacientes em tratamento com 100 mg/Kg/dia de L-car (RIBAS; VARGAS; WAJNER, 2014), o ID encontrado foi menor comparado com o dano encontrado incubando apenas o AG.

Ainda no primeiro capítulo, foi descrita a avaliação do perfil inflamatório dos pacientes portadores de AG1. A inflamação nesta doença, assim como em outras doenças metabólicas é um processo chave que deve ser monitorado em pacientes acometidos por essas desordens uma vez que esses processos podem desencadear uma crise metabólica e aparecimento dos principais sintomas e sequelas deixadas pela doença (SCRIVER et al., 2001). Nesse sentido, nós observamos que os pacientes com AG1 apresentaram um aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, GM-CSF e TNF- α no plasma, em relação ao grupo controle, indicando um estado pró-inflamatório nestes indivíduos. Esses dados ainda não havia sido avaliados em pacientes com AG1. Nossas descobertas em pacientes concordam com dados obtidos em modelos animais que mostram inflamação e estresse oxidativo no modelo genético de AG1, em ratos (RODRIGUES et al., 2013, 2015, 2016).

Neste contexto, enfatiza-se que as citocinas pró-inflamatórias aumentadas podem estar relacionadas a uma produção excessiva de espécies reativas, contribuindo para a inflamação (LUGRIN et al., 2014). Além disso, o factor de transcrição kappa (NF κ B) pode ser ativado pelo TNF- α , resultando em aumento da produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas células e, conseqüentemente, ERN, principalmente o ONOO⁻, que, por sua vez, pode levar ao estresse nitrosativo e danos às biomoléculas (HEMMENS; MAYER, 1998; ROSALES-CORRAL et al., 2010). Por outro lado, a expressão de IL-8 é estimulada por diferentes fatores, incluindo a produção de espécies reativas e os fatores pró-inflamatórios TNF- α e IL-1 β . A IL-6 é um mediador da inflamação da fase aguda produzida pelas células T e B e o GM-CSF é uma das citocinas que estimulam a hematopoiese e promove a maturação das células da medula óssea em células dendríticas e monócitos (GALIC; RIAZI; PITTMAN, 2012; TAYAL; KALRA, 2008; ZEINALI; ABDOLRAHIM; HOSSEINZADEH, 2017).

Durante processos inflamatórios, que são desencadeados após infecção ou agressão aos tecidos, as espécies reativas tem sua produção aumentada como forma de iniciar ou dar continuidade ao processo (BRUNE et al., 2013; LUGRIN et al., 2014; MURIACH et al., 2014). O radical superóxido e o peróxido de hidrogênio podem exercer função bactericida e de erradicação de patógenos, por exemplo. O aumento de radicais livres pode levar ao estresse oxidativo, quando os mecanismos

antioxidantes não são suficientes ou capazes de conter essa demanda. Esse estado pode levar há alterações em vias de sinalização e potencializar a resposta inflamatória, elevando níveis de prostaglandinas, tromboxanos, moléculas de adesão, leucotrienos, interleucinas, entre outros (JANMEY et al., 2013). Cabe salientar que o aparecimento da sintomas da doença surgem após crises encefalopáticas desencadeadas por, entre outros fatores, inflamação. O resultado disso é uma crise metabólica com aumento significativo e acúmulo dos metabólitos envolvidos nessa acidemia, principalmente o AG.

Até o momento não existem na literatura estudos em pacientes acometidos por AG1 relacionados com estresse oxidativo e inflamação. O que se tem descrito a respeito disso foi realizado em modelo animal da doença (RODRIGUES et al., 2013, 2016). Todavia, mesmo em animais não existem estudos focando o estresse oxidativo no estriado e o tratamento com L-car.

Complementando esse estudo, no terceiro capítulo desta tese foi realizada a quantificação de marcadores de neurodegeneração em plasma de pacientes afetados pela AG-I e tratados com L-car. Nossos resultados evidenciaram um aumento significativo nas concentrações de BDNF e diferenças significativas não foram encontradas para NCAM E PDGF-AA entre o grupo de pacientes e controles. O BDNF tem papel fundamental na proliferação e manutenção de neurônios sensoriais e colinérgicos, gânglios da retina, neurônios motores espinhais e também alguns neurônios dopaminérgicos. De fato, dentro da família das neutrofinas, proteínas responsáveis pela maturação e sobrevivência dos neurônios, o BDNF é o mais abundante e extensivamente distribuído no tecido cerebral, sendo, desta forma, fundamental no desempenho de vários processos fisiológicos, incluindo plasticidade sináptica, sinaptogênese, aprendizado e memória (KOJIMA; MIZUI, 2017; RAHMANI et al., 2019). Ainda assim, aumento nos níveis de BDNF tem sido relatado em algumas patologias cerebrais e pouco se sabe sobre o seu papel na fisiopatologia de doenças neurometabólicas. Recentemente, Martínez-Levy e colaboradores descreveram uma elevação de BDNF no córtex de pacientes com epilepsia do lobo temporal, retirados após cirurgia de ressecção cerebral. O aumento nos níveis BDNF nesses pacientes foi relacionado à alta demanda de reajustes na plasticidade necessários para tentar recuperar o tecido do dano causado pelas convulsões (MARTINEZ-LEVY et al., 2018).

Esse resultado nos instiga a pensar mais a fundo a respeito do papel da BDNF na AG1, uma vez que convulsões e defeitos motores são achados clínicos frequentes da doença (KÖLKER et al., 2004). Já Pereira e colaboradores descreveram um aumento nos níveis desse marcador no hipocampo de animais em modelo de hipóxia-isquemia, concluindo que tanto isquemia cerebral focal e/ou global levam à uma regulação positiva da expressão de BDNF (PEREIRA et al., 2009).

Ainda, foi encontrado um aumento de catepsina-D, além de uma forte correlação positiva dessa última com C5DC, metabólito resultante da conjugação do AG (principal metabólito acumulado na AG1 e responsável pelo grande dano cerebral envolvido nessa doença) com a carnitina. As catepsinas representam a maioria das proteases presentes na matriz intracelular dos lisossomos e subdivididas em diversas famílias com diferentes funções e distribuição entre os tecidos (EGBERTS et al., 2004; HEINRICH et al., 2004). A catepsina-D, entre outras funções parece ter importante papel no catabolismo intracelular lisossomal, desenvolvendo seu papel como regulador em processos de apoptose e ativação das caspase 9 e 3 e indução de processos inflamatórios (e, conseqüentemente, estresse oxidativo) e neurotoxicidade (EMERT-SEDLAK et al., 2005). Recentemente, Scaini e colaboradores verificaram um aumento nos níveis dessa protease em pacientes acometidos por DXB, um EIM que também cursa com importante dano neurológico e deficiências cognitivas nos indivíduos afetados. O provável mecanismo envolvido nessas doenças, ainda que precocemente, pode estar relacionado com o fato de que altos níveis de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo são capazes de desencadear processos de apoptose, mediado pela protease catepsina-D (SCAINI et al., 2017). Cabe salientar que no primeiro capítulo desta tese, foi demonstrado que pacientes AG1 apresentam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, o que reforça a hipótese desse mecanismo. Os níveis plasmáticos dessa protease foram positivamente correlacionados com níveis sanguíneos de C5DC, demonstrando, mais uma vez, que o AG (medido indiretamente através do seu conjugado com carnitina) exerce papel fundamental no dano neurológico e, principalmente, dano estriatal agudo apresentado por pacientes afetados pela AG1.

Dessa forma, uma sequência nos trabalhos envolvendo marcadores de neurodegeneração na AG1 deve ser continuada, a fim de fechar as lacunas e entender

melhor o papel de cada marcador na doença, assim como entender os mecanismos pelos quais a degeneração do tecido cerebral, principalmente do estriado, ocorrem. No futuro, obtendo amostras do grupo diagnóstico, será possível ter uma visão melhor do que acontece com cada marcador na doença, comparando a efetividade do tratamento com L-car e, também, o envolvimento destes marcadores na fisiopatologia da AG1 em pacientes que ainda não iniciaram o tratamento com L-car.

Neste trabalho, nós fornecemos resultados sólidos e inovadores, demonstrando que um estado pró-oxidante e pró-inflamatório está envolvido na fisiopatologia da AG1 e que a L-car tem um papel protetor muito eficaz no tratamento dessa doença. Portanto, nossos dados sustentam a visão de que a suplementação com L-car é útil não apenas por ajudar na excreção dos metabólitos tóxicos e restaurar a deficiência secundária deste composto, mas também pelos benefícios antioxidantes e anti-inflamatórios a ela atribuídos, os quais possam ter um papel importante na proteção da neurodegeneração nesta doença.

6. CONCLUSÕES

6.1 Capítulo 1

- Pacientes portadores de AG1 apresentaram deficiência de carnitina no momento do diagnóstico. A suplementação com L-car foi capaz de reverter essa deficiência.
- Foi encontrado um aumento nos níveis de isoprostanos urinários em pacientes AG1 no momento do diagnóstico. Esses dados sugerem que o dano oxidativo a lipídios está presente nessa doença.
- Foi evidenciado dano a proteínas pelo aumento de di-tirosina na urina.
- O dano oxidativo ao DNA está presente na AG1 uma vez que foram encontrados elevados níveis de espécies oxidadas de guaninas na urina nos pacientes recém diagnosticados.
- O AG foi capaz de induzir o dano ao DNA *in vitro* avaliado pelo ensaio cometa em três concentrações diferentes.
- Pacientes AG1 no momento do diagnóstico apresentaram baixa capacidade antioxidante.
- O estresse nitrosativo parece, também, estar envolvido na doença, uma vez que pacientes no diagnóstico de AG1 apresentaram elevadas concentrações de ERN.
- A L-car demonstrou importantes efeitos benéficos uma vez que reduziu os níveis de isoprostanos, di-tirosina, ERN e metabólitos do dano oxidativo ao DNA na urina de pacientes AG1 em tratamento, bem como demonstrou ser capaz de prevenir o dano ao DNA *in vitro*.
- O tratamento com L-car, além de corrigir a deficiência de carnitina nos pacientes, melhora a capacidade antioxidante dos mesmos.
- Foi encontrado correlação negativa entre L-car e os níveis de isoprostanos urinários e positiva entre L-car e capacidade antioxidante, evidenciando o papel antioxidante da L-car.

- Pacientes AG1 desse estudo apresentaram um estado pró-inflamatório, evidenciado pelo aumento dos níveis das interleucinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, GM-CSF e TNF- α .

6.2 Capítulo 2

- Camundongos *Gcdh*^{-/-}, assim como pacientes portadores de AG1, apresentaram uma deficiência em carnitina, que foi corrigida pela suplementação com L-car.

- Camundongos *Gcdh*^{-/-} apresentaram elevadas concentrações de C5DC no sangue. Essas concentrações foram diminuídas com o tratamento com carnitina.

- Camundongos *Gcdh*^{-/-} apresentaram elevadas concentrações de ERO no estriado comparado às concentrações encontradas nos animais selvagens. O tratamento com carnitina foi capaz de diminuir essas concentrações.

- Foi encontrado um aumento nos biomarcadores de lipoperoxidação e dano à proteínas no estriado dos animais *Gcdh*^{-/-} comparados aos animais selvagens. A L-car demonstrou efeitos benéficos frente a esses danos.

- As enzimas antioxidantes SOD e GPx estavam alteradas nos camundongos *Gcdh*^{-/-} em relação aos animais WT. Da mesma forma, importantes efeitos da L-car foram demonstrados frente à essas alterações.

- DCFH foi positivamente correlacionada com TBARS e negativamente correlacionada com o conteúdo de sulfidrilas e carnitina livre, indicando o efeito antioxidante da L-car.

- Carnitina livre foi negativamente correlacionada com C5DC em camundongos *Gcdh*^{-/-}.

6.3 Capítulo 3

- BDNF e catepsina-D estão significativamente aumentadas em plasma de pacientes afetados pela AG-I em relação ao grupo controle.

- C5DC está significativamente aumentada nos pacientes em relação aos indivíduos saudáveis

- Catepsina-D está positivamente correlacionada com níveis de C5DC.

Conclusão Final:

Os dados apresentados nesta tese sugerem que o estresse oxidativo e inflamação estão envolvidos na fisiopatologia da AG1, ocorrendo a nível central e periférico, e que o aumento na concentração dos metabólitos tóxicos pode levar a uma maior produção de radicais livres, acarretando danos às biomoléculas induzido pelo ácido glutárico e, provavelmente, levando a neurodegeneração.

A L-car demonstrou, de acordo com os achados aqui apresentados, efeito protetor tanto em pacientes quanto em estriado de camundongos *Gcdh*^{-/-}. Esses resultados representam uma nova abordagem na terapia da AG1 com L-car, evidenciando que ela pode não apenas ser útil na excreção dos metabólitos tóxicos acumulados e na correção da deficiência de carnitina, mas também em uma abordagem baseada nos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Para tanto, esses resultados ainda devem ser analisados criteriosamente e deve ser dado continuidade nos estudos em outros tecidos cerebrais de animais, principal órgão afetado nessa doença. Assim, será possível um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no dano cerebral e o papel da L-car no tratamento dessa doença, contribuindo para que no futuro pacientes afetados pela AG1 tenham uma perspectiva de melhora clínica e ganhos em qualidade de vida.

7. REFERÊNCIAS

AFROZE, Bushra; YUNUS, Zabedah Mohammad. Glutaric aciduria type 1--importance of early diagnosis and treatment. **JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association**, Pakistan, v. 64, n. 5, p. 593–595, 2014.

AKSENOV, Michael Y.; MARKESBERY, William R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 302, n. 2, p. 141–145, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394001016366>>

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.

AMARAL, Alexandre Umpierrez et al. Reduction of Na⁺, K⁺-ATPase activity and expression in cerebral cortex of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: A possible mechanism for brain injury in glutaric aciduria type I. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 107, n. 3, p. 375–382, 2012. a.

AMARAL, Alexandre Umpierrez et al. Marked reduction of Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-ATPase and creatine kinase activities induced by acute lysine administration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice. **Molecular genetics and metabolism**, United States, v. 107, n. 1–2, p. 81–86, 2012. b.

AMARAL, Alexandre Umpierrez et al. Experimental evidence that bioenergetics disruption is not mainly involved in the brain injury of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice submitted to lysine overload. **Brain research**, Netherlands, v. 1620, p. 116–129, 2015.

AUGUSTYNIAK, Agnieszka; SKRZYDLEWSKA, Elzbieta. L-Carnitine in the lipid and protein protection against ethanol-induced oxidative stress. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, United States, v. 43, n. 3, p. 217–223, 2009.

BAHL, J.; BRESSLER, Joseph. The pharmacology of carnitine. **Pharmacology**, [s. l.], v. 337, n. Suppl. 12, p. 118–284, 1989.

BARADARAN, M.; GALEHDARI, H.; AMINZADEH, M. Molecular Determination of Glutaric Aciduria Type I in Individuals from Southwest Iran. **Arch Iran Med**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 629–632, 2014.

BARIC, Ivo et al. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I. **J Inherit Metab Dis**, [s. l.], n. 21, p. 326–340, 1998.

BARIC, Ivo; FUMIC, K.; HOFFMANN, Georg F. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. **Croat Med J**, [s. l.], v. 42, p. 379–383, 2001.

BEN-MENACHEM, E.; KYLLERMAN, M.; MARKLUND, S. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. **Epilepsy research**, Netherlands, v. 40, n. 1, p. 33–39, 2000.

BERGMAN, I. et al. Acute profound dystonia in infants with glutaric acidemia. **Pediatrics**, United States, v. 83, n. 2, p. 228–234, 1989.

BIANCINI, Giovana et al. Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis DNA damage in Fabry patients: An investigation of oxidative damage and repair. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s. l.], v. 784–785, p. 31–36, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.04.012>>

BIANCINI, Giovana Brondani et al. Globotriaosylsphingosine induces oxidative DNA damage in cultured kidney cells. [s. l.], v. 22, p. 490–493, 2017.

BIERER, L. M. et al. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. **Journal of neurochemistry**, England, v. 64, n. 2, p. 749–760, 1995.

BINIENDA, Z. K.; ALI, S. F. Neuroprotective role of L-carnitine in the 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity. **Toxicology letters**, Netherlands, v. 125, n. 1–3, p. 67–73, 2001.

BOURDON, E.; BLACHE, D. The importance of proteins in defense against oxidation. **Antioxidants & redox signaling**, United States, v. 3, n. 2, p. 293–311, 2001.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **The Biochemical journal**, England, v. 134, n. 3, p. 707–716, 1973.

BOY, Nikolas et al. Newborn screening: A disease-changing intervention for glutaric aciduria type 1. **Annals of neurology**, United States, v. 83, n. 5, p. 970–979, 2018.

BRISMAR, J.; OZAND, P. T. CT and MR of the brain in glutaric acidemia type I: A review of 59 published cases and a report of 5 new patients. **American Journal of Neuroradiology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 675–683, 1995.

BRUNE, Bernhard et al. Redox control of inflammation in macrophages. **Antioxidants & redox signaling**, United States, v. 19, n. 6, p. 595–637, 2013.

BRUNO, Martin A. et al. Amyloid beta-induced nerve growth factor dysmetabolism in Alzheimer disease. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, England, v. 68, n. 8, p. 857–869, 2009.

BURLINA, A. P. et al. Management of movement disorders in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: Anticholinergic drugs and botulinum toxin as additional therapeutic options. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 911–915, 2004.

BURTON B. Inborn errors of metabolism in infancy: a guide to diagnosis. **Pediatrics**, [s. l.], p. 102, 1998.

CHACE, D. H. et al. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. **Clin Chem**, [s. l.], v. 43, p. 2106–2113, 1997.

CHAKRABARTI, S. et al. Oxidative stress and amyloid beta toxicity in Alzheimer's disease: intervention in a complex relationship by antioxidants. **Current medicinal**

chemistry, Netherlands, v. 20, n. 37, p. 4648–4664, 2013.

CHALMERS, Ronald A.; LAWSON, A. Organic acids in man: analytical chemistry, biochemistry, and diagnosis of the organic acidurias. **Archives of disease in childhood**, England, v. 58, n. 3, p. 240, 1983.

CLARKE, JTR. **A clinical guide to inherited metabolic diseases**. Cambridge.

COLÍN-GONZALES, A. .. et al. TOXIC SYNERGISM BETWEEN QUINOLINIC ACID AND ORGANIC ACIDS ACCUMULATING IN GLUTARIC ACIDEMIA TYPE I AND IN DISORDERS OF PROPIONATE METABOLISM IN RAT BRAIN SYNAPTOSOMES : RELEVANCE FOR METABOLIC ACIDEMIAS. **Neuroscience**, [s. l.], v. 308, p. 64–74, 2015.

COLLINS, Andrew R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica et biophysica acta**, Netherlands, v. 1840, n. 2, p. 794–800, 2014.

COOKE, Marcus S.; OLINSKI, Ryszard; EVANS, Mark D. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance ? [s. l.], v. 365, p. 30–49, 2006.

COUCE, M. et al. Glutaric aciduria type I: Outcome of patients with early- versus late-diagnosis. **European Journal of Paediatric Neurology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 383–389, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090379813000068>>

COVACEUSZACH, Sonia et al. Development of a non invasive NGF-based therapy for Alzheimer's disease. **Current Alzheimer research**, United Arab Emirates, v. 6, n. 2, p. 158–170, 2009.

DA COSTA E SILVA, Liana Dantas et al. DNA damage and oxidative stress induced by seizures are decreased by anticonvulsant and neuroprotective effects of lobeline, a candidate to treat alcoholism. **Metabolic brain disease**, United States, v. 33, n. 1, p. 53–61, 2018.

DE ANDRADE, Rodrigo Binkowski et al. Evaluation of Oxidative Stress Parameters and Energy Metabolism in Cerebral Cortex of Rats Subjected to Sarcosine Administration. **Molecular neurobiology**, United States, v. 54, n. 6, p. 4496–4506, 2017.

DE CARVALHO, T. Marini et al. Newborn screening: a national public health programme in Brazil. **Journal of inherited metabolic disease**, Netherlands, v. 30, n. 4, p. 615, 2007.

DE OLIVEIRA MARQUES, Fernanda et al. Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. **Brain Research**, [s. l.], v. 964, n. 1, p. 153–158, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899302041185>>

DEON, M. et al. Urinary biomarkers of oxidative stress and plasmatic inflammatory profile in phenylketonuric treated patients. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 47, 2015. a.

DEON, Marion et al. Protective effect of L-carnitine on Phenylalanine-induced DNA damage. [s. l.], p. 925–933, 2015. b.

DEON, Marion et al. Urinary biomarkers of oxidative stress and plasmatic inflammatory profile in phenylketonuric treated patients. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, England, v. 47, n. Pt B, p. 259–265, 2015. c.

DERIN, N. et al. L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, Poland, v. 55, n. 3, p. 595–606, 2004.

DIZDAROGLU, Miral. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. **Mutation research. Reviews in mutation research**, Netherlands, v. 763, p. 212–245, 2015.

DONIDA, Bruna et al. Oxidative profile exhibited by Mucopolysaccharidosis type IVA patients at diagnosis: Increased keratan urinary levels. **Molecular genetics and metabolism reports**, United States, v. 11, p. 46–53, 2017.

DOS SANTOS MELLO, M. et al. Increased oxidative stress in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 402, n. 1–2, 2015.

EGBERTS, Friederike et al. Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. **Journal of cell science**, England, v. 117, n. Pt 11, p. 2295–2307, 2004.

EMERT-SEDLAK, Lori et al. Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome c release, caspase activation, and cell death. **Molecular cancer therapeutics**, United States, v. 4, n. 5, p. 733–742, 2005.

FAVERZANI, Jessica Lamberty et al. Oxidative Stress in Homocystinuria Due to Cystathionine ss-Synthase Deficiency: Findings in Patients and in Animal Models. **Cellular and molecular neurobiology**, United States, 2017.

FERREIRA, Gustavo C. et al. Evidence for a synergistic action of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids disturbing rat brain energy metabolism. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, England, v. 25, n. 6, p. 391–398, 2007.

FIGHERA, Michele Rechia et al. GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylentetrazole. **Neurobiology of disease**, United States, v. 22, n. 3, p. 611–623, 2006.

FONTES, Fabricia Lima et al. Role of DNA repair in host immune response and inflammation. **Mutation research. Reviews in mutation research**, Netherlands, v. 763, p. 246–257, 2015.

FUNK, Christopher B. R. et al. Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. **Brain : a journal of neurology**, England, v. 128, n. Pt 4, p. 711–722, 2005.

GALIC, Michael A.; RIAZI, Kiarash; PITTMAN, Quentin J. Cytokines and brain excitability. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 33, p. 116–125, 2012.

GOKMEN-OZEL, H. et al. Dietary practices in glutaric aciduria type 1 over 16 years.

Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association, England, v. 25, n. 6, p. 514–519, 2012.

GOODMAN, S. I. et al. Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. **The Journal of pediatrics**, United States, v. 90, n. 5, p. 746–750, 1977.

GOODMAN, S. I.; F.E., Frerman. Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2-ketoadipic acidemia and glutaric acidemia. In: **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8. ed. New York.

GUERREIRO, G. et al. Urinary biomarkers of oxidative damage in Maple syrup urine disease: The L-carnitine role. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 42, 2015. a.

GUERREIRO, Gilian et al. Urinary biomarkers of oxidative damage in Maple syrup urine disease: the L-carnitine role. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, England, v. 42, p. 10–14, 2015. b.

GUERREIRO, Gilian Batista Balbuena et al. Oxidative damage in glutaric aciduria type I patients and the protective effects of L-carnitine treatment. **J Cell Biochem**, [s. l.], p. 1–12, 2018.

GULCIN, Ilhami. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life sciences**, Netherlands, v. 78, n. 8, p. 803–811, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTERRIDGE, J. M. .. **Free Radicals in biology and medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, Barry. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, [s. l.], v. 18, p. 685–716, 2001.

HALLIWELL, Barry. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, United States, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

HARTING, Inga et al. Dynamic changes of striatal and extrastriatal abnormalities in glutaric aciduria type I. **Brain**, [s. l.], v. 132, n. 7, p. 1764–1782, 2009.

HEINRICH, M. et al. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. **Cell death and differentiation**, England, v. 11, n. 5, p. 550–563, 2004.

HEMMENS, B.; MAYER, B. Enzymology of nitric oxide synthases. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, United States, v. 100, p. 1–32, 1998.

HERINGER, Jana et al. Use of guidelines improves the neurological outcome in glutaric aciduria type i. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 68, n. 5, p. 743–752, 2010.

HOFFMANN, Georg F. et al. Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. **European journal of pediatrics**, Germany, v. 163, n. 2, p. 76–80, 2004.

HOFFMANN, Georg F.; ZSCHOCKE, Johannes. Glutaric aciduria type I: from clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy. **J Inherit Metab Dis**, [s. l.],

n. 22, p. 381–391, 1999.

HOPPEL, Charles. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, United States, v. 41, n. 4 Suppl 4, p. S4-12, 2003.

JANMEY, Paul A. et al. From tissue mechanics to transcription factors. **Differentiation; research in biological diversity**, England, v. 86, n. 3, p. 112–120, 2013.

JIMENEZ-SANCHEZ, G.; CHILDS, B.; VALLE, D. The effect of mendelian disease on human health. In: **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8. ed. New York.

KARLSSON, Markus et al. What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? **The Biochemical journal**, England, v. 428, n. 2, p. 183–190, 2010.

KIRSCHBAUM, B. Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicators. **Clinical nephrology**, Germany, v. 58, n. 5, p. 344–349, 2002.

KOELLER, David M. et al. Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. **Human molecular genetics**, England, v. 11, n. 4, p. 347–357, 2002.

KOJIMA, M.; MIZUI, T. BDNF Propeptide: A Novel Modulator of Synaptic Plasticity. **Vitamins and hormones**, United States, v. 104, p. 19–28, 2017.

KOLKER, S. et al. Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: a new pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Pediatric research**, United States, v. 47, n. 4 Pt 1, p. 495–503, 2000.

KOLKER, S. et al. Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. **Pediatric research**, United States, v. 50, n. 1, p. 76–82, 2001.

KOLKER, Stefan et al. Natural History, Outcome, and Treatment Efficacy in Children and Adults with Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficiency. **Pediatr Res**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 840–847, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1203/01.pdr.0000219387.79887.86>>

KOLKER, Stefan et al. The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype. **Journal of inherited metabolic disease**, Netherlands, v. 38, n. 6, p. 1059–1074, 2015.

KÖLKER, Stefan et al. Evaluation of trigger factors of acute encephalopathy in glutaric aciduria type I: fever and tumour necrosis factor-alpha. **J Inherit Metab Dis.**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 359–362, 2000.

KÖLKER, Stefan et al. Pathomechanisms of Neurodegeneration in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficiency. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 7–12, 2004.

KÖLKER, Stefan; HOFFMANN, G. F. Adult onset glutaric aciduria type I presenting with a leukoencephalopathy. **Neurology**, Netherlands, v. 60, n. 8, p. 1399, 2003.

KOŁODZIEJCZYK, Joanna; SALUK-JUSZCZAK, Joanna; WACHOWICZ, Barbara. L - carnitine protects plasma components against oxidative alterations. **Nutrition**, [s. l.],

v. 27, n. 6, p. 693–699, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2010.06.009>>

KULKENS, S. et al. Late-onset neurologic disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Neurology**, [s. l.], v. 64, p. 2142–2144, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1212/01.WNL.0000167428.12417.B2>>

LATINI, A. et al. Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 57–67, 2005.

LATINI, Alexandra et al. Induction of Oxidative Stress by Chronic and Acute Glutaric Acid Administration to Rats. [s. l.], v. 27, n. 4, p. 423–438, 2007.

LEÃO, Letícia Lima; JOSÉ, Marcos; AGUIAR, Burle De. Newborn screening : what pediatricians should know. [s. l.], v. 84, p. 80–90, 2008.

LEIPNITZ, Guilhian et al. Quinolinic acid reduces the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 695–701, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0736574805001115>>

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, United States, v. 186, p. 464–478, 1990.

LINDNER, Martin et al. Neonatal screening for glutaric aciduria type I: Strategies to proceed. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 378–382, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10545-006-0284-1>>

LISYOVA, J. et al. GAI - distinct genotype and phenotype characteristics in reported Slovak patients. **Bratislavské lekárske listy**, Slovakia, v. 117, n. 11, p. 631–638, 2016.

LIU, Zewen et al. Review Article Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases : From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. [s. l.], v. 2017, n. Figure 1, 2017.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUGRIN, Jérôme et al. The role of oxidative stress during inflammatory processes. [s. l.], v. 395, n. 2, p. 203–230, 2014.

MAGNI, D. V. et al. Kinetic characterization of I-[(3)H]glutamate uptake inhibition and increase oxidative damage induced by glutaric acid in striatal synaptosomes of rats. **Int J Dev Neurosci**, [s. l.], v. 27, p. 65–72, 2009.

MARCHETTI, Desirée Padilha et al. Inflammatory profile in X-linked adrenoleukodystrophy patients : Understanding disease progression. [s. l.], n. July, p. 1–11, 2017.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, England, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MARTINEZ-LEVY, G. A. et al. Increased Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Transcripts I and VI, cAMP Response Element Binding, and Glucocorticoid Receptor in the Cortex of Patients with Temporal Lobe Epilepsy. **Molecular**

- neurobiology**, United States, v. 55, n. 5, p. 3698–3708, 2018.
- MATES, J. M.; SANCHEZ-JIMENEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, United States, v. 4, p. D339-45, 1999.
- MAXWELL, S. R. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs**, New Zealand, v. 49, n. 3, p. 345–361, 1995.
- MESCKA, C. P. et al. Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: L-carnitine effect. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 31, n. 1, 2013. a.
- MESCKA, C. P. et al. L-Carnitine supplementation decreases DNA damage in treated MSUD patients. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s. l.], v. 775, 2015. a.
- MESCKA, C. P. et al. L-carnitine Prevents Oxidative Stress in the Brains of Rats Subjected to a Chemically Induced Chronic Model of MSUD. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 53, n. 9, 2016. a.
- MESCKA, Caroline Paula et al. Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: l-carnitine effect. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, England, v. 31, n. 1, p. 21–24, 2013. b.
- MESCKA, Caroline Paula et al. Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro. **Gene**, Netherlands, v. 548, n. 2, p. 294–298, 2014.
- MESCKA, Caroline Paula et al. L-Carnitine supplementation decreases DNA damage in treated MSUD patients. **Mutation research**, Netherlands, v. 775, p. 43–47, 2015. b.
- MESCKA, Caroline Paula et al. Investigation of inflammatory profile in MSUD patients: benefit of L-carnitine supplementation. **Metabolic brain disease**, United States, v. 30, n. 5, p. 1167–1174, 2015. c.
- MESCKA, Caroline Paula et al. L-carnitine Prevents Oxidative Stress in the Brains of Rats Subjected to a Chemically Induced Chronic Model of MSUD. **Molecular neurobiology**, United States, v. 53, n. 9, p. 6007–6017, 2016. b.
- MURIACH, Maria et al. Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, United States, v. 2014, p. 102158, 2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre.
- NUNES, J. et al. Brain MRI findings as an important diagnostic clue in glutaric aciduria type 1. **The neuroradiology journal**, United States, v. 26, n. 2, p. 155–161, 2013.
- NYHAN, W. L.; BARSHOP, B. A.; OZAND, P. T. **Atlas of Metabolic Diseases**. 2. ed. London.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, United States, v. 95, n. 2, p.

351–358, 1979.

OLIVERA-BRAVO, Silvia et al. Long Lasting High Lysine Diet Aggravates White Matter Injury in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient (Gcdh^{-/-}) Mice. **Molecular neurobiology**, United States, 2018.

OLIVERA-BRAVO, Silvia et al. Long Lasting High Lysine Diet Aggravates White Matter Injury in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient (Gcdh^{-/-}) Mice. **Molecular neurobiology**, United States, v. 56, n. 1, p. 648–657, 2019.

PEREIRA, Lenir Orlandi et al. Long-term effects of environmental stimulation following hypoxia-ischemia on the oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus and frontal cortex. **Brain research**, Netherlands, v. 1247, p. 188–195, 2009.

PETROU, Athinoula L.; TERZIDAKI, Athina. A meta-analysis and review examining a possible role for oxidative stress and singlet oxygen in diverse diseases. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 474, n. 16, p. 2713 LP-2731, 2017. Disponível em: <<http://www.biochemj.org/content/474/16/2713.abstract>>

PFEIL, Johannes et al. Newborn screening by tandem mass spectrometry for glutaric aciduria type 1: a cost-effectiveness analysis. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–11, 2013.

RAHMANI, Farzaneh et al. Plasma levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. **Brain research**, Netherlands, v. 1704, p. 127–136, 2019.

RANG, HP; DALE, MM. **Farmacologia**. São Paulo: Elsevier B.V., 2008.

REZNICK, A. Z. et al. Antiradical effects in L-propionyl carnitine protection of the heart against ischemia-reperfusion injury: the possible role of iron chelation. **Archives of biochemistry and biophysics**, United States, v. 296, n. 2, p. 394–401, 1992.

RIBAS, Graziela S. et al. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, England, v. 28, n. 2, p. 127–132, 2010. a.

RIBAS, Graziela S. et al. Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. **Mutation research**, Netherlands, v. 702, n. 1, p. 123–128, 2010. b.

RIBAS, Graziela S.; VARGAS, Carmen R.; WAJNER, Moacir. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. **Gene**, Netherlands, v. 533, n. 2, p. 469–476, 2014.

RODRIGUES, Daiane Grigolo Bardemaker et al. 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. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, England, v. 42, p. 47–53, 2017.

RODRIGUES, Fernanda S. et al. N-Acetylcysteine Prevents Spatial Memory Impairment Induced by Chronic Early Postnatal Glutaric Acid and Lipopolysaccharide

in Rat Pups. [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1–18, 2013.

RODRIGUES, Marília Danyelle Nunes et al. Experimental evidence that overexpression of NR2B glutamate receptor subunit is associated with brain vacuolation in adult glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice : A potential role for glutamatergic-induced excito. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 359, p. 133–140, 2015.

RODRIGUES, Marília Danyelle Nunes et al. Higher Vulnerability of Menadione-Exposed Cortical Astrocytes of Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient Mice to Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Cell Death: Implications for the Neurodegeneration in Glutaric Aciduria Type I. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], p. 1–11, 2016.

ROSALES-CORRAL, Sergio et al. Functional aspects of redox control during neuroinflammation. **Antioxidants & redox signaling**, United States, v. 13, n. 2, p. 193–247, 2010.

SAUDUBRAY, Jean-Marie; CHARPENTIER, C. Clinical approach to inherited metabolic diseases. In: Berlin: Springer-verlang, 1996. p. 3–46.

SCAINI, Giselli et al. Serum Markers of Neurodegeneration in Maple Syrup Urine Disease. **Molecular neurobiology**, United States, v. 54, n. 7, p. 5709–5719, 2017.

SCRIVER, C. et al. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8. ed. New York.

SEMINOTTI, Bianca et al. Induction of oxidative stress in brain of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice by acute lysine administration. **Molecular genetics and metabolism**, United States, v. 106, n. 1, p. 31–38, 2012.

SEMINOTTI, Bianca et al. Disruption of brain redox homeostasis in glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice treated with high dietary lysine supplementation. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 30–39, 2013.

SEMINOTTI, Bianca et al. Acute lysine overload provokes protein oxidative damage and reduction of antioxidant defenses in the brain of infant glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: a role for oxidative stress in GA I neuropathology. **Journal of the neurological sciences**, Netherlands, v. 344, n. 1–2, p. 105–113, 2014.

SEMINOTTI, Bianca et al. Oxidative Stress, Disrupted Energy Metabolism, and Altered Signaling Pathways in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Knockout Mice: Potential Implications of Quinolinic Acid Toxicity in the Neuropathology of Glutaric Acidemia Type I. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 53, n. 9, p. 6459–6475, 2016.

SHADMEHRI, Azam Ahmadi et al. Molecular genetic study of glutaric aciduria, type I: Identification of a novel mutation. **Journal of cellular biochemistry**, United States, 2018.

SHI, Fei et al. Oxidative damage of DNA, RNA and their metabolites in leukocytes, plasma and urine of *Macaca mulatta*: 8-oxoguanosine in urine is a useful marker for aging. **Free Radical Research**, [s. l.], v. 46, n. 9, p. 1093–1098, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2012.689428>>

SINGH, N. .. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage

- in individuals cells. **Experimental Cell Research**, [s. l.], n. 175, p. 184–191, 1988.
- SITTA, A. et al. Evidence that L -Carnitine and Selenium Supplementation Reduces Oxidative Stress in Phenylketonuric Patients. [s. l.], p. 429–436, 2011.
- SITTA, Angela et al. L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. **Cellular and molecular neurobiology**, United States, v. 29, n. 2, p. 211–218, 2009.
- SOLARSKA, Katarzyna et al. The antioxidant properties of carnitine in vitro. **Cellular & molecular biology letters**, England, v. 15, n. 1, p. 90–97, 2010.
- SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. **Mayo Clinic proceedings**, England, v. 63, n. 4, p. 390–408, 1988.
- STRAUSS, Kevin a; MORTON, D. Holmes. Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis. **American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics**, [s. l.], v. 121C, n. 1, p. 53–70, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12888986>>
- TAYAL, Vandana; KALRA, Bhupinder Singh. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics — An update. [s. l.], v. 579, p. 1–12, 2008.
- THAPA, Arjun; CARROLL, Nick J. Dietary Modulation of Oxidative Stress in Alzheimer ' s Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], p. 14–16, 2017.
- TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, United States, v. 35, n. 3, p. 206–221, 2000.
- TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **The Journal of clinical investigation**, United States, v. 108, n. 1, p. 15–23, 2001.
- TUNCEL, Ali Tunc et al. Organic acidurias in adults: late complications and management. **Journal of inherited metabolic disease**, Netherlands, v. 41, n. 5, p. 765–776, 2018.
- VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, THOMAS; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 120–139, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10590500902885684>>
- WAJNER, M. et al. Modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Journal of inherited metabolic disease**, Netherlands, v. 27, n. 6, p. 825–828, 2004.
- WAJNER, Moacir et al. Acidúrias orgânicas: diagnóstico em pacientes de alto risco no Brasil. **Jornal de Pediatria**, [s. l.], v. 77, n. 5, p. 401–406, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572001000500011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>
- WALTER, J. H. L-carnitine in inborn errors of metabolism: what is the evidence? **Journal of inherited metabolic disease**, Netherlands, v. 26, n. 2–3, p. 181–188,

2003.

WANG, Ying et al. Mitochondrial Oxidative Stress Promotes Atherosclerosis and Neutrophil Extracellular Traps in Aged Mice. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, United States, v. 37, n. 8, p. e99–e107, 2017.

WAYHS, C. A. Y. et al. Diabetic encephalopathy-related depression: Experimental evidence that insulin and clonazepam restore antioxidant status in rat brain. **Cell Biochemistry and Function**, [s. l.], v. 32, n. 8, 2014.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, United States, v. 77, p. 325–333, 1981.

WULF, D. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 82, p. 47–95, 2001.

ZAHA, A.; FERREIRA, HB; PASSAGLIA, LMP. **Biologia Molecular Básica**. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003.

ZEINALI, Majid; ABDOLRAHIM, Seyed; HOSSEINZADEH, Hossein. An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 92, p. 998–1009, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.003>>

ZINNANTI, William J. et al. A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. **Brain : a journal of neurology**, England, v. 129, n. Pt 4, p. 899–910, 2006.

8. Anexos

8.1. ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PACIENTES CONTROLE

Estamos convidando a pessoa pela qual você é responsável a participar do projeto de pesquisa intitulado “Estudo do perfil antioxidante e anti-inflamatório da L-carnitina sobre o dano oxidativo em pacientes portadores de acidemia glutárica tipo 1”. O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, formados por radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com a doença acidemia glutárica tipo 1.

Para que este estudo seja realizado, é necessária uma comparação entre um grupo de pacientes que apresentam a doença com um grupo de pacientes que não apresentam. Portanto, a pessoa pela qual você é responsável, está sendo convidada a participar deste estudo como controle, ou seja, como não portador(a) de acidemia glutárica tipo 1. Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com você (responsável legal do indivíduo) e das coletas de sangue periférico e urina. Estes dados serão coletados nos dias de exames rotineiros, não sendo necessário o comparecimento em consultas extras.

Para participar, será feita a coleta de sangue e urina, juntamente com as coletas solicitadas pelo médico rotineiramente. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue e urina são semelhantes aos da coleta para exames laboratoriais de rotina. A participação neste estudo não trará benefício direto a você ou à pessoa pela qual você é responsável, porém, os dados advindos desta doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novos tratamentos para esta doença, bem como um melhor entendimento desta doença. O material coletado será única e

exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo reservado a você o acesso às mesmas.

As informações individuais levantadas pela pesquisa são confidenciais. Os resultados obtidos serão agrupados e expressos através de resultados numéricos, sem qualquer referência a elementos que possam identificar as pessoas que participaram do estudo. Após o término do estudo os materiais biológicos (sangue periférico e urina) que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio Projeto de Pesquisa, portanto, completamente gratuitas para você. Caso você queira retirar-se em definitivo da pesquisa, terá total liberdade para fazê-lo, sem que isso prejudique futuros atendimentos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e o doutorando Gilian Batista Balbueno Guerreiro) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa, no serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: (51) 3359.8011. Ainda, para maiores informações, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 3359.7640, de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h.

Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma delas (assinada por nós) será entregue a você, responsável legal pelo participante da pesquisa, e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa.

“Pelo presente consentimento, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.”

Data:_____

Nome:_____

Nome do responsável legal:_____

Assinatura:_____

Nome do pesquisador:_____

Assinatura do pesquisador:_____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PACIENTES CONTROLE – ADULTAS

Estamos convidando você a participar, como voluntário(a), do projeto de pesquisa intitulado “Estudo do perfil antioxidante e anti-inflamatório da L-carnitina sobre o dano oxidativo em pacientes portadores de acidemia glutárica tipo 1”. O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, formados por radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com a doença acidemia glutárica tipo 1.

Para que este estudo seja realizado, é necessária uma comparação entre um grupo de pacientes que apresentam a doença com um grupo de pacientes que não apresentam. Portanto, você está sendo convidado(a) a participar deste estudo como controle, ou seja, como não portador(a) de acidemia glutárica tipo 1. Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com você e das coletas de sangue periférico e urina. Estes dados serão coletados nos dias de exames rotineiros, não sendo necessário o comparecimento em consultas extras.

Para participar, será feita a coleta de sangue e urina juntamente com as coletas solicitadas rotineiramente pelo médico. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue e urina são semelhantes aos da coleta para exames laboratoriais de rotina. A participação neste estudo não trará benefício direto a você, porém, os dados advindos desta doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novos tratamentos para esta doença, bem como um melhor entendimento desta doença. O material coletado será única e exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo reservado a você o acesso às mesmas.

As informações individuais levantadas pela pesquisa são confidenciais. Os resultados obtidos serão agrupados e expressos através de resultados numéricos, sem qualquer referência a elementos que possam identificar as pessoas que participaram do estudo. Após o término do estudo os materiais biológicos (sangue periférico e urina) que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo

com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio Projeto de Pesquisa, portanto, completamente gratuitas para você. Caso você queira retirar-se em definitivo da pesquisa, terá total liberdade para fazê-lo, sem que isso prejudique futuros atendimentos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e doutorando Gilian Batista Balbuena Guerreiro) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa, no serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: (51) 3359.8011. Ainda, para maiores informações, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 3359.7640, de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h.

Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma delas (assinada por nós) será entregue a você, e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa.

“Pelo presente consentimento, declaro que fui devidamente informada sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.”

Data: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PACIENTES COM ACIDEMIA GLUTÁRICA TIPO 1

Estamos convidando você ou a pessoa pela qual você é responsável, que é portadora de Acidemia Glutárica Tipo 1, a participar do projeto de pesquisa intitulado “Estudo do perfil antioxidante e anti-inflamatório da L-carnitina sobre o dano oxidativo em pacientes portadores de acidemia glutárica tipo 1”. O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, formados por radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com acidemia glutárica Tipo 1. Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com você (portador ou responsável legal do portador de AG1), das coletas de sangue periférico e urina. Estes dados serão coletados nos dias de consultas rotineiras, não sendo necessário o comparecimento em consultas extras. Caso necessário, dados adicionais serão obtidos dos prontuários dos pacientes.

É muito importante que você saiba que os dados (entrevista, resultados das análises de sangue e urina) obtidos com a doação, são de relevante importância científica para o melhor entendimento da AG1 e, principalmente, na busca de terapias complementares para o tratamento dessa doença. Sendo que esses resultados também beneficiarão outros pacientes com a mesma doença.

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue e urina são semelhantes aos da coleta para exames laboratoriais de rotina. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas e que você (portador ou responsável pelo indivíduo) terá acesso às mesmas. Os resultados obtidos serão agrupados e expressos através de resultados numéricos, sem qualquer referência a elementos que possam identificar as pessoas que participaram do estudo. Após o término do estudo os materiais biológicos (sangue periférico e urina) que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar ou não o uso futuro.

Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Cabe salientar que a participação no estudo é totalmente voluntária, e que a desistência não trará implicações a você ou à pessoa pela qual você é responsável com relação ao atendimento clínico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. É importante ressaltar também, que você ou a pessoa sob sua tutela receberão nenhum tipo pagamento pela participação no estudo e que todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio projeto de pesquisa, portanto, serão completamente gratuitas para você.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e o doutorando Gilian Batista Balbuena Guerreiro) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa, no Serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: (51) 3359.8011. Ainda, para maiores informações, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 3359.7640, de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h.

Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma delas (assinada por nós) será entregue a você (participante ou responsável legal pelo participante da pesquisa) e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa.

“Pelo presente consentimento, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.”

Data: _____

Nome: _____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

8.2. ANEXO 2: PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 150616

Data da Versão do Projeto: 15/12/2015

Pesquisadores:

CARMEN REGIA VARGAS

CARLOS EDUARDO DIAZ JACQUES

GILIAN BATISTA BALBUENO GUERREIRO

JÉSSICA LAMBERTY FAVERZANI

MOACIR WAJNER

DAIANE GRIGOLO BARDEMAKER RODRIGUES


Título: Estudo do perfil antioxidante e anti-inflamatório da L-carnitina sobre o dano oxidativo em pacientes portadores de acidemia glutárica do tipo I

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 16 de janeiro de 2016.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA

8.3. ANEXO 3: PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM USO DE ANIMAIS



GRUPO DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

Projeto: 160412 Data de Aprovação do Projeto: 29/09/2016
 Título: INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM L-CARNITINA E RESVERATROL SOBRE O DANO OXIDATIVO A BICOMOLÉCULAS EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES DA ENZIMA GLUTARIL-COA DESIDROGENASE Data de Término: 30/03/2019

Pesquisador Responsável: CARMEN REGILA VARGAS

Equipe de pesquisa:

ALEXANDRE AMARAL CARLOS EDUARDO DAZ JACQUES DANNE GRIGOLO BARDEMARKER ROOR
 GILIAN BATISTA BALBUENO GUERREIRO MONCEP WALNER CAROLINE PAULA MESSORA

Submissão: 10/03/2016 Documentação: APROVAÇÃO Espécie/Linhagem: CAMUNDONGO - 1293aEv Academia Ciências Sexo/Idade: +00000 Qtd.: 240 Data Reunião: 27/09/2016 Situação: APROVADO

Total de Animais: 240

Coordenador
 Comissão de Ética no Uso de Animais

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios trimestrais de acompanhamento e relatório final à CEUA/HCPA.

8.4. ANEXO 4: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO BIOQUIMICA ET BIOPHYSICA ACTA – MOLECULAR BASIS OF DISEASE

BBA - Molecular Basis of Disease: Submission Confirmation

BBA - Molecular Basis of Disease (ELS) <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Seg, 28/01/2019 19:01

Você: alexandreumaral@gmail.com; rafaelr@outlook.com; jelamberty@hotmail.com; ana.groehs@gmail.com; angelasitta@yahoo.com.br; marion_deon@yahoo.com.br; mwajner@ufgfs.br; cnvargas@kcpa.edu.br ▾

*** Automated email sent by the system ***

Title: L-carnitine prevents oxidative stress in striatum of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice submitted to lysine overload
Corresponding Author: Dr. Gilian Guerreiro
All Authors: Gilian Guerreiro; ALEXANDRE U AMARAL; RAFAEL T RIBEIRO; JÉSSICA FAVERZANI; ANA C Groehs; ANGELA SITTA; Marion Deon; MOACIR WAJNER; CARMEN R VARGAS
Regular Paper

Dear Dr. Guerreiro,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in BBA - Molecular Basis of Disease.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:
<https://ees.elsevier.com/bbadis/>
Your username is: gilian_guerreiro@hotmail.com
If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/BBADIS/automail_query.asp

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

No additional authors will be added post submission unless editors receive agreement from all authors and detailed information is supplied as to why the author list should be amended.

Thank you for submitting your work to BBA - Molecular Basis of Disease. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Sincerely,