

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

RENATA DE BRITTO

**Efeitos de um antioxidante direcionado para a mitocôndria
em um modelo animal para a acidemia glutárica tipo I**

Porto Alegre - RS

2022

RENATA DE BRITTO

**Efeitos de um antioxidante direcionado para a mitocôndria
em um modelo animal para a acidemia glutárica tipo I**

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

Orientador: **Prof. Dr. GUILHIAN LEIPNITZ**

Co-orientadora: **Dra. BIANCA SEMINOTTI**

Porto Alegre - RS

2022

CIP - Catalogação na Publicação

de Britto, Renata
Efeitos de um antioxidante direcionado para a
mitocôndria em um modelo animal para a acidemia
glutárica tipo I / Renata de Britto. -- 2022.
73 f.

Orientador: Guilhian Leipnitz.

Coorientadora: Bianca Seminotti.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. acidemia glutárica tipo I. 2. camundongos
Gcdh-/- . 3. estresse oxidativo. 4. metabolismo da
glicose. 5. JP4-039. I. Leipnitz, Guilhian, orient.
II. Seminotti, Bianca, coorient. III. Título.

SUMÁRIO

PARTE I	5
RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
1. Introdução	10
1.1. Erros Inatos do Metabolismo	10
1.2. Acidemias Orgânicas	11
1.3. Acidemia Glutárica Tipo I	12
1.3.1. Achados clínicos e neuropatológicos	14
1.3.2. Diagnóstico.....	14
1.3.3. Tratamento	15
1.3.4. Fisiopatologia da acidemia glutárica tipo I	16
1.3.5. Modelo animal para a acidemia glutárica tipo I	17
1.4. JP4-039	18
1.5. Estresse Oxidativo	20
1.6. Metabolismo energético cerebral	21
1.7. Controle de qualidade mitocondrial	22
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo geral	24
2.2. Específicos	24
PARTE II	25
Manuscrito a ser submetido na revista “Molecular Neurobiology”	26
PARTE III	27
3. Discussão	28
4. Referências	35
ANEXO I	48

PARTE I

RESUMO

A acidemia glutárica tipo I (AG I) é uma acidemia orgânica de herança autossômica recessiva caracterizada pela deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase (GCDH), que participa do catabolismo dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano. Os pacientes acometidos pela AG I apresentam sintomas iniciais inespecíficos até o aparecimento das crises encefalopáticas. Durante essas crises, que ocorrem após situações de catabolismo elevado, uma característica degeneração do estriado é observada nos pacientes, seguida de sintomas como distonia e discinesia, hipotonia, convulsões, rigidez muscular e espasticidade. Atualmente, o tratamento para a AG I possui pouca eficácia, sendo realizada restrição dietética de proteínas e suplementação de L-carnitina. Portanto, no presente estudo, foram avaliados a homeostase redox, o metabolismo energético e o controle de qualidade mitocondrial em cérebro de camundongos selvagens (*Gcdh*^{+/+}) e nocautes para a enzima GCDH (*Gcdh*^{-/-}) submetidos à dieta rica em lisina. Dessa forma, camundongos *Gcdh*^{+/+} e *Gcdh*^{-/-} de 30 dias de idade receberam uma dieta de lisina (4,7%) por 72 h. Alguns animais ainda receberam três injeções intraperitoneais do antioxidante direcionado à mitocôndria JP4-039 (5 µg/g), uma para cada dia da dieta. Quando a dieta completou 72 horas, os animais foram eutanasiados e tiveram seu estriado e córtex cerebral homogeneizados para a avaliação dos parâmetros. Os resultados mostraram um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) e na oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) no estriado e córtex de camundongos *Gcdh*^{-/-}, comparados aos animais *Gcdh*^{+/+}. Também foi verificado um aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione transferase (GST) nas duas estruturas avaliadas dos camundongos nocautes. Ainda, foi observada uma diminuição na atividade da glutathione peroxidase (GPx) no estriado de camundongos *Gcdh*^{-/-}. Os achados também demonstraram uma diminuição no metabolismo da glicose no córtex cerebral através da técnica MicroPET. A fosforilação da p38 e o conteúdo das proteínas canal de ânions dependente de voltagem (VDAC) e proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) também estavam alterados nas duas estruturas cerebrais. Já o tratamento com JP4-039 preveniu as alterações nos níveis de MDA, na oxidação de DCFH, na atividade das enzimas

antioxidantes e no metabolismo de glicose. Estes achados mostram que estresse oxidativo, hipometabolismo da glicose e alterações na biogênese mitocondrial contribuem para a fisiopatologia da AG I, e que o JP4-039 é um candidato promissor para o tratamento dessa doença.

Palavras-chaves: acidemia glutárica tipo I, camundongos *Gcdh*^{-/-}, estresse oxidativo, metabolismo da glicose, biogênese mitocondrial, cérebro, JP4-039.

ABSTRACT

Glutaric aciduria type I (GA I) is a neurometabolic disorder caused by the deficient activity of the mitochondrial enzyme glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH), which participates in the catabolism of the amino acids lysine, hydroxylysine and tryptophan. Patients affected by AG I have nonspecific symptoms until the onset of encephalopathic crises. These crises occur due to situations of high catabolism, such as fever, infections or prolonged fasting. After these crises, a characteristic bilateral striatal degeneration occurs in patients, followed by dystonia and dyskinesia, seizures, muscle stiffness and spasticity. Currently, the treatment for GA I is ineffective and consists only of dietary protein restriction and L-carnitine supplementation. In the present study, we evaluated redox homeostasis, energy metabolism and mitochondrial quality control in brain of wild type (*Gcdh*^{+/+}) and knockout (*Gcdh*^{-/-}) mice fed a high lysine diet. Thirty-day-old *Gcdh*^{+/+} and *Gcdh*^{-/-} mice received a high lysine chow (4.7%) for 72 h. Some animals also received three intraperitoneal injections of JP4-039 (5 µg/g) for each day of the diet. When the diet completed 72 h, mice were euthanized, and their striatum and cerebral cortex were homogenized for the evaluation of the parameters. Our results showed an augment in malondialdehyde (MDA) levels and 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) oxidation in striatum and cerebral cortex of *Gcdh*^{-/-} mice, compared to *Gcdh*^{+/+} animals. We also observed an increase in the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) in both structures of the knockout mice. Moreover, the activity of GPx was decreased in striatum of *Gcdh*^{-/-} mice. Furthermore, a decrease in glucose metabolism was seen in cerebral cortex of *Gcdh*^{-/-} mice, assessed by MicroPET scan. Alterations in the phosphorylation of p38 and the content of voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) were further verified in brain of *Gcdh*^{-/-} animals. The treatment with JP4-039 prevented the alterations on MDA levels, DCFH oxidation, antioxidant enzyme activities and glucose metabolism. Our data show that oxidative stress, glucose metabolism and mitochondrial biogenesis alterations contribute to the pathophysiology of GA I, and that JP4-039 is a promising candidate for the treatment of this disorder.

Keywords: glutaric acidemia type I, *Gcdh*^{-/-} mice, oxidative stress, glucose metabolism, mitochondrial biogenesis, brain, JP4-039.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAD9- desidrogenase de acilas-CoA 9
AG I- acidemia glutárica tipo I
AUC_{0-t}- área sobre a curva
3HG- ácido 3-hidroxiglutárico
AG- ácido glutárico
AMPK- proteína cinase ativada por adenosina monofosfato
BHE- barreira hematoencefálica
CAT- catalase
CL- *Clearance*
C_{max}- concentração máxima
DCFH- 2',7'-diclorofluoresceína
DRP1- proteína 1 relacionada à dinamina
EIM- erros inatos do metabolismo
ERO- espécies reativas de oxigênio
Fis- fissão 1
GCDH- glutaril-CoA desidrogenase
GC/MS- cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
GPx- glutaciona peroxidase
GR- glutaciona redutase
GSH- glutaciona reduzida
GST- glutaciona S-transferase
HO-1- heme oxigenase-1
JP4- JP4-039
Lis- lisina
MDA- malondialdeído
MFN1- mitofusina 1
MFN2- mitofusina 2
MS/MS- espectrometria de massas em tandem
NMDA- N-metil-D-aspartato
OHLis- hidroxilisina
OPA1- proteína atrofica óptica 1
XJB- XJB-5-131
SNC- sistema nervoso central
SOD- superóxido dismutase
T_{max} - tempo de maior concentração no sangue
t_{1/2}- tempo de meia vida
Trp- triptofano
VDAC- canal de ânions dependente de voltagem
VLCAD- desidrogenase de acilas-CoA de cadeia muito longa

1. Introdução

1.1. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são um grupo de doenças genéticas e fenotipicamente heterogêneas causadas pela deficiência de uma proteína, geralmente uma enzima, de uma determinada rota metabólica. Devido ao bloqueio da via, há o acúmulo de intermediários potencialmente tóxicos nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes, e também uma depleção de produtos essenciais ao organismo (Mak *et al.* 2013; Vernon 2015).

Em 1909, Sir Archibald Edward Garrod citou pela primeira vez o termo EIM. Ele foi o primeiro a desenvolver o conceito da “individualidade química” e a correlacionar os efeitos da consanguinidade com diferentes fenótipos. Baseando-se nas leis de Mendel e em seus estudos sobre as patologias alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo, Garrod propôs um modelo de herança genética autossômica recessiva para essas doenças. Ele descreveu a alcaptonúria como uma doença rara, hereditária e que possui um defeito metabólico recessivo na via da degradação da tirosina. Como resultado, os indivíduos com alcaptonúria acumulam grandes quantidades de ácido homogentísico nos tecidos e líquidos biológicos (Mak *et al.* 2013; Arnold 2018). Desde então, os estudos sobre os EIM tiveram avanços importantes, atualmente sendo identificados mais de 1.000 EIM na literatura (Ferreira *et al.* 2019) Os EIM são caracterizados por diversos distúrbios bioquímicos, tais como defeitos no ciclo da ureia, defeitos na oxidação de ácidos graxos, acidemias orgânicas e doenças mitocondriais. A maioria deles envolve processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Saudubray e Garcia-Cazorla 2018). Embora individualmente raras, em conjunto essas doenças afetam aproximadamente 1 a cada 500-1000 recém-nascidos vivos (Barić *et al.* 2001).

Os sintomas podem surgir a partir do acúmulo do substrato potencialmente tóxico, deficiência do produto, ou ambos. Dependendo da atividade residual da enzima deficiente, o início do quadro clínico pode variar desde o período de recém-nascido até a vida adulta (Ezgu 2016). Entretanto, a maioria dos EIM já é observada nos recém-nascidos. Os neonatos geralmente são saudáveis ao nascer, mas acabam desenvolvendo os sintomas em dias ou horas depois do nascimento. Os sintomas apresentados são inespecíficos, tais como: desnutrição, dificuldade respiratória, letargia ou convulsões. Essas condições podem ser facilmente confundidas com sepse ou disfunções

cardiopulmonares, por exemplo. Conseqüentemente, o diagnóstico dos EIM é difícil de ser estabelecido através dos sintomas (El-Hattab 2015). Muitas doenças metabólicas podem ser diagnosticadas com testes bioquímicos e com uma triagem metabólica na urina. A triagem neonatal oferece a oportunidade de detectar um EIM ainda na sua fase assintomática e melhorar o prognóstico da doença. A espectrometria de massas possui grande relevância no diagnóstico de diversos EIM, pois ela permite a detecção e a quantificação rápida de uma ampla quantidade de metabólitos (Vernon 2015). Já com relação ao tratamento, muitos EIM são passíveis de intervenção dietética para auxiliar na remoção das substâncias tóxicas acumuladas e respondem à suplementação de metabólitos deficientes para prevenir o estresse metabólico (Scriver 2001).

1.2. Acidemias Orgânicas

As acidemias ou acidúrias orgânicas constituem um grupo de EIM caracterizados pelo acúmulo de um ou mais ácidos orgânicos nos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes afetados devido à deficiência da atividade de enzimas do metabolismo de aminoácidos, lipídeos ou carboidratos (Wajner 2019). Essas patologias são os distúrbios metabólicos mais frequentes em crianças hospitalizadas e uns dos grupos mais comuns de EIM (Chalmers *et al.* 1980; Wajner *et al.* 2019c). Os pacientes podem manifestar crises de descompensação metabólica que ocorrem em condições que induzem um estado catabólico. Durante essas crises, os pacientes podem apresentar convulsões associadas a vômitos, letargia que pode progredir para o coma, falência múltipla de órgãos e até mesmo ir a óbito (Kölker *et al.* 2015). A frequência dessas doenças na população em geral é pouco conhecida, o que pode ser creditado à falta de laboratórios especializados para o seu diagnóstico e ao desconhecimento médico sobre essas enfermidades. Os componentes bioquímicos acumulados das acidemias orgânicas podem ser detectados através de métodos laboratoriais pela cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) e pela espectrometria de massas em tandem (MS/MS) para uma triagem neonatal expandida (Karam *et al.* 2013). Apesar do elevado custo, a detecção desses metabólitos é necessária, pois ela permite a realização de uma terapia em um estágio inicial da doença e também reduz a sua morbidade e mortalidade. Conseqüentemente, essas patologias passam a ser melhor reconhecidas pela equipe médica (Wajner *et al.* 2009).

Atualmente, mais de 65 acidúrias orgânicas já foram descritas na literatura, sendo a maioria de característica autossômica recessiva. Coletivamente, as acidemias

orgânicas apresentam uma incidência de aproximadamente 1:3.000 recém-nascidos vivos (Villani *et al.* 2017). Na Holanda, por ser um país referência para o diagnóstico de EIM, a incidência dessas doenças é estimada em 1: 2.200 recém-nascidos. Já na Arábia Saudita, onde a taxa de consanguinidade é elevada, a frequência é de 1:740 nascidos vivos (Wajner 2019; Hoffmann *et al.* 2004).

Clinicamente, os pacientes portadores de acidemias orgânicas apresentam predominantemente disfunção neurológica em suas mais diversas formas de expressão: regressão neurológica, convulsões, coma, ataxia, hipotonia, hipertonia, irritabilidade, tremores, movimentos coreatetóticos, tetraparesia espástica, atraso no desenvolvimento psicomotor, déficit cognitivo e outras manifestações. Os achados laboratoriais mais frequentes são cetose, cetonúria, neutropenia, trombocitopenia, acidose metabólica, baixos níveis de bicarbonato, hiperglicemia, hiperamonemia, hipo/hiperglicemia, acidose láctica, aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres e outros (Kölker *et al.* 2015; Wajner 2019). Recentemente, com o uso da tomografia computadorizada, foram encontradas na maioria dos pacientes afetados por essas doenças alterações na substância branca (hipomielização e/ou desmielização), atrofia cerebral generalizada ou dos gânglios da base (necrose ou calcificação), megaencefalia, atrofia frontotemporal e cerebelar (Mayatepek *et al.* 1996).

1.3. Acidemia Glutárica Tipo I

A acidemia glutárica tipo I (AG I) é uma acidemia orgânica de herança autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase (GCDH), que participa da rota de catabolismo dos aminoácidos lisina (Lis), hidroxilisina (OHLis) e triptofano (Trp) (Kölker *et al.* 2007b). A GCDH catalisa a oxidação e descarboxilação de glutaril-CoA em crotonil-CoA e dióxido de carbono, transferindo os elétrons para a cadeia respiratória a partir da flavoproteína transferidora de elétrons (Westover *et al.* 2001; Härtel *et al.* 1993).

Na primeira reação, a enzima realiza a desidrogenação de glutaril-CoA a glutaconil-CoA e em seguida a descarboxilação de glutaconil-CoA a crotonil-CoA (Westover *et al.* 2001; Härtel *et al.* 1993). Com o bloqueio dessa atividade enzimática, há o desvio dos intermediários para rotas metabólicas alternativas, levando ao acúmulo dos ácidos glutárico (AG) e 3-hidroxi glutárico (3HG) e, em alguns pacientes, o ácido glutacônico também está elevado (Keyser *et al.* 2008) (Figura 1).

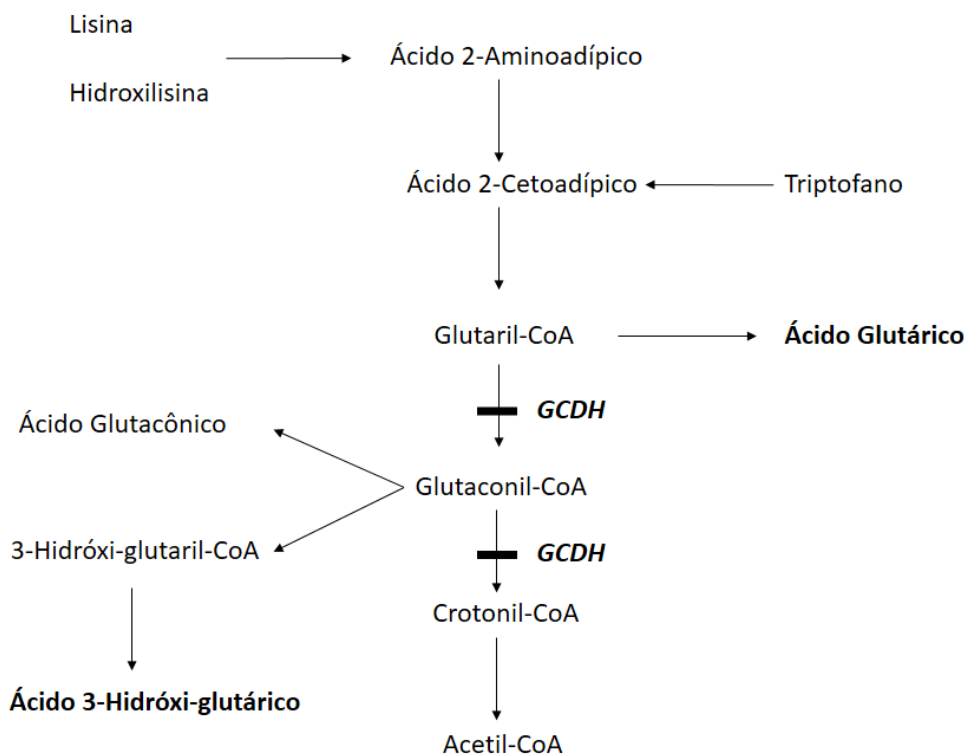


Figura 1. Rota de catabolismo dos aminoácidos Lisina, Hidroxilisina e Triptofano, com a atividade deficiente da enzima glutaril-CoA desidrogenase (GCDH). Adaptado de Scriver, 2001.

A concentração plasmática desses ácidos acumulados pode chegar a 4000 $\mu\text{mol/L}$, enquanto que as concentrações cerebrais podem atingir níveis maiores que 20 mM para o AG (Seminotti *et al.* 2021; Amaral *et al.* 2021), aumentando ainda mais durante as crises encefalopáticas. Essas diferenças nas concentrações cerebrais provavelmente ocorrem pelo fato de haver o aumento da síntese do AG e 3HG nas próprias células neurais e o efluxo destes metabólitos através da barreira hematoencefálica (BHE) ser muito baixo. Tais fatores facilitam o acúmulo desses metabólitos no sistema nervoso central (SNC), levando à neurodegeneração característica observada nos pacientes afetados (Strauss *et al.* 2003; Kölker *et al.* 2006b; Sauer *et al.* 2006; Hoffmann e Zschocke 1999).

A prevalência da AG I é estimada em 1:30.000 - 1:100.000 nascidos vivos, sendo que em algumas comunidades geneticamente homogêneas, como os Amish e os índios canadenses, a prevalência pode chegar até 1:300 nascidos vivos (Lindner *et al.* 2004; Tuncel *et al.* 2018; Kölker *et al.* 2007b; Hedlund *et al.* 2006). No Brasil, não há

dados sobre a incidência da doença, uma vez que a AG I não está incluída no programa de triagem neonatal, dificultando o acesso a esses dados (Sitta *et al.* 2021).

1.3.1. Achados clínicos e neuropatológicos

A AG I é considerada uma acidemia orgânica “cerebral”, pois os indivíduos afetados apresentam principalmente sintomatologia neurológica. Os sintomas iniciais são geralmente moderados até o aparecimento das crises encefalopáticas. Antes das crises, os pacientes exibem um quadro clínico inespecífico, com alguns não apresentando sintomas, enquanto outros tendo atraso no desenvolvimento. Contudo, a característica clínica mais importante durante esse período é a macrocefalia progressiva presente ao nascimento (Kölker *et al.* 2004b; Hoffmann *et al.* 1996).

Durante as crises encefalopáticas, desencadeadas por situações de catabolismo elevado, tais como febre e infecções, ocorre uma característica degeneração bilateral do estriado nos pacientes. Posteriormente, há o surgimento de sintomas relacionados à destruição estriatal, tais como distonia e discinesia, hipotonia, convulsões, rigidez muscular e espasticidade. Dados da literatura têm mostrado que os pacientes com AG I apresentam maior risco de ter essas crises entre 3 a 36 meses de idade. Após completar o terceiro ano de vida, as crises encefalopáticas ocorrem apenas esporadicamente (Kölker *et al.* 2006a; Keyser *et al.* 2008; Wiederschain 2002).

Em relação aos achados neuropatológicos, exames de tomografia computadorizada e ressonância magnética apresentam resultados característicos, tais como fissuras sylvianas largas, diminuição progressiva da substância branca (hipomielinização ou desmielinização) e degeneração bilateral dos gânglios da base (Kimura *et al.* 1994; Hedlund *et al.* 2006; Couce *et al.* 2013). Além disso, logo após o nascimento, os exames de imagem revelam uma atrofia cortical frontotemporal e um alargamento do espaço subaracnóide da região frontotemporal (Mohammad *et al.* 2015). É importante ressaltar que o alargamento das fissuras sylvianas aparece na maioria dos pacientes, até mesmo nos assintomáticos, podendo ser um facilitador no diagnóstico da doença (Kimura *et al.* 1994).

1.3.2. Diagnóstico

O diagnóstico precoce é dificultado pela falta de sintomas característicos, principalmente antes de uma crise encefalopática. Apesar de a macrocefalia ser

encontrada na maioria dos pacientes durante a infância, ela não é específica para a AG I. Visto isso, a deficiência da GCDH foi incluída em programas de triagem neonatal expandida em alguns países como a Alemanha e a Austrália (Kölker *et al.* 2007a). O diagnóstico precoce é importante para evitar o surgimento das crises encefalopáticas e suas consequências citadas anteriormente (Kölker *et al.* 2011)

O diagnóstico é comumente realizado através da detecção do aumento do AG e 3HG em líquidos corporais, principalmente na urina, utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O aumento do conjugado glutarilcarnitina também pode ser encontrado através da espectrometria de massas em tandem, auxiliando no diagnóstico da doença (Kölker *et al.* 2011; Al-Dirbashi *et al.* 2011). Em alguns pacientes, a excreção do AG pode estar levemente aumentada ou até mesmo normal, tornando difícil o diagnóstico e o tratamento precoce. Além disso, a excreção urinária elevada do AG pode ser encontrada em outras doenças, principalmente em algumas relacionadas à disfunção mitocondrial (Baric *et al.* 1999). Como alternativa, acredita-se que o 3HG esteja permanentemente elevado na maioria dos pacientes, permitindo um diagnóstico mais confiável de quase todos os pacientes, independentemente da excreção do AG (Baric *et al.* 1999; Al-Dirbashi *et al.* 2011). Ainda, a medida da atividade enzimática da GCDH em cultura de fibroblastos ou leucócitos pode ajudar a confirmar o diagnóstico quando os níveis dos ácidos nos líquidos biológicos forem inconclusivos (Larson e Goodman 1993).

1.3.3. Tratamento

O principal tratamento para a AG I consiste na redução dos ácidos acumulados usando uma dieta pobre em Lis combinada com uma suplementação com L-carnitina. Além disso, um tratamento emergencial intensivo é realizado durante as crises agudas a fim de reduzir o catabolismo elevado do paciente. Durante esse tratamento, é realizada a ingesta hipercalórica para controlar o catabolismo, e a administração de líquidos para evitar a desidratação (Kölker *et al.* 2007a; Boy *et al.* 2017; Kölker *et al.* 2004a).

Alguns medicamentos são utilizados para tratar os distúrbios de movimentos observados nos pacientes com AG I após a ocorrência das crises encefalopáticas, tais como a distonia e discinesia. A terapia mais utilizada para tratar essas complicações é a combinação de baclofeno, um relaxante muscular agonista dos receptores GABA, com benzodiazepínicos (Hoffmann *et al.* 1996; Kyllerman *et al.* 1994; Boy *et al.* 2017). Fármacos anticolinérgicos e a toxina botulínica também são utilizados, contudo muitos

efeitos adversos são observados e alguns pacientes podem desenvolver anticorpos contra a toxina, levando à interrupção do tratamento (Burlina *et al.* 2004). Em geral, o tratamento medicamentoso para a AG I é desafiador e com poucas evidências sobre a eficácia de drogas específicas (Boy *et al.* 2017).

A suplementação com arginina também tem sido explorada como um tratamento alternativo, já que esse aminoácido reduz o transporte da Lis pela BHE, pois esses dois aminoácidos competem pelo transportador CAT1 no cérebro. Sendo assim, há uma redução no influxo e na oxidação da Lis, diminuindo a concentração dos ácidos AG e 3HG (Kölker *et al.* 2012; Strauss *et al.* 2011). Apesar desse tratamento apresentar alguns resultados benéficos, ele tem se mostrado eficiente apenas quando é realizado antes das crises encefalopáticas. Contudo, como explicado anteriormente, os pacientes possuem sintomas inespecíficos no início da doença, o que torna difícil o tratamento antes das crises agudas (El-Hattab 2015). Portanto, é necessária a descoberta de novas estratégias terapêuticas que possam melhorar o prognóstico dos indivíduos com AG I, principalmente durante as crises encefalopáticas.

1.3.4. Fisiopatologia da acidemia glutárica tipo I

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a fisiopatologia da AG I. Sabe-se que o acúmulo dos ácidos AG e 3HG em tecidos e líquidos biológicos contribuem para os sintomas apresentados pelos pacientes. Exames *postmortem* mostraram grave perda neuronal com vacuolização pós-sináptica, bem como uma degeneração na substância branca. Com base nesses achados, e pelas semelhanças estruturais do AG e 3HG com o glutamato, diversos estudos foram realizados para avaliar se a neurodegeneração da AG I estava associada à excitotoxicidade (Chow *et al.* 1988; Leibel *et al.* 1980; Kölker *et al.* 2003; Kölker *et al.* 2004c). Kölker e colaboradores (2000) observaram que os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) têm um papel importante no dano celular induzido pelo 3HG, já que em culturas primárias de neurônios os níveis desses receptores estavam aumentados em paralelo com o aumento desse ácido. A ativação desses receptores resultou em morte celular devido ao acúmulo dos íons sódio e cálcio. O 3HG mostrou aumentar as concentrações de cálcio intracelular, o que foi prevenido por antagonistas do receptor NMDA (Kölker *et al.* 2002). Além da toxicidade via glutamato, os ácidos acumulados na AG I também comprometem a neurotransmissão GABAérgica (Wajner *et al.* 2004), visto que o AG e o 3HG inibem competitivamente a enzima glutamato descarboxilase, principal enzima

da biossíntese do neurotransmissor GABA. Além disso, em investigações *postmortem*, baixas concentrações de GABA foram encontradas nos núcleos caudado e putâmen, estruturas que formam o corpo estriado. Ainda foi visto que a diminuição desse neurotransmissor estava correlacionada com a falta da enzima glutamato descarboxilase neuronal em neurônios dessas áreas cerebrais (Kölker *et al.* 2004b; Stokke *et al.* 1976; Vendramin Pasquetti *et al.* 2017). Sendo assim, a AG I apresenta um desequilíbrio na neurotransmissão excitatória e inibitória.

Outros estudos também mostraram que os ácidos acumulados na AG I induzem estresse oxidativo *in vivo* e *in vitro*. Foi observado que o 3HG induz peroxidação lipídica, dano proteico e alteram as defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas em cérebro de ratos (Latini *et al.* 2005; Latini *et al.* 2002). Além disso, achados *in vivo* mostraram que a administração crônica de AG causou efeitos moderados no metabolismo energético em cérebro e músculo esquelético de ratos Wistar jovens, refletido pela inibição da atividade do complexo I-III da cadeia respiratória no cérebro e da atividade dos complexos I-II e II-III em músculo esquelético (Ferreira *et al.* 2005).

1.3.5. Modelo animal para a acidemia glutárica tipo I

Koeller e colaboradores (2002) criaram um modelo animal nocaute para AG I que possui uma deleção dos 7 primeiros éxons da GCDH, resultando em uma atividade nula dessa enzima em camundongos. A medida dos metabólitos na urina dos camundongos nocautes para GCDH (*Gcdh*^{-/-}) apresentou um aumento na quantidade de AG e 3HG, semelhante àsquelas encontradas nos pacientes. Também foi realizada a medida desses metabólitos no parênquima cerebral e resultados semelhantes foram observados. Contudo, esse modelo não reproduziu o fenótipo neurológico e a degeneração estriatal característica dos pacientes afetados, mesmo após a aplicação de estressores metabólicos ou infecciosos, que foram sugeridos serem os responsáveis pela lesão estriatal aguda. Com o objetivo de aperfeiçoar esse modelo, Zinnanti e colaboradores (2006) propuseram a realização da administração de uma sobrecarga de Lis nos animais. Foi verificado que, quando a Lis foi ingerida por esses animais (via oral), as concentrações dos metabólitos aumentaram consideravelmente, e foi observado um padrão de neurodegeneração dependente do estágio de desenvolvimento, semelhante ao verificado nos pacientes. Além disso, os autores encontraram uma perda da seletividade da BHE do estriado, bem como lesões na substância branca, astrócitos reativos e perda neuronal em animais mais velhos e com mais tempo de dieta. Visto

isso, os camundongos *Gcdh*^{-/-}, quando expostos a uma grande quantidade de Lis, são considerados o melhor modelo animal para estudar a AG I humana, pois mostram uma maior vulnerabilidade estriatal dependente do desenvolvimento (Zinnanti *et al.* 2006).

Diversas evidências mostraram indução de estresse oxidativo nos camundongos *Gcdh*^{-/-}, especialmente quando expostos a uma sobrecarga de Lis. Foi visto que a administração intraperitoneal de Lis induziu peroxidação lipídica, aumentou os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), e a atividade de algumas enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), a glutathione redutase (GR) e a glutathione peroxidase (GPx), em estriado de camundongos *Gcdh*^{-/-}. Um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) e na atividade da SOD também foi observado no córtex cerebral desses animais (Seminotti *et al.* 2012). Em concordância com esses achados, foi observado ainda que a sobrecarga de Lis (2,8 e 4,7%) na dieta causou aumento na peroxidação lipídica em estriado e córtex, além de diminuição na atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase (CAT) em córtex cerebral. Já nas análises histopatológicas, ocorreu um aumento na expressão dos marcadores para estresse oxidativo, apesar da ausência de danos anatômicos cerebrais (Seminotti *et al.* 2013).

Outros estudos mostraram um inchamento e uma desintegração da mitocôndria como os primeiros eventos patológicos no córtex cerebral dos animais nocautes após uma sobrecarga de Lis. Esses animais também mostraram uma redução na quantidade de ATP, fosfocreatina e alfa-cetoglutarato no cérebro (Zinnanti *et al.* 2007a). Uma diminuição na atividade da creatina cinase, da Na⁺, K⁺ - ATPase e de enzimas do ciclo do ácido cítrico também foi vista após a sobrecarga de Lis (Amaral *et al.* 2015; Amaral *et al.* 2012a; Amaral *et al.* 2012b).

1.4. JP4-039

O JP4-039 (JP4) é um derivado sintético do antibiótico gramicidina S que tem a capacidade de atravessar membranas, tendo como alvo principal a mitocôndria. Esse composto possui um grupamento nítróximo ligado diretamente a um isómero de alqueno-peptídeo (Figura 2). O isómero apresenta uma afinidade de em torno de 30 vezes maior pela mitocôndria comparado ao citosol (Yang e Stockwell 2016), ao passo que o grupamento nítróximo permite o sequestro de ERO, radicais orgânicos e elétrons que escapam da cadeia transportadora de elétrons (Frantz *et al.* 2013; Krainz *et al.* 2016; Polyzos *et al.* 2016; Saunders *et al.* 2015; Wipf *et al.* 2005).

Ainda não foram realizados estudos sobre o metabolismo do JP4. Contudo, um estudo sobre essa molécula mostrou que ela possui os seguintes parâmetros farmacocinéticos plasmáticos em camundongos para uma administração IV na dose de 20mg/kg: concentração máxima (C_{max}) de 6,86 µg/mL, sendo que o tempo de maior concentração de JP4 no sangue após administração do fármaco foi de 5 min (t_{max}), área sobre a curva (AUC_{0-t}) de 277 µg/mL.min, tempo de meia vida (t_{1/2}) de 16 h, e *clearance* (CL) de 72,1 mL/h/kg (Christner *et al.* 2018). O estudo mostrou que o JP4 possui baixo t_{1/2} e tem uma boa distribuição para os tecidos, incluindo o cérebro, já que as concentrações do JP4 verificadas nos tecidos foram maiores que no plasma dos animais (Christner *et al.* 2018). Além disso, estudos observaram que compostos derivados da gramicidina S, como o JP4, possuem toxicidade mínima mesmo em altas concentrações (Frantz e Wipf 2010). Por outro lado, mais investigações são necessárias para determinar de forma mais detalhada a farmacocinética e toxicologia desse fármaco.

Com relação aos efeitos do JP4, estudos já mostraram que ele é capaz de diminuir os níveis de ERO e elétrons que escapam da cadeia respiratória, diminuir os danos da radiação, e prevenir a peroxidação lipídica e apoptose (Berhane *et al.* 2014b; Berhane *et al.* 2014a; Shinde *et al.* 2016; Krainz *et al.* 2016). Também já foi observado que o tratamento com JP4 melhorou o funcionamento da cadeia respiratória e diminuiu a produção de ERO em fibroblastos deficientes para enzima desidrogenase de acilas-CoA de cadeia muito longa (VLCAD). Ainda, este estudo mostrou que o tratamento com esse antioxidante aumentou parcialmente a atividade da VLCAD nos fibroblastos deficientes (Seminotti *et al.* 2019). Além disso, outro estudo mostrou que o JP4 diminuiu os níveis de ERO em fibroblastos com deficiência da desidrogenase de acilas-CoA 9 (ACAD9), sendo que esse antioxidante foi mais promissor que antioxidantes tradicionais devido à sua permeabilidade através da membrana mitocondrial (Leipnitz *et al.* 2018). Por fim, foi visto que a injeção intraperitoneal de JP4 preservou a atividade de enzimas antioxidantes e da creatina cinase alteradas pela injeção intraestriatal de sulfito em ratos. O JP4 também atenuou as alterações no conteúdo de proteínas como SOD1, CAT, heme oxigenase-1 (HO-1), p38 e marcadores de apoptose (Glänzel *et al.* 2021). Portanto, nos estudos citados, foi observado que o JP4 preveniu o aumento de ERO, melhorou o funcionamento da cadeia respiratória e preveniu a alterações nos marcadores de apoptose (Seminotti *et al.* 2019; Leipnitz *et al.* 2018; Glänzel *et al.*

2021). Deste modo, essa molécula parece ser promissora para o tratamento de pacientes com doenças metabólicas hereditárias.

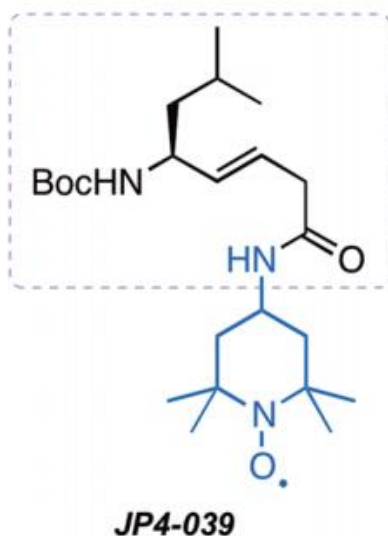


Figura 2. Estrutura química do JP4-039, um antioxidante direcionado para a mitocôndria. A porção azul da molécula apresenta o grupamento nitroxídeo, ao passo que a porção tracejada da molécula representa o grupamento isótero de alqueno. Adaptado de Krainz et al. 2016.

1.5. Estresse Oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são espécies químicas com um ou mais elétrons desemparelhados devido à redução parcial do oxigênio. As ERO interagem com os componentes celulares e são representados principalmente pelo radical hidroxila (OH^\cdot), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essas espécies reativas são geradas endogenamente principalmente a partir de elétrons que “escapam” da cadeia respiratória mitocondrial, mas também podem surgir através da interação de componentes celulares com fontes exógenas, como compostos xenobióticos (Shukla *et al.* 2011).

As concentrações de ERO são controladas pelas defesas antioxidantes. Segundo Halliwell (1996), um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, retarda ou evita a oxidação desse substrato. Os mecanismos de ação de um antioxidante podem incluir: remoção de O_2 , eliminação de ERO ou inibição de sua formação, ligação com íons metálicos necessários para a catálise de geração de ERO, e aumento das defesas antioxidantes endógenas. Algumas defesas antioxidantes enzimáticas estão distribuídas

pelo organismo para remover os radicais livres formados, como a SOD, a CAT, a GPx, a GR e a glutathione S-transferase (GST), entre outras. Também há os antioxidantes não enzimáticos, tais como as vitaminas C e E, e a glutathione reduzida (GSH) (Halliwell 1996; Halliwell 2006).

Quando as ERO sobrecarregam o sistema de defesa antioxidante, seja pelo aumento de seus níveis seja pela diminuição da capacidade antioxidante celular, ocorre o estresse oxidativo. Assim, para manter uma homeostase celular adequada, um equilíbrio deve ser alcançado entre a síntese e a degradação de ERO (Shukla *et al.* 2011). O estresse oxidativo resulta em danos diretos ou indiretos mediados pelas ERO em ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, e têm sido implicado na carcinogênese, neurodegeneração (Trachootham *et al.* 2009; Andersen 2004), aterosclerose, diabetes (Paravicini e Touyz 2006) e envelhecimento (Haigis e Yankner 2010; Ray *et al.* 2012). O cérebro, devido à sua alta taxa metabólica e capacidade reduzida de regeneração celular, quando comparado com outros órgãos, é o órgão mais suscetível aos efeitos prejudiciais das ERO. Neste contexto, várias doenças neurodegenerativas são conhecidas pelo desequilíbrio na homeostase redox, como as doenças de Parkinson e Alzheimer (Andersen 2004).

As ERO podem ser menos ou mais reativas e, devido a isso, o dano mediado pelo estresse oxidativo pode promover consequências diferentes. Como a maioria dessas espécies é produzida em baixos níveis pelo metabolismo aeróbico normal, qualquer dano que elas possam eventualmente causar às células é geralmente reparado pelo sistema de defesa antioxidante. Todavia, em alguns casos, espécies menos reativas podem ser convertidas em espécies radicais mais agressivas, como o radical hidroxila, causando extenso dano celular por atacar oxidativamente DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (Shukla *et al.* 2011; Halliwell e Gutteridge 2015). Além disso, as ERO também podem causar morte celular por vias não fisiológicas (necróticas) ou por vias reguladas (apoptóticas) (Halliwell 1996).

1.6. Metabolismo energético cerebral

A principal função fisiológica da mitocôndria é a geração de ATP a partir da fosforilação oxidativa, porém funções adicionais, tais como geração e desintoxicação de ERO, regulação dos níveis de cálcio e síntese e catabolismo de metabólitos, também são atribuídas a ela (Brand e Nicholls 2011). O chamado potencial de membrana mitocondrial é essencial para o funcionamento dessa organela, uma vez que controla a

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

A glicose é a principal fonte de energia para o cérebro e a regulação do seu metabolismo é crítica para o funcionamento cerebral, principalmente para a síntese de neurotransmissores e manutenção do gradiente de íons (Mergenthaler *et al.* 2013). Também já foi visto que o metabolismo de glicose está envolvido na modulação do estresse oxidativo e que as enzimas do seu metabolismo participam diretamente da sinalização celular. Sendo assim, além de ser a principal fonte de ATP e fornecer carbono para a síntese de macromoléculas, a glicose também modula diversas funções nos neurônios e nas células gliais (Zhang *et al.* 2021). Além da glicose proveniente da circulação sanguínea, o glicogênio astrocitário também parece ser um importante combustível, pois já foi visto que a sua quantidade está diretamente relacionada com o aprendizado (Suzuki *et al.* 2011). Também deve ser destacado o lactato, que parece ser o principal combustível energético dos neurônios e desempenha um papel essencial na formação da memória de longo prazo (Suzuki *et al.* 2011).

1.7. Controle de qualidade mitocondrial

O controle de qualidade mitocondrial consiste em uma gama de processos que controlam o pool de mitocôndrias normais (“saudáveis”) necessário para o funcionamento normal da célula. Dentre esses processos, destacam-se a biogênese e a dinâmica mitocondrial. A biogênese é um processo complexo que requer a expressão coordenada de genes nucleares e mitocondriais, o importe de proteínas traduzidas no citosol e a montagem de complexos proteicos acarretando aumento da massa mitocondrial. Neste contexto, o canal de ânions dependentes de voltagem (VDAC) é expresso de forma ubíqua na mitocôndria, sendo considerado um marcador mitocondrial (Shoshan-Barmatz *et al.* 2008; Shoshan-Barmatz *et al.* 2018).

As células também possuem um sistema que permite controlar o metabolismo conforme a disponibilidade de nutrientes. Esse controle do metabolismo é realizado através da via de sinalização da proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (Herzig e Shaw 2018). Quando a quantidade de ATP na célula é reduzida, a via da AMPK é ativada pelo aumento na razão AMP/ADP. Portanto, essa via de sinalização inibe processos anabólicos para evitar a perda de ATP e ativa processos catabólicos para gerar mais ATP para a célula (Carling 2017). Por controlar processos que aumentam a quantidade de ATP, o AMPK também é conhecido por regular a biogênese mitocondrial (Hardie 2007). Dessa forma, a biogênese mitocondrial pode ser controlada pela via do AMPK como uma adaptação compensatória ao déficit energético observado em doenças metabólicas (Valero 2014).

Além disso, as mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas, passando por ciclos coordenados de fissão e fusão a fim de manter sua forma, distribuição e tamanho. A fusão e fissão mitocondrial desempenham papéis importantes na manutenção de mitocôndrias funcionais quando a célula sofre algum dano. A fusão atua fusionando duas mitocôndrias parcialmente danificadas para complementação. Já a fissão cria novas mitocôndrias, permitindo a remoção de mitocôndrias danificadas (Youle e Van Der Blik 2012; Tilokani *et al.* 2018).

A fissão envolve duas proteínas principais: uma grande GTPase, chamada de proteína 1 relacionada à dinamina (DRP1), e uma outra proteína pequena chamada de fissão 1 (Fis1) (Wang *et al.*, 2009a). A DRP1 encontra-se no citoplasma e quando recrutada para a superfície mitocondrial medeia o processo de fissão mitocondrial. Isso ocorre porque a Fis1, uma proteína transmembrana ancorada na membrana mitocondrial externa, funciona como um receptor da proteína DRP1 (Chen e Chan 2005).

O processo de fusão é dividido em duas partes, onde as membranas externa e interna se fundem em eventos separados. Após aproximação das duas mitocôndrias, através da interação entre as mitofusinas 1 e 2 (MFN1 e MFN2), ocorrem diversas mudanças morfológicas possibilitadas pela hidrólise do GTP dessas proteínas acarretando a fusão da membrana mitocondrial externa (Youle e Van Der Blik 2012; Tilokani *et al.* 2018). Já a fusão da membrana mitocondrial interna é mediada principalmente pela proteína atrófica óptica 1 (OPA1), que também é fundamental para a manutenção da estrutura das cristas mitocondriais (van der Blik *et al.* 2013).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Com o intuito de contribuir para o esclarecimento dos mecanismos patológicos da AG I, o objetivo desse trabalho foi investigar a homeostase redox, a bioenergética e aspectos da função mitocondrial em cérebro de camundongos nocautes (*Gcdh*^{-/-}) e normais/selvagens (*Gcdh*^{+/+}) submetidos a uma sobrecarga de lisina. Além disso, investigamos os efeitos de um tratamento com o JP4-039, um antioxidante direcionado para a mitocôndria, sobre os mesmos parâmetros nesses animais.

2.2. Específicos

Foram avaliados os seguintes parâmetros em córtex cerebral e estriado de camundongos *Gcdh*^{-/-} e *Gcdh*^{+/+}.

1. Estresse oxidativo: níveis de MDA, oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), e atividade da SOD, CAT, GPx, GR e GST;
2. Bioenergética: avaliação do potencial de membrana (ψ_m) e determinação do metabolismo cerebral de glicose (Micro-PET Scan cerebral);
3. Imunoconteúdo de proteínas marcadoras de estresse oxidativo (HO-1), da fusão (MFN2 e OPA1) e biogênese mitocondrial (AMPK e VDAC1), da via de sinalização da p38, da autofagia (LC3) e de dano neuronal (sinaptofisina).

PARTE II

Título do manuscrito: Evidence that the mitochondria-targeted reactive species scavenger JP4-039 prevents oxidative stress and glucose metabolism reduction in brain of glutaryl-CoA dehydrogenase-deficient mice

Manuscrito a ser submetido na revista “Molecular Neurobiology”

PARTE III

3. Discussão

A AG I é uma acidemia orgânica de sintomatologia essencialmente neurológica. No início da vida, uma característica degeneração bilateral aguda do estriado acomete os pacientes durante crises encefalopáticas geralmente precipitadas por situações de catabolismo elevado. Após essas crises agudas, os pacientes apresentam sintomas relacionados à degeneração estriatal, tais como distonia e discinesia, hipotonia, convulsões, rigidez muscular e espasticidade (Hoffmann and Zschocke 1999; Keyser *et al.* 2008; Wiederschain 2002). Apesar dos mecanismos fisiopatológicos não estarem totalmente estabelecidos, acredita-se que o acúmulo dos ácidos AG e 3HG é responsável pelo aparecimento dos sintomas neurológicos (Kölker *et al.* 2007a). Neste contexto, já foi visto que o AG e o 3HG induzem dano oxidativo e prejudicam o sistema antioxidante (Seminotti *et al.* 2013; Seminotti *et al.* 2012), bem como causam alterações no metabolismo energético em córtex cerebral e estriado de animais deficientes para a GCDH (*Gcdh*^{-/-}) (Amaral *et al.* 2012b; Zinnanti *et al.* 2007a). Por outro lado, é importante ressaltar que o tratamento para a AG I consiste na restrição dietética de Lis e suplementação de carnitina e, mesmo com um manejo clínico cuidadoso, muitos pacientes não respondem à terapia e acabam sofrendo a característica degeneração do estriado (Strauss e Morton 2003).

Dessa forma, o presente estudo investigou possíveis mecanismos fisiopatológicos ainda não estudados na AG I, com ênfase na avaliação do metabolismo da glicose e da biogênese mitocondrial. Também foram avaliados os efeitos de um antioxidante de última geração direcionado à mitocôndria, o JP4-039, com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de novas terapias adjuvantes para a AG I.

Primeiramente, foi observado um aumento nos níveis de MDA e da oxidação do DCFH tanto em estriado quanto em córtex cerebral de camundongos *Gcdh*^{-/-}. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostram dano oxidativo no estriado e no córtex de camundongos *Gcdh*^{-/-} (Seminotti *et al.* 2012). O aumento de MDA indica indução de lipoperoxidação, uma vez que é um dos principais produtos finais da peroxidação de ácidos graxos. Desse modo, quanto mais oxidação lipídica ocorrer, maior será a quantidade de MDA no tecido. Além disso, é importante considerar que o MDA é tóxico para células, já que ele pode reagir com aminas primárias das proteínas e também formar ligações cruzadas com o DNA (Gaschler e Stockwell 2017). Paralelamente, foi verificado um aumento na oxidação do DCFH, o

que indica um aumento na geração de espécies reativas em córtex e estriado de camundongos nocautes. Um estudo já havia demonstrado um aumento da oxidação de DCFH no córtex desses animais quando suplementados com uma dieta rica em Lis (Seminotti *et al.* 2012). A oxidação de DCFH para um produto altamente fluorescente é considerada uma medida confiável da formação de espécies reativas (Zhu *et al.* 1994). Contudo, deve ser levado em consideração que o DCFH não apresenta especificidade, podendo ser oxidado por diferentes espécies reativas, tais como radicais hidroxil, peróxido de hidrogênio e íon férrico (Zhu *et al.* 1994). Diante do exposto, pode-se presumir que a oxidação lipídica observada nesses animais foi devido ao aumento na produção de espécies reativas. Os resultados mostraram ainda que a administração de JP4-039 preveniu o aumento dos níveis de MDA e da oxidação de DCFH tanto no estriado quanto no córtex cerebral dos camundongos nocautes. O JP4-039 é uma molécula que difere dos antioxidantes clássicos por possuir um nitróxido ligado diretamente a um isómero de alqueno-peptídeo (Frantz *et al.* 2013), que proporciona uma afinidade maior pela mitocôndria do que pelo citosol. Já a parte da estrutura que apresenta o grupamento nitróxido permite a eliminação de ERO, radicais orgânicos e elétrons que escapam da cadeia de transportadora de elétrons com eficiência (Krainz *et al.* 2016). Ainda, o JP4-039 demonstrou ter uma significativa atividade biológica *in vitro* e *in vivo* em modelos de doenças relacionadas com a formação de ERO (Seminotti *et al.* 2019; Leipnitz *et al.* 2018; Glänzel *et al.* 2021), inclusive com potencial mitigador da peroxidação lipídica (Krainz *et al.* 2016; Rand *et al.* 2021).

Visto que o JP4-039 preveniu as alterações na oxidação lipídica e na formação de espécies reativas, também foram avaliados os efeitos desse antioxidante sobre as alterações observadas nas enzimas antioxidantes. Algumas das alterações mostradas aqui nessas enzimas já foram observadas em investigações anteriores (Seminotti *et al.* 2013; Seminotti *et al.* 2012). Houve um aumento nas atividades da CAT, GST e SOD em estriado e córtex cerebral de camundongos nocautes. Apesar dos mecanismos que levaram ao aumento da atividade dessas enzimas não terem sido avaliados, presume-se que houve o aumento da expressão gênica dessas enzimas causado por um mecanismo compensatório em resposta ao aumento das ERO (Halliwell 2006; Halliwell 1996). Sob essa perspectiva, o aumento da SOD e CAT pode ter ocorrido devido ao aumento nas concentrações de superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente. Neste particular, a via de sinalização do Nrf2 é a principal responsável pelo aumento na

expressão gênica de enzimas antioxidantes, tais como a GPx e a HO-1, que protegem as células contra alterações no estresse oxidativo. Já foi demonstrado que antioxidantes que conseguem ativar a via Nrf2/HO-1 podem ser uma terapia promissora para prevenir estresse oxidativo (Choi 2020). Com relação à HO-1, é uma enzima que catalisa a formação de biliverdina em bilirrubina, produto com características antioxidantes. Sendo assim, a HO-1 possui um importante papel na defesa antioxidante e também na homeostase do ferro (Loboda *et al.* 2016). Contudo, os resultados do presente estudo não mostraram alterações no conteúdo da HO-1 nos dois tecidos avaliados.

Por outro lado, a atividade da GPx foi diminuída no estriado dos camundongos nocautes. Essa alteração pode ser devido ao ataque das ERO em aminoácidos importantes para a atividade catalítica ou devido a um *turnover* acelerado dessa enzima (Pigeolet *et al.* 1990; Halliwell 2013). Por fim, a atividade da GR em estriado não sofreu alterações nas duas estruturas dos camundongos *Gcdh*^{-/-}. A administração do JP4-039 preveniu ou atenuou as alterações observadas nas enzimas antioxidantes, com exceção da atividade da GPx em estriado. Esse resultado está de acordo com o fato de que o JP4-039 já mostrou ser eficaz contra alterações no sistema de defesa antioxidante em outras doenças hereditárias metabólicas (Leipnitz *et al.* 2018; Seminotti *et al.* 2019; Glänzel *et al.* 2021).

Com o objetivo de avaliar o metabolismo energético nos camundongos nocautes, foi determinado o $\Delta\Psi_m$ e o metabolismo de glicose nesses animais. Primeiramente, não foram vistas diferenças no $\Delta\Psi_m$ no cérebro dos animais que receberam uma dieta normal ou com alta quantidade de Lis (4,7%). Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que também não observaram uma modificação no $\Delta\Psi_m$ no estriado desses animais (Amaral *et al.* 2015). Esse estudo utilizou piruvato e malato como substratos e apenas dois dias de dieta com a suplementação de Lis. Portanto, pode ser sugerido que a mitocôndria dos animais deficientes consegue gerar um gradiente eletroquímico de prótons de magnitude suficiente para manter um potencial de membrana normal. Além disso, o mesmo estudo não observou alterações na taxa respiratória do cérebro dos camundongos nocautes (Amaral *et al.* 2015). Ao analisar os resultados do $\Delta\Psi_m$ e da respiração mitocondrial juntos, pode-se sugerir que o metabolismo energético da mitocôndria não é afetado em camundongos *Gcdh*^{-/-} nas condições experimentais avaliadas.

Foi avaliado também o metabolismo de glicose através da técnica de MicroPET scan. Foi encontrada uma diminuição significativa desse parâmetro no córtex cerebral dos animais deficientes para a enzima GCDH. Esse resultado indica uma diminuição no metabolismo da glicose e conseqüentemente revela que uma neurodegeneração pode estar ocorrendo nesse tecido. Como a glicose é a principal fonte de energia para o cérebro, a síntese de macromoléculas e neurotransmissores também pode estar prejudicada no córtex desses animais (Zhang *et al.* 2021). Estudos anteriores também observaram uma diminuição no metabolismo da glicose no córtex de pacientes com AG I (Al-Essa *et al.* 1998). Portanto, pode ser sugerido que, juntamente com imagens de ressonância magnética, o uso do MicroPET pode ser útil para o acompanhamento clínico de pacientes com AG I. Ainda, a técnica de MicroPET é considerada mais sensível por detectar mudanças sutis no SNC, o que facilitaria o diagnóstico da AG I (Al-Essa *et al.* 1998). Também pode-se correlacionar as mudanças no metabolismo da glicose com o estresse oxidativo, uma vez que metabólitos da glicose, como o NADPH, estão envolvidos na regulação da inflamação e homeostase redox (Zhang *et al.* 2021). Assim, alterações na razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ poderiam também explicar o desequilíbrio redox que ocorre nesses animais. Além disso, o JP4-039 foi capaz de prevenir essas alterações devido à sua capacidade antioxidante, indicando que as espécies reativas prejudicam o metabolismo da glicose. Supreendentemente, não foram encontradas diferenças nesse parâmetro no estriado dos camundongos *Gcdh*^{-/-}. Em estudos conduzidos por Zinnanti e colaboradores (2006) foi visto que o mesmo modelo animal utilizado no presente estudo apresentou perda neuronal maior no córtex cerebral do que no estriado quando utilizada a dieta de Lis por 3 dias. Essa poderia ser uma possível explicação para as diferenças de resultados encontrados no metabolismo da glicose nesses tecidos.

Em seguida, foi avaliada a via de sinalização da p38. As células recebem sinais que as “alertam” sobre as alterações que ocorrem no meio extracelular, para assim desenvolver mecanismos adequados e transmitir sinais para obter respostas apropriadas (Cuadrado e Nebreda 2010). Por isso, nossas células apresentam diversas vias de sinalizações como a família das MAPK. Esse grupo de proteínas requerem uma fosforilação no resíduo de tirosina e treonina para se tornarem ativas. Essas enzimas reagem a uma variedade de sinais envolvendo fatores de crescimento, hormônios, citocinas e estresse oxidativo (Kim e Choi 2010). A fosforilação da p38 foi diminuída

nas duas estruturas cerebrais avaliadas dos camundongos nocautes. Com isso, pode-se supor que a homeostase celular está comprometida no cérebro dos camundongos *Gcdh*^{-/-}. Por outro lado, a administração do JP4-039 não foi capaz de prevenir essa alteração.

Posteriormente, foi avaliado o conteúdo de VDAC1 nesses animais. Essa proteína serve como um canal que regula a interação metabólica e energética da mitocôndria com o resto da célula. Além disso, ela participa do *crossstalk* com o retículo endoplasmático, regulação da autofagia e inflamação (Shoshan-Barmatz *et al.* 2008). Ela está localizada na membrana mitocondrial externa; dessa forma a VDAC1 fica numa posição ideal para interagir com diversas proteínas (Shoshan-Barmatz *et al.* 2020). Ainda, essa proteína é uma das mais abundantes na mitocôndria, podendo ser utilizada como marcador de massa mitocondrial (Niño *et al.* 2020). Os resultados do presente estudo mostraram uma diminuição do conteúdo dessa proteína no estriado de camundongos *Gcdh*^{-/-}, o que pode indicar uma diminuição na massa mitocondrial devido à lesão estriatal aguda induzida pela dieta com elevada quantidade de Lis. Enquanto isso, foi observado um aumento no conteúdo da proteína AMPK nessa estrutura cerebral. Essa proteína mantém o equilíbrio entre a produção e consumo de ATP nas células, inativando os processos que consomem ATP e regulando os processos que aumentam a síntese de ATP, como a biogênese mitocondrial (Hardie 2007; Jornayvaz e Shulman 2010). Sendo assim, ao analisar os dados do conteúdo de AMPK e VDAC1 em estriado, pode-se inferir que o aumento do AMPK é provavelmente para compensar a diminuição na quantidade de mitocôndrias, indicada pela diminuição de VDAC1. Além disso, o aumento do AMPK também poderia estar relacionado com o estresse oxidativo, visto que é conhecido por prolongar a vida celular através da modulação redox (Marín-Aguilar *et al.* 2017). O papel do NADPH é essencial em condições de estresse, já que é utilizado para a regeneração de GSH e pela GPx para eliminar H₂O₂. A AMPK é capaz de aumentar os níveis de NADPH ao diminuir seu consumo na síntese de ácidos graxos e aumentar a sua síntese pela oxidação de ácidos graxos (Jeon *et al.* 2012). Visto isso, o aumento de AMPK em estriado também poderia ser para compensar os níveis de NADPH, devido ao desequilíbrio acentuado na homeostase redox desse tecido. O tratamento com JP4-039 não foi capaz de normalizar essas alterações.

Por outro lado, o conteúdo de VDAC1 aumentou no córtex cerebral dos animais *Gcdh*^{-/-}. Acredita-se que a diferença de resultado observado entre as duas estruturas

esteja relacionada com a vulnerabilidade de cada estrutura à suplementação de Lis. O aumento no número de mitocôndrias pode ser um mecanismo compensatório à diminuição do metabolismo da glicose observado nessa estrutura. O conteúdo de VDAC1 geralmente apresenta níveis elevados no cérebro de pacientes e em camundongos nocautes para a doença de Alzheimer. Esse aumento está associado à destruição de células neuronais nesses modelos experimentais (Shoshan-Barmatz *et al.* 2018; Cuadrado-Tejedor *et al.* 2011). Essa poderia ser outra hipótese para explicar o aumento dessa proteína nos camundongos *Gcdh*^{-/-}, já que ela é conhecida por causar morte celular. Contudo, mais experimentos devem ser realizados para confirmar essa hipótese. A administração de JP4-039 não conseguiu reverter essas alterações. Também foi avaliado o conteúdo da proteína sinaptofisina nas duas estruturas do camundongo *Gcdh*^{-/-}. Esse resultado indica que não há alterações na integridade sináptica em córtex e estriado.

Após, foram avaliadas as proteínas envolvidas na fusão mitocondrial e autofagia. O conteúdo das proteínas MFN2 e OPA1 não apresentaram diferenças nos dois tecidos avaliados de camundongos *Gcdh*^{-/-}. Esses resultados indicam que as mitocôndrias ainda apresentam a capacidade de fundir e, dessa forma, possivelmente recuperar mitocôndrias que estejam danificadas. Também foi determinado o principal marcador da atividade autofágica, a proteína LC3. Não houve diferenças no conteúdo de LC3 tanto no córtex quanto no estriado de camundongos *Gcdh*^{-/-}, indicando que a atividade autofágica no cérebro desses animais está ocorrendo normalmente. Contudo, outras proteínas devem ser analisadas para melhor avaliar a dinâmica mitocondrial e a autofagia.

Atualmente, o tratamento para a AG I é realizado apenas com restrição de Lis na dieta e suplementação de carnitina (Kölker *et al.* 2012; Boy *et al.* 2017). Não há nenhum sintoma característico da AG I que ocorra antes da crise encefalopática, dificultando o diagnóstico clínico e precoce. Além disso, o tratamento realizado após a degeneração do estriado não apresenta eficácia na maioria dos casos (Kölker *et al.* 2007a). Por isso, vale ressaltar aqui a importância da triagem neonatal, que permite identificar o composto glutarilcarnitina no sangue antes dos sintomas aparecerem. Ainda, não há evidências de que compostos como N-acetilcisteína, creatina e antioxidantes clássicos sejam benéficos para a AG I (Boy *et al.* 2017). Devido a isso, ressalte-se aqui a importância de identificar terapias adjuvantes para a AG I, como o

JP4-039. A triagem neonatal de assintomáticos seguida de uma terapia precoce pode reduzir a incidência da lesão dos gânglios da base em até 55% (Strauss *et al.* 2003). Neste contexto, especula-se que novas terapias adjuvantes, como o JP4-039, poderiam ser administradas em pacientes assintomáticos e evitar a característica degeneração do estriado sofrido pelos pacientes. Ressalte-se ainda que essa molécula tem características estruturais que a direcionam para a mitocôndria, tornando-a um antioxidante mais eficiente que os antioxidantes clássicos, visto que a mitocôndria é a principal fonte geradora de ERO nas células (Leipnitz *et al.* 2018; Frantz *et al.* 2013).

Concluindo, o presente estudo mostrou que o sistema antioxidante, o metabolismo da glicose, a biogênese mitocondrial e a sinalização celular estão prejudicados no cérebro dos camundongos *Gcdh*^{-/-}. Este é o primeiro trabalho a mostrar que o metabolismo da glicose e a biogênese mitocondrial estão alterados nesses animais. A maioria dessas alterações foi mitigada pelo tratamento com JP4-039, sugerindo que o uso de antioxidantes direcionados para a mitocôndria, como o JP4-039, pode trazer benefícios adicionais em relação aos antioxidantes clássicos. Os achados do presente estudo podem contribuir para o desenvolvimento de novas terapias adjuvantes para a AG I. Dessa maneira, o uso de um antioxidante como o JP4-039, juntamente com uma dieta restrita em Lis, poderá contribuir para um melhor prognóstico de pacientes com AG I, diminuindo o risco de um dano neurológico irreversível.

4. Referências

- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126.
- Åkerman K. E. O., Wikström M. K. F. (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* **68**, 191–197.
- Al-Dirbashi O. Y., Kölker S., Ng D., Fisher L., Rupar T., Lepage N., Rashed M. S., et al. (2011) Diagnosis of glutaric aciduria type 1 by measuring 3-hydroxyglutaric acid in dried urine spots by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 173–180.
- Al-Essa M., Bakheet S., Patay Z., Al-Watban J., Powe J., Joshi S., Ozand P. T. (1998) Fluoro-2-deoxyglucose (18FDG) PET scan of the brain in glutaric aciduria type 1: clinical and MRI correlations. *Brain Dev.* **20**, 295–301.
- Amaral A. U., Cecatto C., Seminotti B., Ribeiro C. A., Lagranha V. L., Pereira C. C., Oliveira F. H. de, et al. (2015) Experimental evidence that bioenergetics disruption is not mainly involved in the brain injury of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice submitted to lysine overload. *Brain Res.* **1620**, 116–29.
- Amaral A. U., Cecatto C., Seminotti B., Zanatta Â., Fernandes C. G., Busanello E. N. B., Braga L. M., et al. (2012a) Marked reduction of Na(+), K(+)-ATPase and creatine kinase activities induced by acute lysine administration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice. *Mol. Genet. Metab.* **107**, 81–6.
- Amaral A. U., Ferreira G. C., Seminotti B., Leipnitz G., Wajner M. (2021) Glutaric Acid Neurotoxicity: Mechanisms and Actions, in *Handb. Neurotox.*, pp. 1–35. Springer, Cham.
- Amaral A. U., Seminotti B., Cecatto C., Fernandes C. G., Busanello E. N. B., Zanatta Â., Kist L. W., et al. (2012b) 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. *Mol. Genet. Metab.* **107**, 375–82.
- Andersen J. K. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* **10**, S18-25.
- Arnold G. L. (2018) Inborn errors of metabolism in the 21st century: past to present.

Ann. Transl. Med. **6**, 467–467.

- Barić I., Fumić K., Hoffmann G. F. (2001) *Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium.*
- Baric I., Wagner L., Feyh P., Liesert M., Buckel W., Hoffmann G. F. (1999) Sensitivity and specificity of free and total glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid measurements by stable-isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* **22**, 867–882.
- Berhane H., Epperly M. W., Goff J., Kalash R., Cao S., Franicola D., Zhang X., et al. (2014a) Radiologic differences between bone marrow stromal and hematopoietic progenitor cell lines from Fanconi Anemia (*Fancd2*(-/-)) mice. *Radiat. Res.* **181**, 76–89.
- Berhane H., Shinde A., Kalash R., Xu K., Epperly M. W., Goff J., Franicola D., et al. (2014b) Amelioration of radiation-induced oral cavity mucositis and distant bone marrow suppression in fanconi anemia *Fancd2*^{-/-} (FVB/N) mice by intraoral GS-nitroxide JP4-039. *Radiat. Res.* **182**, 35–49.
- Bliek A. M. van der, Shen Q., Kawajiri S. (2013) Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5(6).
- Boy N., Mühlhausen C., Maier E. M., Heringer J., Assmann B., Burgard P., Dixon M., et al. (2017) *Proposed recommendations for diagnosing and managing individuals with glutaric aciduria type I: second revision.*
- Brand M. D., Nicholls D. G. (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* **435**, 297.
- Burlina A. P., Zara G., Hoffmann G. F., Zschocke J., Burlina A. B. (2004) Management of movement disorders in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: Anticholinergic drugs and botulinum toxin as additional therapeutic options. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**, 911–915.
- Carlberg I., Mannervik B. (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* **113**, 484–90.
- Carling D. (2017) AMPK signalling in health and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* **45**, 31–37.
- Chalmers R. A., Purkiss P., Watts R. W. E., Lawson A. M. (1980) Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. *J. Inherit. Metab. Dis.* **3**, 27–43.

- Chen H., Chan D. C. (2005) *Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission.*
- Choi Y. H. (2020) Activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway contributes to the protective effects of platycodin D against oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis in C2C12 myoblasts. *Gen. Physiol. Biophys.* **39**, 519–530.
- Chow C. W., Haan E. A., Goodman S. I., Anderson R., Evans W. A., Kleinschmidt-DeMasters B. K., Wise G., McGill J. J., Danks D. M. (1988) Neuropathology in glutaric acidemia type 1. *Acta Neuropathol.* **76**, 590–594.
- Christner S., Guo J., Parise R. A., Ringeval M., Hoye A. T., Wipf P., Epperly M. W., Greenberger J. S., Beumer J. H., Eiseman J. L. (2018) Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for the quantitation of the novel radiation protective agent and radiation mitigator JP4-039 in murine plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **150**, 169–175.
- Couce M. L., López-Suárez O., Bóveda M. D., Castiñeiras D. E., Cocho J. A., García-Villoria J., Castro-Gago M., Fraga J. M., Ribes A. (2013) Glutaric aciduria type I: Outcome of patients with early- versus late-diagnosis. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **17**, 383–389.
- Cuadrado-Tejedor M., Vilariño M., Cabodevilla F., Río J. Del, Frechilla D., Pérez-Mediavilla A. (2011) Enhanced expression of the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) in Alzheimer's disease transgenic mice: an insight into the pathogenic effects of amyloid- β . *J. Alzheimers. Dis.* **23**, 195–206.
- Cuadrado A., Nebreda A. R. (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* **429**, 403–417.
- Dagnino A. P. A., Silva R. B. M. Da, Chagastelles P. C., Pereira T. C. B., Venturin G. T., Greggio S., Costa J. C. Da, Bogó M. R., Campos M. M. (2019) Nociceptin/orphanin FQ receptor modulates painful and fatigue symptoms in a mouse model of fibromyalgia. *Pain* **160**, 1383–1401.
- El-Hattab A. W. (2015) Inborn Errors of Metabolism. *Clin. Perinatol.* **42**, 413–439.
- Ezgu F. (2016) Inborn Errors of Metabolism, in *Adv. Clin. Chem.*, pp. 73:195-250.
- Ferreira C. R., Karnebeek C. D. M. van, Vockley J., Blau N. (2019) A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genet. Med.* **21**, 102–106.
- Ferreira G. da C., Viegas C. M., Schuck P. F., Tonin A., Ribeiro C. A. J., Coelho D. de M., Dalla-Costa T., et al. (2005) Glutaric acid administration impairs energy metabolism in midbrain and skeletal muscle of young rats. *Neurochem. Res.* **30**,

1123–31.

- Figueira T. R., Melo D. R., Vercesi A. E., Castilho R. F. (2012) Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. *Methods Mol. Biol.* **810**, 103–17.
- Frantz M. C., Wipf P. (2010) Mitochondria as a target in treatment. *Environ. Mol. Mutagen.* **51**, 462–475.
- Frantz M. C., Skoda E. M., Sacher J. R., Epperly M. W., Goff J. P., Greenberger J. S., Wipf P. (2013) Synthesis of analogs of the radiation mitigator JP4-039 and visualization of BODIPY derivatives in mitochondria. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 4147–4153.
- Gaschler M. M., Stockwell B. R. (2017) Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 419–425.
- Glänzel N. M., Grings M., Teixeira Da Rosa-Junior N., Cereta De Carvalho L. M., Mohsen A.-W., Wipf P., Wajner M., Vockley J., Leipnitz G. (2021) The mitochondrial-targeted reactive species scavenger JP4-039 prevents sulfite-induced alterations in antioxidant defenses, energy transfer, and cell death signaling in striatum of rats HHS Public Access. *J Inherit Metab Dis* **44**, 481–491.
- Haigis M. C., Yankner B. A. (2010) The aging stress response. *Mol. Cell* **40**, 333–44.
- Halliwell B. (1996) Antioxidants: The Basics-what they are and how to Evaluate them. *Adv. Pharmacol.* **38**, 3–20.
- Halliwell B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **141**, 312–322.
- Halliwell B. (2013) The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **75**, 637.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Hardie D. G. (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 774–785.
- Härtel U., Eckel E., Koch J., Fuchs G., Linder D., Buckel W. (1993) Purification of glutaryl-CoA dehydrogenase from *Pseudomonas* sp., an enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. *Arch. Microbiol.* **159**, 174–181.
- Hedlund G. L., Longo N., Pasquali M. (2006) Glutaric acidemia type 1. *Am. J. Med.*

- Genet. - Semin. Med. Genet.* **142 C**, 86–94.
- Herzig S., Shaw R. J. (2018) AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 121–135.
- Hoffmann G. F., Athanassopoulos S., Burlina A. B., Duran M., Klerk J. B. C. De, Lehnerf W., Leonard J. V., et al. (1996) Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neuropediatrics* **27**, 115–123.
- Hoffmann G. F., Kries R. Von, Klose D., Lindner M., Schulze A., Muntau A. C., Röschinger W., Liebl B., Mayatepek E., Roscher A. A. (2004) Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur. J. Pediatr.*, 163(2):76–80.
- Hoffmann G. F., Zschocke J. (1999) Glutaric aciduria type I: From clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy, in *J. Inherit. Metab. Dis.*, Vol. 22, pp. 381–391. *J Inherit Metab Dis.*
- Jeon S. M., Chandel N. S., Hay N. (2012) AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* **485**, 661–665.
- Jornayvaz F. R., Shulman G. I. (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* **47**, 69–84.
- Karam P. E., Habbal M. Z., Mikati M. A., Zaatari G. E., Cortas N. K., Daher R. T. (2013) Diagnostic challenges of aminoacidopathies and organic acidemias in a developing country: A twelve-year experience. *Clin. Biochem.* **46**, 1787–1792.
- Keyser B., Glatzel M., Stellmer F., Kortmann B., Lukacs Z., Kölker S., Sauer S. W., et al. (2008) Transport and distribution of 3-hydroxyglutaric acid before and during induced encephalopathic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1. *Biochim. Biophys. Acta* **1782**, 385–90.
- Kimura S., Hara M., Nezu A., Osaka H., Yamazaki S., Saitoh K. (1994) Two cases of glutaric aciduria type 1: Clinical and neuropathological findings. *J. Neurol. Sci.* **123**, 38–43.
- Koeller D. M., Woontner M., Crnic L. S., Kleinschmidt-DeMasters B., Stephens J., Hunt E. L., Goodman S. I. (2002) Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 347–57.
- Kölker S., Ahlemeyer B., Krieglstein J., Hoffmann G. F. (2000) Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: a new

- pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res.* **47**, 495–503.
- Kölker S., Boy S. P. N., Heringer J., Müller E., Maier E. M., Ensenaer R., Mühlhausen C., et al. (2012) Complementary dietary treatment using lysine-free, arginine-fortified amino acid supplements in glutaric aciduria type I - A decade of experience. *Mol. Genet. Metab.* **107**, 72–80.
- Kölker S., Cazorla A. G., Valayannopoulos V., Lund A. M., Burlina A. B., Sykut-Cegielska J., Wijburg F. A., et al. (2015) The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 1: the initial presentation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **38**, 1041–1057.
- Kölker S., Christensen E., Leonard J. V., Greenberg C. R., Boneh A., Burlina A. B., Burlina A. P., et al. (2011) Diagnosis and management of glutaric aciduria type I - Revised recommendations. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 677–694.
- Kölker S., Christensen E., Leonard J. V., Greenberg C. R., Burlina A. B., Burlina A. P., Dixon M., et al. (2007a) Guideline for the diagnosis and management of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria type I). *J. Inherit. Metab. Dis.* **30**, 5–22.
- Kölker S., Garbade S. F., Boy N., Maier E. M., Meissner T., Mühlhausen C., Hennermann J. B., et al. (2007b) Decline of acute encephalopathic crises in children with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency identified by newborn screening in Germany. *Pediatr. Res.* **62**, 357–63.
- Kölker S., Garbade S. F., Greenberg C. R., Leonard J. V., Saudubray J. M., Ribes A., Kalkanoglu H. S., et al. (2006a) Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res.* **59**, 840–847.
- Kölker S., Greenberg C. R., Lindner M., Müller E., Naughten E. R., Hoffmann G. F. (2004a) *Emergency treatment in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency.* *J. Inherit. Metab. Dis.*
- Kölker S., Hoffmann G. F., Schor D. S. M., Feyh P., Wagner L., Jeffrey I., Pourfarzam M., et al. (2003) Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Region-Specific Analysis of Organic Acids and Acylcarnitines in post mortem Brain Predicts Vulnerability of the Putamen. *Neuropediatrics* **34**, 253–260.
- Kölker S., Koeller D. M., Okun J. G., Hoffmann G. F. (2004b) *Pathomechanisms of*

- Neurodegeneration in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficiency*. Ann Neurol.
- Kölker S., Koeller D. M., Sauer S., Hörster F., Schwab M. A., Hoffmann G. F., Ullrich K., Okun J. G. (2004c) Excitotoxicity and bioenergetics in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**, 805–812.
- Kölker S., Köhr G., Ahlemeyer B., Okun J. G., Pawlak V., Hörster F., Mayatepek E., Krieglstein J., Hoffmann G. F. (2002) Ca²⁺ and Na⁺ Dependence of 3-Hydroxyglutarate-Induced Excitotoxicity in Primary Neuronal Cultures from Chick Embryo Telencephalons. *Pediatr. Res.* **52**, 199–206.
- Kölker S., Sauer S. W., Okun J. G., Hoffmann G. F., Koeller D. M. (2006b) Lysine intake and neurotoxicity in glutaric aciduria type I: towards a rationale for therapy? *Brain* **129**, e54.
- Krainz T., Gaschler M. M., Lim C., Sacher J. R., Stockwell B. R., Wipf P. (2016) A mitochondrial-targeted nitroxide is a potent inhibitor of ferroptosis. *ACS Cent. Sci.* **2**, 653–659.
- Kyllerman M., Skjeldal O. H., Lundberg M., Holme I., Jellum E., Döbeln U. von, Fossen A., Carlsson G. (1994) Dystonia and dyskinesia in glutaric aciduria type I: Clinical heterogeneity and therapeutic considerations. *Mov. Disord.* **9**, 22–30.
- Larson A., Goodman S. (1993) *Glutaric Acidemia Type I*. University of Washington, Seattle.
- Latini A., Borba Rosa R., Scussiato K., Llesuy S., Belló-Klein A., Wajner M. (2002) 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. *Brain Res.* **956**, 367–373.
- Latini A., Scussiato K., Leipnitz G., Dutra-Filho C. S., Wajner M. (2005) Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. *J. Inherit. Metab. Dis.* **28**, 57–67.
- LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. (1992) Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 227–231.
- Leibel R. L., Shih V. E., Goodman S. I., Bauman M. L., McCabe E. R. B., Zwerdling R. G., Bergman I., Costello C. (1980) Glutaric acidemia: A metabolic disorder causing progressive choreoathetosis. *Neurology* **30**, 1163–1168.
- Leipnitz G., Mohsen A.-W., Karunanidhi A., Seminotti B., Roginskaya V. Y., Markantone D. M., Grings M., et al. (2018) Evaluation of mitochondrial

- bioenergetics, dynamics, endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk, and reactive oxygen species in fibroblasts from patients with complex I deficiency. *Sci. Rep.* **8**, 1165.
- Lindner M., Kölker S., Schulze A., Christensen E., Greenberg C. R., Hoffmann G. F. (2004) Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**, 851–859.
- Loboda A., Damulewicz M., Pyza E., Jozkowicz A., Dulak J. (2016) Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 3221–3247.
- Lowry O. H., Rosebrough N. j, Randall R. J., Lewis A. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *Biol. Chemistry* **193**, 265–275.
- Luft C., Greggio S., Venturin G. T., Costa M. S. da, Costa J. C. da, Donadio M. V. F. (2019) Sex differences in the effects of acute stress on cerebral glucose metabolism: A microPET study. *Brain Res.* **1722**, 146–355.
- Mak C. M., Lee H. C. H., Chan A. Y. W., Lam C. W. (2013) Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: Review and update. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **50**, 142–162.
- Mannervik B., Guthenberg C. (1981) Glutathione transferase (human placenta). *Methods Enzymol.* **77**, 231–235.
- Marín-Aguilar F., Pavillard L. E., Giampieri F., Bullón P., Cordero M. D. (2017) Adenosine Monophosphate (AMP)-Activated Protein Kinase: A New Target for Nutraceutical Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **18**.
- Marklund S. L. (2018) Pyrogallol Autoxidation, in *Handb. Oxyg. Radic. Res.*, pp. 243–248. CRC Press.
- Mayatepek E., Hoffmann G. F., Baumgartner R., Schulze A., Jakobs C., Trefz F. K., Bremer H. J. (1996) Atypical vitamin B12-unresponsive methylmalonic aciduria in a sibship with severe progressive encephalomyelopathy: A new genetic disease? *Eur. J. Pediatr.* **155**, 398–403.
- Mergenthaler P., Lindauer U., Dienel G. A., Meisel A. (2013) Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* **36**, 587.
- Mirandola S. R., Melo D. R., Schuck P. F., Ferreira G. C., Wajner M., Castilho R. F. (2008) Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by

- interfering with mitochondrial succinate uptake. *J. Inherit. Metab. Dis.* **31**, 44–54.
- Mirrione M. M., Schiffer W. K., Siddiq M., Dewey S. L., Tsirka S. E. (2006) PET imaging of glucose metabolism in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Synapse* **59**, 119–121.
- Mohammad S. A., Abdelkhalek H. S., Ahmed K. A., Zaki O. K. (2015) Glutaric aciduria type 1: neuroimaging features with clinical correlation. *Pediatr. Radiol.* **45**, 1696–1705.
- Nicholls D. G. (2004) Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* **3**, 35–40.
- Nicholls D. G., Budd S. L. (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* **80**, 315–360.
- Niño S. A., Chi-Ahumada E., Ortíz J., Zarazua S., Concha L., Jiménez-Capdeville M. E. (2020) Demyelination associated with chronic arsenic exposure in Wistar rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **393**.
- Paravicini T. M., Touyz R. M. (2006) Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc. Res.* **71**, 247–258.
- Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., Lambert D., Michiels C., Raes M., Zachary M. D., Remacle J. (1990) Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.* **51**, 283–297.
- Polyzos A., Holt A., Brown C., Cosme C., Wipf P., Gomez-Marin A., Castro M. R., Ayala-Peña S., McMurray C. T. (2016) Mitochondrial targeting of XJB-5-131 attenuates or improves pathophysiology in HdhQ150 animals with well-developed disease phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 1792–802.
- Rand D., Ravid O., Atrakchi D., Israelov H., Bresler Y., Shemesh C., Omesi L., et al. (2021) Endothelial Iron Homeostasis Regulates Blood-Brain Barrier Integrity via the HIF2 α -Ve-Cadherin Pathway. *Pharmaceutics* **13**, 1–24.
- Ray P. D., Huang B.-W., Tsuji Y. (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* **24**, 981–90.
- Rosa-Junior N. T. da, Parmeggiani B., Rosa M. S. da, Glänzel N. M., Moura Alvorcem L. de, Wajner M., Leipnitz G. (2019) Bezafibrate In Vivo Administration Prevents 3-Methylglutaric Acid-Induced Impairment of Redox Status, Mitochondrial Biogenesis, and Neural Injury in Brain of Developing Rats. *Neurotox. Res.* **35**,

809–822.

- Rosenthal R. E., Hamud F., Fiskum G., Varghese P. J., Sharpe S. (1987) Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **7**, 752–758.
- Saudubray J. M., Garcia-Cazorla À. (2018) *Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management*.
- Sauer S. W., Okun J. G., Fricker G., Mahringer A., Müller I., Crnic L. R., Mühlhausen C., et al. (2006) Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Neurochem.* **97**, 899–910.
- Saunders C., Smith L., Wibrand F., Ravn K., Bross P., Thiffault I., Christensen M., et al. (2015) CLPB variants associated with autosomal-recessive mitochondrial disorder with cataract, neutropenia, epilepsy, and methylglutaconic aciduria. *Am. J. Hum. Genet.*, 96(2):258–65.
- Scriver C. R. (2001) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. BMJ Publishing Group.
- Seminotti B., Amaral A. U., Rosa M. S. da, Fernandes C. G., Leipnitz G., Olivera-Bravo S., Barbeito L., et al. (2013) Disruption of brain redox homeostasis in glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice treated with high dietary lysine supplementation. *Mol. Genet. Metab.* **108**, 30–39.
- Seminotti B., Latini A., Amaral A. U., Leipnitz G., Wajner M. (2021) 3-Hydroxyglutaric Acid as a Neurotoxin, in *Handb. Neurotox.*, pp. 1–20. Springer, Cham.
- Seminotti B., Leipnitz G., Karunanidhi A., Kochersperger C., Roginskaya V. Y., Basu S., Wang Y., et al. (2019) Mitochondrial energetics is impaired in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and can be rescued by treatment with mitochondria-targeted electron scavengers. *Hum. Mol. Genet.* **28**, 928–941.
- Seminotti B., Rosa M. S. da, Fernandes C. G., Amaral A. U., Braga L. M., Leipnitz G., Souza D. O. G. de, et al. (2012) Induction of oxidative stress in brain of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice by acute lysine administration. *Mol. Genet. Metab.* **106**, 31–38.
- Shinde A., Berhane H., Rhieu B. H., Kalash R., Xu K., Goff J., Epperly M. W., et al.

- (2016) Intraoral Mitochondrial-Targeted GS-Nitroxide, JP4-039, Radioprotects Normal Tissue in Tumor-Bearing Radiosensitive *Fancd2*^{-/-} (C57BL/6) Mice. *Radiat. Res.* **185**, 134.
- Shoshan-Barmatz V., Keinan N., Zaid H. (2008) Uncovering the role of VDAC in the regulation of cell life and death. *J. Bioenerg. Biomembr.* **40**, 183–191.
- Shoshan-Barmatz V., Nahon-Crystal E., Shteinfer-Kuzmine A., Gupta R. (2018) VDAC1, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Res.* **131**, 87–101.
- Shoshan-Barmatz V., Shteinfer-Kuzmine A., Verma A. (2020) VDAC1 at the Intersection of Cell Metabolism, Apoptosis, and Diseases. *Biomolecules* **10**, 1–40.
- Shukla V., Mishra S. K., Pant H. C. (2011) Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2011**, 572634.
- Sitta A., Guerreiro G., Moura Coelho D. de, Rocha V. V. da, Reis B. G. dos, Sousa C., Vilarinho L., Wajner M., Vargas C. R. (2021) Clinical, biochemical and molecular findings of 24 Brazilian patients with glutaric acidemia type 1: 4 novel mutations in the GCDH gene. *Metab. Brain Dis.* **36**, 205–212.
- Stokke O., Goodman S. I., Moe P. G. (1976) Inhibition of brain glutamate decarboxylase by glutarate, glutaconate, and β -Hydroxyglutarate: Explanation of the symptoms in glutaric aciduria? *Clin. Chim. Acta* **66**, 411–415.
- Strauss K. A., Brumbaugh J., Duffy A., Wardley B., Robinson D., Hendrickson C., Tortorelli S., et al. (2011) Safety, efficacy and physiological actions of a lysine-free, arginine-rich formula to treat glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: Focus on cerebral amino acid influx. *Mol. Genet. Metab.* **104**, 93–106.
- Strauss K. A., Morton D. H. (2003) Type I glutaric aciduria, part 2: A model of acute striatal necrosis. *Am. J. Med. Genet.* **121**, 53–70.
- Strauss K. A., Puffenberger E. G., Robinson D. L., Morton D. H. (2003) Type I glutaric aciduria, part 1: Natural history of 77 patients. *Am. J. Med. Genet. - Semin. Med. Genet.* **121 C**, 38–52.
- Suzuki A., Stern S. A., Bozdagi O., Huntley G. W., Walker R. H., Magistretti P. J., Alberini C. M. (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* **144**, 810–823.
- Tilokani L., Nagashima S., Paupe V., Prudent J. (2018) Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* **62**, 341.

- Trachootham D., Alexandre J., Huang P. (2009) Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 579–591.
- Tuncel A. T., Boy N., Morath M. A., Hörster F., Mütze U., Kölker S. (2018) *Organic acidurias in adults: late complications and management*. Springer Netherlands.
- Valero T. (2014) Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 5507–5509.
- Vendramin Pasquetti M., Meier L., Loureiro S., Ganzella M., Junges B., Barbieri Caus L., Umpierrez Amaral A., et al. (2017) Impairment of GABAergic system contributes to epileptogenesis in glutaric acidemia type I. *Epilepsia* **58**, 1771–1781.
- Vernon H. J. (2015) Inborn errors of metabolism: Advances in diagnosis and therapy. *JAMA Pediatr.* **169**, 778–82.
- Villani G. R., Gallo G., Scolamiero E., Salvatore F., Ruoppolo M. (2017) “*Classical organic acidurias*”: *diagnosis and pathogenesis*. Springer-Verlag Italia s.r.l.
- Wajner M. (2019) *Neurological manifestations of organic acidurias*. Nature Publishing Group.
- Wajner M., Amaral A. U., Leipnitz G., Seminotti B. (2019a) Pathogenesis of brain damage in glutaric acidemia type I: Lessons from the genetic mice model. *Int. J. Dev. Neurosci.* **78**, 215–221.
- Wajner M., Amaral A. U., Leipnitz G., Seminotti B. (2019b) Pathogenesis of brain damage in glutaric acidemia type I: Lessons from the genetic mice model. *Int. J. Dev. Neurosci.* **78**, 215–221.
- Wajner M., Coelho D. de M., Ingrassia R., Oliveira A. B. de, Busanello E. N. B., Raymond K., Flores Pires R., Souza C. F. M. de, Giugliani R., Vargas C. R. (2009) Selective screening for organic acidemias by urine organic acid GC-MS analysis in Brazil: Fifteen-year experience. *Clin. Chim. Acta* **400**, 77–81.
- Wajner M., Kölker S., Souza D. O., Hoffmann G. F., Mello C. F. de (2004) Modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**, 825–828.
- Wajner M., Sitta A., Kayser A., Deon M., Groehs A. C., Coelho D. M., Vargas C. R. (2019c) Screening for organic acidurias and aminoacidopathies in high-risk Brazilian patients: Eleven-year experience of a reference center. *Genet. Mol. Biol.* **42**, 178–185.

- Wendel A. (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **77**, 325–33.
- Westover J. B., Goodman S. I., Frerman F. E. (2001) Binding, hydration, and decarboxylation of the reaction intermediate glutacetyl-coenzyme A by human glutaryl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry* **40**, 14106–14114.
- Wiederschain G. Y. (2002) *The metabolic and molecular bases of inherited disease.*
- Wipf P., Xiao J., Jiang J., Belikova N. A., Tyurin V. A., Fink M. P., Kagan V. E. (2005) Mitochondrial targeting of selective electron scavengers: Synthesis and biological analysis of hemigramicidin-TEMPO conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12460–12461.
- Yagi K. (1998) Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol. Biol.* **108**, 107–10.
- Yang W. S., Stockwell B. R. (2016) Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol.* **26**, 165–176.
- Youle R. J., Blik A. M. Van Der (2012) *Mitochondrial fission, fusion, and stress.*
- Zhang S., Lachance B. B., Mattson M. P., Jia X. (2021) Glucose metabolic crosstalk and regulation in brain function and diseases. *Prog. Neurobiol.* **204**, 102089.
- Zhu H., Bannenberg G. L., Moldéus P., Shertzer H. G. (1994) Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlorofluorescein. *Arch. Toxicol.* **68**, 582–587.
- Zinnanti W. J., Lazovic J., Housman C., Lanoue K., O'Callaghan J. P., Simpson I., Wootner M., et al. (2007a) Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *J. Clin. Invest.* **117**, 3258–3270.
- Zinnanti W. J., Lazovic J., Housman C., LaNoue K., O'Callaghan J. P., Simpson I., Wootner M., et al. (2007b) Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *J. Clin. Invest.* **117**, 3258–70.
- Zinnanti W. J., Lazovic J., Wolpert E. B., Antonetti D. A., Smith M. B., Connor J. R., Wootner M., Goodman S. I., Cheng K. C. (2006) A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain* **129**, 899–910.

ANEXO I

Molecular Neurobiology - Submission guidelines

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

ORCID ID

- This publication requires that the corresponding author provides his/her ORCID ID before proceeding with submission.
- For more information about this journal’s ORCID policy, please visit the [ORCID FAQ](#)

TITLE PAGE

Title Page

Please use this template title page for providing the following information.

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author If available, the 16-digit ORCID of the author(s)
- If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.
- For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Abstract

- Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.
- For life science journals only (when applicable)
- Trial registration number and date of registration
- Trial registration number, date of registration followed by “retrospectively registered”

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Declarations

- All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations'.
- If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.
- To be used for non-life science journals

Funding (information that explains whether and by whom the research was supported)

Conflicts of interest/Competing interests (include appropriate disclosures)

Availability of data and material (data transparency)

Code availability (software application or custom code)

Authors' contributions (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

TEXT

Text Formatting

- Manuscripts should be submitted in Word.
- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

- Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.
- Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).
- Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.
- Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the

title page. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

- Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see ISSN.org LTWA

- If you are unsure, please use the full journal title.
- For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.
- Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format.
- MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the Figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc."
- Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

- In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that
- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and.tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

- In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that
- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about textrecycling ('self-plagiarism').

A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').

Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.

Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).

Research articles and non-research articles (e.g. Opinion, Review, and Commentary articles) must cite appropriate and relevant literature in support of the claims made. Excessive and inappropriate self-citation or coordinated efforts among several authors to collectively self-cite is strongly discouraged.

Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.

Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).

Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:

- an erratum/correction may be placed with the article
- an expression of concern may be placed with the article
- or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is maintained on the platform, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author's institution may be informed
- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions.

When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

AUTHORSHIP PRINCIPLES

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted. The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;

- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,

Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt et al, PNAS February 27, 2018

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or nonfinancial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*
- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For review articles where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the student's dissertation or thesis, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

- Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peerreview process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals

- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the abovementioned guidelines.

CONFLICTS OF INTEREST / COMPETING INTERESTS

Authors are requested to disclose interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3- year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work. Disclosure of interests provides a complete and transparent process and helps readers form their own judgments of potential bias. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate.

Interests that should be considered and disclosed but are not limited to the following:

Funding: Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number) and/or research support (including salaries, equipment, supplies, reimbursement for attending symposia, and other expenses) by organizations that may gain or lose financially through publication of this manuscript.

Employment: Recent (while engaged in the research project), present or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of this manuscript. This includes multiple affiliations (if applicable).

Financial interests: Stocks or shares in companies (including holdings of spouse and/or children) that may gain or lose financially through publication of this manuscript; consultation fees or other forms of remuneration from organizations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication of this manuscript.

It is difficult to specify a threshold at which a financial interest becomes significant, any such figure is necessarily arbitrary, so one possible practical guideline is the following: "Any undeclared financial interest that could embarrass the author were it to become publicly known after the work was published."

Non-financial interests: In addition, authors are requested to disclose interests that go beyond financial interests that could impart bias on the work submitted for publication such as professional interests, personal relationships or personal beliefs (amongst others). Examples include, but are not limited to: position on editorial board, advisory

board or board of directors or other type of management relationships; writing and/or consulting for educational purposes; expert witness; mentoring relations; and so forth.

Primary research articles require a disclosure statement. Review articles present an expert synthesis of evidence and may be treated as an authoritative work on a subject. Review articles therefore require a disclosure statement. Other article types such as editorials, book reviews, comments (amongst others) may, dependent on their content, require a disclosure statement. If you are unclear whether your article type requires a disclosure statement, please contact the

Editor-in-Chief.

Please note that, in addition to the above requirements, funding information (given that funding is a potential conflict of interest (as mentioned above)) needs to be disclosed upon submission of the manuscript in the peer review system. This information will automatically be added to the Record of CrossMark, however it is not added to the manuscript itself. Under 'summary of requirements' (see below) funding information should be included in the 'Declarations' section.

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Funding' and/or 'Conflicts of interests'/'Competing interests'. Other declarations include Ethics approval, Consent, Data, Material and/or Code availability and Authors' contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

When all authors have the same (or no) conflicts and/or funding it is sufficient to use one blanket statement.

Examples of statements to be used when funding has been received:

- Partial financial support was received from [...]
- The research leading to these results received funding from [...] under Grant Agreement No[...].
- This study was funded by [...]
- This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...])

Examples of statements to be used when there is no funding:

- The authors did not receive support from any organization for the submitted work.
- No funding was received to assist with the preparation of this manuscript.
- No funding was received for conducting this study.
- No funds, grants, or other support was received.

Examples of statements to be used when there are interests to declare:

- Financial interests: Author A has received research support from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company Wand owns stock in Company X. Author C is consultant to company Y.

Non-financial interests: Author C is an unpaid member of committee Z.

- Financial interests: The authors declare they have no financial interests.

Non-financial interests: Author A is on the board of directors of Y and receives no compensation as member of the board of directors.

- Financial interests: Author A received a speaking fee from Y for Z. Author B receives a salary from association X. X where s/he is the Executive Director.

Non-financial interests: none.

- Financial interests: Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M and Company N. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company O. Author D has received travel support from Company O.

Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M, Company N and Company O.

Examples of statements to be used when authors have nothing to declare:

- The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.
- The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.
- All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.
- The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS, THEIR DATA OR BIOLOGICAL

MATERIAL

Ethics approval

When reporting a study that involved human participants, their data or biological material, authors should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee) and certify that the study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration

of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that an independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the reasons for the exemption).

Retrospective ethics approval If a study has not been granted ethics committee approval prior to commencing, retrospective ethics approval usually cannot be obtained and it may not be possible to consider the manuscript for peer review. The decision on whether to proceed to peer review in such cases is at the

Editor's discretion.

Ethics approval for retrospective studies Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethics approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

Ethics approval for case studies

Case reports require ethics approval. Most institutions will have specific policies on this subject. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their institution and seek ethics approval where needed. Authors should be aware to secure informed consent from the individual (or parent or guardian if the participant is a minor or incapable) See also section on Informed Consent.

Cell lines

If human cells are used, authors must declare in the manuscript: what cell lines were used by describing the source of the cell line, including when and from where it was obtained, whether the cell line has recently been authenticated and by what method. If cells were bought from a life science company the following need to be given in the manuscript: name of company (that provided the cells), cell type, number of cell line, and batch of cells. It is recommended that authors check the NCBI database for misidentification and contamination of human cell lines. This step will alert authors to possible problems with the cell line and may save considerable time and effort.

Further information is available from the International Cell Line Authentication Committee (ICLAC).

Authors should include a statement that confirms that an institutional or independent ethics committee (including the name of the ethics committee) approved the study and that informed consent was obtained from the donor or next of kin.

Research Resource Identifiers (RRID)

Research Resource Identifiers (RRID) are persistent unique identifiers (effectively similar to a DOI) for research resources. This journal encourages authors to adopt RRIDs when reporting key biological resources (antibodies, cell lines, model organisms and tools) in their manuscripts.

Examples:

Organism: Filip1tm1a(KOMP)Wtsi RRID:MMRRC_055641-UCD

Cell Line: RST307 cell line RRID:CVCL_C321

Antibody: Luciferase antibody DSHB Cat# LUC-3, RRID:AB_2722109

Plasmid: mRuby3 plasmid RRID:Addgene_104005

Software: ImageJ Version 1.2.4 RRID:SCR_003070

RRIDs are provided by the Resource Identification Portal. Many commonly used research resources already have designated RRIDs. The portal also provides authors links so that they can quickly register a new resource and obtain an RRID.

Clinical Trial Registration

The World Health Organization (WHO) definition of a clinical trial is "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes". The WHO defines health interventions as "A health intervention is an act performed for, with or on behalf of a person or population whose purpose is to assess, improve, maintain, promote or modify health, functioning or health conditions" and a health-related outcome is generally defined as a change in the health of a person or population as a result of an intervention.

To ensure the integrity of the reporting of patient-centered trials, authors must register prospective clinical trials (phase II to IV trials) in suitable publicly available repositories. For example www.clinicaltrials.gov or any of the primary registries that participate in the WHO

International Clinical Trials Registry Platform.

The trial registration number (TRN) and date of registration should be included as the last line of the manuscript abstract.

For clinical trials that have not been registered prospectively, authors are encouraged to register retrospectively to ensure the complete publication of all results. The trial registration number (TRN), date of registration and the words 'retrospectively registered' should be included as the last line of the manuscript abstract.

Purely observational trials will not require registration.

Standards of reporting

Springer Nature advocates complete and transparent reporting of biomedical and biological research and research with biological applications. Authors are recommended

to adhere to the minimum reporting guidelines hosted by the EQUATOR Network when preparing their manuscript.

Exact requirements may vary depending on the journal; please refer to the journal's Instructions for Authors.

Checklists are available for a number of study designs, including:

Randomised trials (CONSORT) and Study protocols (SPIRIT)

Observational studies (STROBE)

Systematic reviews and meta-analyses (PRISMA) and protocols (Prisma-P)

Diagnostic/prognostic studies (STARD) and (TRIPOD)

Case reports (CARE)

Clinical practice guidelines (AGREE) and (RIGHT)

Qualitative research (SRQR) and (COREQ)

Animal pre-clinical studies (ARRIVE)

Quality improvement studies (SQUIRE)

Economic evaluations (CHEERS)

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Ethics approval'.

Examples of statements to be used when ethics approval has been obtained:

- All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of A (No. ...).
- This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No. ...).
- Approval was obtained from the ethics committee of University C. The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki.
- The questionnaire and methodology for this study was approved by the Human Research Ethics committee of the University of D (Ethics approval number: ...).

Examples of statements to be used for a retrospective study:

- Ethical approval was waived by the local Ethics Committee of University A in view of the retrospective nature of the study and all the procedures being performed were part of the routine care.

- This research study was conducted retrospectively from data obtained for clinical purposes.

We consulted extensively with the IRB of XYZ who determined that our study did not need ethical approval. An IRB official waiver of ethical approval was granted from the IRB of XYZ.

- This retrospective chart review study involving human participants was in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The Human

Investigation Committee (IRB) of University B approved this study.

Examples of statements to be used when no ethical approval is required/exemption granted:

- This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.
- The data reproduced from Article X utilized human tissue that was procured via our Biobank AB, which provides de-identified samples. This study was reviewed and deemed exempt by our XYZ Institutional Review Board. The BioBank protocols are in accordance with the ethical standards of our institution and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. This is especially true concerning images of vulnerable people (e.g. minors, patients, refugees, etc) or the use of images in sensitive contexts. In many instances authors will need to secure written consent before including images.

Identifying details (names, dates of birth, identity numbers, biometrical characteristics (such as facial features, fingerprint, writing style, voice pattern, DNA or other distinguishing characteristic) and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scholarly purposes and the participant (or parent/guardian if the participant is a minor or incapable or legal representative) gave written informed consent for publication.

Complete anonymity is difficult to achieve in some cases. Detailed descriptions of individual participants, whether of their whole bodies or of body sections, may lead to disclosure of their identity. Under certain circumstances consent is not required as long

as information is anonymized and the submission does not include images that may identify the person.

Informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort meaning.

Exceptions where it is not necessary to obtain consent:

- Images such as x rays, laparoscopic images, ultrasound images, brain scans, pathology slides unless there is a concern about identifying information in which case, authors should ensure that consent is obtained.
- Reuse of images: If images are being reused from prior publications, the Publisher will assume that the prior publication obtained the relevant information regarding consent. Authors should provide the appropriate attribution for republished images.

Consent and already available data and/or biologic material

Regardless of whether material is collected from living or dead patients, they (family or guardian if the deceased has not made a pre-mortem decision) must have given prior written consent. The aspect of confidentiality as well as any wishes from the deceased should be respected.

Data protection, confidentiality and privacy

When biological material is donated for or data is generated as part of a research project authors should ensure, as part of the informed consent procedure, that the participants are made aware what kind of (personal) data will be processed, how it will be used and for what purpose. In case of data acquired via a biobank/biorepository, it is possible they apply a broad consent which allows research participants to consent to a broad range of uses of their data and samples which is regarded by research ethics committees as specific enough to be considered “informed”. However, authors should always check the specific biobank/biorepository policies or any other type of data provider policies (in case of non-bio research) to be sure that this is the case.

Consent to Participate

For all research involving human subjects, freely-given, informed consent to participate in the study must be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16) and a statement to this effect should appear in the manuscript. In the case of articles describing human transplantation studies, authors must include a statement declaring that no organs/tissues were obtained from prisoners and must also name the institution(s)/clinic(s)/department(s) via which organs/tissues were obtained. For manuscripts reporting studies involving vulnerable groups where there is the potential for coercion or where consent may not have been fully informed, extra care will be taken by the editor and may be referred to the Springer Nature Research Integrity Group.

Consent to Publish

Individuals may consent to participate in a study, but object to having their data published in a journal article. Authors should make sure to also seek consent from individuals to publish their data prior to submitting their paper to a journal. This is in particular applicable to case studies.

A consent to publish form can be found here. (Download docx, 36 kB)

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Consent to participate' and/or 'Consent to publish'. Other declarations include Funding, Conflicts of interest/competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors' contribution statements. Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

Sample statements for "Consent to participate":

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. Informed consent was obtained from legal guardians.

Written informed consent was obtained from the parents.

Verbal informed consent was obtained prior to the interview.

Sample statements for "Consent to publish":

The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication of the images in Figure(s) 1a, 1b and 1c.

The participant has consented to the submission of the case report to the journal.

Patients signed informed consent regarding publishing their data and photographs.

Sample statements if identifying information about participants is available in the article:

Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Images will be removed from publication if authors have not obtained informed consent or the paper may be removed and replaced with a notice explaining the reason for removal.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer

Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – view the full list

Benefits:

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.
- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications. It is easy to find funding to support open access – please see our funding

and support pages for more information. *) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License