

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

RAFAEL TEIXEIRA RIBEIRO

**ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E NEUROCOMPORTAMENTAIS CAUSADAS
PELA ADMINISTRAÇÃO *IN VIVO* DO ÁCIDO L-2-HIDROXIGLUTÁRICO EM
RATOS NEONATOS E DISFUNÇÃO ENERGÉTICA PROVOCADA PELO ÁCIDO
D-2-HIDROXIGLUTÁRICO *IN VITRO* EM CORAÇÃO DE RATOS
ADOLESCENTES**

Porto Alegre

2023

Rafael Teixeira Ribeiro

**ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E NEUROCOMPORTAMENTAIS
CAUSADAS PELA ADMINISTRAÇÃO *IN VIVO* DO ÁCIDO L-2-
HIDROXIGLUTÁRICO EM RATOS NEONATOS E DISFUNÇÃO
ENERGÉTICA PROVOCADA PELO ÁCIDO D-2-HIDROXIGLUTÁRICO *IN
VITRO* EM CORAÇÃO DE RATOS ADOLESCENTES**

Tese 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 doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Wajner

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Ribeiro, Rafael Teixeira
ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E NEUROCOMPORTAMENTAIS
CAUSADAS PELA ADMINISTRAÇÃO IN VIVO DO ÁCIDO
L-2-HIDROXIGLUTÁRICO EM RATOS NEONATOS E DISFUNÇÃO
ENERGÉTICA PROVOCADA PELO ÁCIDO D-2-HIDROXIGLUTÁRICO
IN VITRO EM CORAÇÃO DE RATOS ADOLESCENTES / Rafael
Teixeira Ribeiro. -- 2023.
102 f.
Orientador: Moacir Wajner.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Acidúria L-2-Hidroxi-glutárica. 2. Acidúria
D-2-Hidroxi-glutárica. 3. Erros Inatos do Metabolismo.
4. Homeostase Redox. 5. Bioenergética. I. Wajner,
Moacir, orient. II. Título.

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

“She had studied the universe all her life, but had overlooked its clearest message: For small creatures such as we the vastness is bearable only through love.”

- Carl Sagan, Contact.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao meu orientador professor Moacir Wajner que sempre me incentivou a realizar um bom trabalho e proveu os meios para que minha tese virasse realidade, mas principalmente por todo incentivo, ensinamentos, carinho e respeito que venho recebendo ao longo de quase uma década de trabalho conjunto.

À Bianca Seminotti, ou simplesmente Bi, pelo acolhimento no laboratório 38 quando eu tinha acabado de ingressar na faculdade de farmácia e não sabia nem pipetar, e que através de sua ajuda, paciência, trabalho duro e por partilhar da sua experiência de bancada, conhecimento e amizade foi essencial na minha formação como pesquisador.

Ao professor Alexandre Amaral, pela contribuição fundamental em “questões mitocondriais” e por estar sempre disposto a ajudar.

À professora Simone Magagnin Wajner, que disponibilizou a estrutura e recursos de seu laboratório viabilizando as investigações nas células H9c2.

Ao professor Carlos Alexandre Netto e aos colegas do laboratório 35, pela parceria inestimável para realização das avaliações comportamentais.

Ao professor Guilhian Leipnitz, pela amizade e por estar sempre disponível a boa discussão científica que contribui muito para a qualidade das nossas investigações.

Ao Rafael Palavro, aluno de iniciação, que auxiliou de forma imensurável na realização deste trabalho.

Aos muitos colegas que passaram pelos laboratórios 38 e 34 durante a minha jornada, em especial a Ânge, Cris, Mateus e Bel, que juntamente com a “nova geração” de pós-graduandos formados pela Ângela, Júlia, Manuela e Josy tornam nosso grupo competente e com fortes vínculos de amizade.

Aos meus melhores amigos cientistas por todo aprendizado, leveza e companheirismo que eles demonstraram ao longo desses quase 4 anos. À Ana Cristina, por todo auxílio com as mitocôndrias cardíacas e corridas de oroboros e que mesmo estando um continente de distância, se mantem presente em pensamentos e no coração. Ao querido amigo e colega Rafael Marschner, pela energia contagiante, colaboração e tratamento das células às 5h da manhã, o qual sei que posso contar em todos os momentos. Às minhas amadas, Morgana e Camila, por todo aprendizado, risadas, viagens de férias coletivas e amizade que foram fundamentais pra eu conseguir superar com leveza e muitas risadas os desafios impostos por longos anos de pandemia.

Ao Andrey, meu companheiro e colaborador científico, por todo carinho, apoio, amizade e principalmente amor ao compartilhar sua vida comigo. Além é claro, do auxílio fundamental para execução e análise dos parâmetros comportamentais.

À minha vó Fátima, segunda mãe, que jamais mediu esforços para que eu realizasse meus sonhos.

À minha tia Léia, cujo acolhimento em Porto Alegre e as demonstrações diárias de carinho tornaram possível o início dessa longa jornada.

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

SUMÁRIO

RESUMO	2
PARTE I: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Acidúrias orgânicas	9
1.2. Acidúrias 2-hidroxi-glutáricas	10
1.3. Acidúria D-2-hidroxi-glutárica	10
1.3.1. Aspectos clínicos e neuropatológicos.....	12
1.4. Acidúria L-2-hidroxi-glutárica	12
1.4.1. Aspectos clínicos e neuropatológicos.....	13
1.5. Diagnóstico das acidúrias 2-hidroxi-glutáricas	14
1.6. Tratamento das acidúrias 2-hidroxi-glutáricas	14
1.7. Patogênese das acidúrias D- e L-2-hidroxi-glutáricas	15
1.8. Mitocôndria, Ciclo do Ácido Cítrico, Fosforilação Oxidativa, Cadeia Transportadora de Elétrons e Parâmetros Respiratórios	16
1.9. Papel da Mitocôndria sobre a Homeostase de Cálcio	18
1.10. Radicais Livres, Defesas Antioxidantes e Estresse oxidativo	19
1.11. Melatonina	20
1.12. Neuroinflamação	21
1.13. Mielina	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
PARTE II: ARTIGOS CIENTÍFICOS	27
CAPÍTULO I	28
CAPÍTULO II	51
PARTE III: DISCUSSÃO	64
PARTE IV: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	77
CONCLUSÕES	78
PERSPECTIVAS	80
REFERÊNCIAS	82

RESUMO

As acidúrias D-2-hidroxi glutárica (D-2-HGA) e L-2-hidroxi glutárica (L-2-HGA) são distúrbios neurometabólicos caracterizados bioquimicamente pelo acúmulo tecidual e elevada excreção urinária dos ácidos D-2-hidroxi glutárico (D-2-HG) e L-2-hidroxi glutárico (L-2-HG), respectivamente. A D-2HGA tipo 1 (D-2-HGA1) é causada por mutações patogênicas no gene que codifica a enzima mitocondrial D-2-hidroxi glutarato desidrogenase (D-2-HGDH), enquanto mutações de ganho de função da enzima isocitrato desidrogenase 2 (IDH2) são a causa da D-2HGA2. As manifestações clínicas da D-2HGA1 e D-2-HGA2 são predominantemente neurológicas tais como convulsões, hipotonia e atraso no desenvolvimento psicomotor, devido a isso são consideradas acidemias orgânicas cerebrais. No entanto, a D-2HGA2 é mais severa, manifestando-se no período neonatal com alto risco de vida causada pela cardiomiopatia que acomete metade dos pacientes, ocorrendo concomitante a graves manifestações neurológicas, enquanto a D-2HGA1 corresponde a uma variante mais branda da doença com sinais exclusivamente neurológicos. Por outro lado, a acidúria L-2-hidroxi glutárica (L-2-HGA) tem como causa mutações patogênicas no gene que codifica a enzima mitocondrial FAD-dependente L-2-hidroxi glutarato desidrogenase (L-2-HGDH). Os pacientes afetados pela L-2-HGA apresentam um fenótipo clínico mais brando, homogêneo e progressivo, apresentando exclusivamente sinais neurológicos, como atraso no desenvolvimento motor e cognitivo, epilepsia, ataxia cerebelar, macrocefalia e sintomas extrapiramidais, tais como tremor e distonia, sendo também considerada uma acidúria orgânica cerebral. A neuropatologia da D-2HGA é caracterizada por atraso na maturação cerebral e anormalidades na substância branca cerebral, com alargamento dos ventrículos laterais e alterações anatômicas nos gânglios da base, enquanto a L-2HGA apresenta alterações na substância branca (leucodistrofia) e anormalidades no córtex cerebral, nos núcleos da base (núcleo denteado, globo pálido, putamen e no núcleo caudado) e no cerebelo. Tendo em vista que a patogênese do dano cerebral nos pacientes afetados por essas doenças ainda é pouco conhecida, bem como da cardiomiopatia da D-2HGA2, a presente investigação teve por objetivo inicial avaliar os efeitos *ex vivo* da administração intracerebroventricular (icv) do L-2HG a ratos neonatos sobre a homeostase redox no cerebelo, bem como parâmetros imunohistoquímicos de viabilidade neuronal, reatividade astrocitária, ativação microglial e mielinização no córtex cerebral e estriado dos animais. Também foram avaliados os efeitos da administração icv de L-2-HG sobre o desenvolvimento neurocomportamental, motor e cognitivo. Em alguns experimentos, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com o antioxidante melatonina uma hora antes da administração icv de L-2HG. Por fim, avaliamos os efeitos *in vitro* do D-2-HG sobre a homeostase energética em coração de ratos adolescentes e em culturas de cardiomioblastos (H9c2). Inicialmente, avaliamos os efeitos do L-2-HG 6 horas após a administração icv sobre os parâmetros de homeostase redox no cerebelo. Os resultados mostraram que a administração de L-2-HG aumentou a oxidação da 2',7' - diclorofluoresceína (DCFH), refletindo uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), acompanhada de uma maior lipoperoxidação, determinada pelo aumento significativo nos níveis de malondialdeído (MDA). A injeção icv do metabólito provocou alterações do sistema antioxidante cerebelar, diminuindo as concentrações de glutathione reduzida (GSH) e aumentando as atividades das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), indicando um provável mecanismo compensatório com aumento da transcrição gênica dessas enzimas secundário a elevação das espécies reativas no cerebelo dos animais neonatos. Demonstramos também que o pré-tratamento com melatonina preveniu totalmente o aumento na produção de EROs, a lipoperoxidação e a diminuição do GSH, sem alterar as atividades

das enzimas antioxidantes. Na sequência, observamos nos dias pós-natais (DPN) 15 e 75, que a administração neonatal do metabólito aumentou significativamente o conteúdo da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e da proteína ligante de cálcio S100B, indicando aumento da reatividade astrocitária, bem como induziu a diminuição do número de células NeuN-positivas (perda neuronal), aumentou o conteúdo de Iba1 (ativação microglial) e redução das proteínas de mielina MBP e CNPase (distúrbio na mielinização) no córtex cerebral e no estriado. Além disso, a melatonina preveniu esses efeitos, sugerindo que o estresse oxidativo pode estar relacionado a esses efeitos deletérios do L-2-HG. Por fim, observou-se que uma única injeção icv de L-2-HG no período neonatal causou atraso no neurodesenvolvimento de ratos jovens e déficit cognitivo e motor nestes animais em idade adulta. Mais uma vez, a melatonina preveniu o comprometimento do desenvolvimento neuromotor e o déficit cognitivo provocado pelo L-2-HG. Em conjunto, nossos dados fornecem pela primeira vez evidências de vários mecanismos patológicos de dano cerebral causados pelo principal metabólito acumulado na L-2-HGA administrado a ratos neonatos e, mais importante, que a melatonina foi capaz de prevenir a maioria das alterações neuroquímicas, histológicas e comportamentais provocadas por este metabólito, indicando que o estresse oxidativo pode ser central na patogênese da L-2-HGA. Nesse particular, o uso de antioxidantes poderia representar uma nova estratégia terapêutica para a doença.

O presente trabalho também investigou a toxicidade do D-2-HG sobre o coração, estudando seus efeitos *in vitro* sobre um amplo espectro de parâmetros do metabolismo energético em coração de ratos jovens e em cardiomioblastos cultivados (H9c2). O D-2-HG inibiu a respiração celular em preparações mitocondriais purificadas e homogeneizados brutos de coração de ratos jovens, bem como em células H9c2. A produção de ATP e as atividades das enzimas citocromo c oxidase (complexo IV), alfa-cetoglutarato desidrogenase, citrato sintase e creatina quinase também foram inibidas pelo D-2-HG, enquanto as atividades dos complexos I, II e II-III da cadeia respiratória, glutamato, succinato e malato desidrogenases não foram alterados. Também verificamos que este ácido orgânico comprometeu a capacidade de retenção de Ca^{2+} mitocondrial em preparações mitocondriais de coração. Finalmente, o D-2-HG reduziu a viabilidade dos cardiomioblastos H9c2 cultivados, como determinado por uma diminuição do MTT e aumento da incorporação de iodeto de propídio. Enfatize-se que o L-2-HG não alterou alguns desses parâmetros (atividades do complexo IV e da creatina quinase) em preparações mitocondriais do coração, indicando um efeito inibitório seletivo do enantiômero D. Em conclusão, presume-se que o D-2-HG compromete a bioenergética mitocondrial e a capacidade de retenção de Ca^{2+} , o que pode contribuir potencialmente para a cardiomiopatia comumente observada na D2HGA2. Assim, drogas estimuladoras da respiração celular, tais como o bezafibrato, e a triheptanoína que é uma droga anaplerótica poderiam beneficiar os pacientes com essa doença.

ABSTRACT

D-2-hydroxyglutaric aciduria (D-2-HGA) and L-2-hydroxyglutaric aciduria (L-2-HGA) are neurometabolic disorders biochemically characterized by tissue accumulation and high urinary excretion of D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG) and L-2-hydroxyglutaric acid (L-2-HG), respectively. D-2HGA type 1 (D-2-HGA1) is caused by pathogenic mutations in the gene encoding the mitochondrial enzyme D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase (D-2-HGDH), while mutations with gain of function of the enzyme isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) causes D-2HGA2. The clinical manifestations of D-2HGA1 and D-2-HGA2 are predominantly neurological, including seizures, hypotonia and delayed psychomotor development, hence they are considered cerebral organic acidurias. However, D-2HGA2 is more severe, manifesting in the neonatal period with high risk of life caused by the cardiomyopathy that affects one third of patients, occurring concomitantly with severe neurological manifestations, while D-2HGA1 corresponds to a milder variant of the disease with exclusively neurological signs. On the other hand, L-2-hydroxyglutaric aciduria (L-2-HGA) is caused by pathogenic mutations in the gene encoding the mitochondrial FAD-dependent enzyme L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase (L-2-HGDH). Patients affected by L-2-HGA have a milder, homogeneous and progressive clinical phenotype, presenting exclusively neurological signs, such as delayed motor and cognitive development, epilepsy, cerebellar ataxia, macrocephaly and extrapyramidal symptoms, such as tremor and dystonia, being also considered a cerebral organic aciduria. The neuropathology of D-2HGA is characterized by delayed brain maturation and abnormalities in the cerebral white matter, with enlargement of the lateral ventricles and anatomical changes in the basal ganglia, while L-2HGA has white matter changes (leukodystrophy) and abnormalities in the cerebral cortex, the basal ganglia (dentate nucleus, globus pallidus, putamen, and caudate nucleus), and the cerebellum. Considering that the pathogenesis of brain damage in patients affected by these diseases is still poorly understood, as well as of D-2HGA2 cardiomyopathy, the present investigation initially aimed to evaluate the *ex vivo* effects of intracerebroventricular (icv) administration of L-2HG to neonatal rats on redox homeostasis in the cerebellum, as well as immunohistochemical parameters of neuronal viability, astrocyte reactivity, microglial activation, and myelination in the cerebral cortex and striatum of the animals. The effects of icv administration of L-2-HG on neurobehavioral, motor and cognitive development were also evaluated. In some experiments, animals were intraperitoneally pretreated with the antioxidant melatonin one hour before icv administration of L-2HG. Finally, we evaluated the *in vitro* effects of D-2-HG on energy homeostasis in adolescent rat hearts and in cardiomyoblast (H9c2) cultures. Initially, we evaluated the effects of L-2-HG 6 hours after icv administration on redox homeostasis parameters in the cerebellum. The results showed that L-2-HG administration increased the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH), reflecting an increased production of reactive oxygen species (ROS), accompanied by an increased lipoperoxidation, determined by a significant increase in malondialdehyde (MDA) levels. The icv injection of the metabolite also altered the brain antioxidant system, decreasing the concentrations of reduced glutathione (GSH) and increasing the activities of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD), indicating a likely compensatory mechanism with increased gene transcription of these enzymes secondary to the elevation of reactive species in the cerebellum of neonatal animals. We also demonstrated that pretreatment with melatonin totally prevented the increase in ROS production, lipid peroxidation and decrease in GSH, without altering the activities of the antioxidant enzymes. Subsequently, we observed at postnatal days (PND) 15 and 75, that neonatal administration of the metabolite significantly increased the content of glial fibrillary

acidic protein (GFAP) and calcium-binding protein S100B, indicating increased astrocyte reactivity, as well as induced a decrease in the number of NeuN-positive cells (neuronal loss), increased Iba1 content (microglial activation) and reduced myelin proteins MBP and CNPase (disturbance in myelination) in the cerebral cortex and striatum. Furthermore, melatonin prevented these effects, suggesting that oxidative stress may be involved in these deleterious effects. Finally, it was observed that a single icv injection of L-2-HG in the neonatal period caused delayed neurodevelopment in young rats and cognitive and motor deficits in these animals at adulthood. Once again, melatonin prevented the impairment of neuromotor development and cognitive deficit caused by L-2-HG. Taken together, our data provide for the first time evidence for several pathological mechanisms of brain damage caused by the major metabolite accumulated in L-2-HGA administered to neonatal rats and, more importantly, that melatonin was able to prevent most of the neurochemical, histological and behavioral changes caused by this metabolite, indicating that oxidative stress may be central to the pathogenesis of L-2-HGA. We propose that antioxidants may serve in the future as adjunctive therapy for patients with L-2-HGA.

The present work also investigated the toxicity of D-2-HG on the heart, studying its in vitro effects on a wide spectrum of energy metabolism parameters in young rat hearts and in cultured cardiomyocytes (H9c2). D-2-HG inhibited cellular respiration in purified mitochondrial preparations and crude homogenates from young rat hearts, as well as in H9c2 cells. ATP production and the activities of cytochrome c oxidase (complex IV) of the respiratory chain, as well as of alpha-ketoglutarate dehydrogenase, citrate synthase and creatine kinase were also inhibited by D-2-HG, while the activities of complexes I, II and II- II, glutamate, succinate and malate dehydrogenases were not altered. We also verified that this organic acid compromised the mitochondrial Ca^{2+} retention capacity in mitochondrial preparations from the heart and in H9c2 myoblasts. Finally, D-2-HG reduced the viability of cultured H9c2 cells, as determined by a decrease in MTT and by an increase in propidium iodide incorporation. It should be emphasized that L-2-HG did not change some of these parameters (complex IV and creatine kinase activities) in heart mitochondrial preparations, indicating a selective inhibitory effect of the D-enantiomer. In conclusion, it is assumed that D-2-HG compromises mitochondrial bioenergetics and Ca^{2+} retention capacity, which could potentially contribute to the cardiomyopathy commonly seen in D2HGA2. Thus, drugs that stimulate cellular respiration, such as bezafibrate, and triheptanoin, which is an anaplerotic drug, could benefit patients with this disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

2-HG – ácido 2-hidróxiglutárico

2-KG – α -cetogluturato

CAC – ciclo do ácido cítrico

CE-MS/MS – eletroforese capilar hifenizada com espectrometria de massa em tandem

CNPase – 2',3'-nucleotídeo cíclico 3'-fosfodiesterase

CRM – cadeia respiratória mitocondrial

D-2-HG – ácido D-2-hidroxiglutárico

D-2-HGA – acidúria D-2-hidroxiglutárica

D-2-HGA1 – acidúria D-2-hidroxiglutárica tipo 1

D-2-HGA2 – acidúria D-2-hidroxiglutárica tipo 2

D-2-HGDH – D-2-hidroxiglutarato desidrogenase

DCFH – 2',7'- diclorofluoresceína

DPN – dia pós-natal

ERN – espécie reativa de nitrogênio

ERO – espécie reativa de oxigênio

FAD – flavina adenina dinucleotídeo de sódio

GC-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

GFAP – proteína glial fibrilar ácida

GPx – glutationala peroxidase

GSH – glutationala reduzida

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HOT – hidróxiácido-oxoácido transidrogenase

Iba1 – molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1

ICV – intracerebroventricular

IDH2 – isocitrato desidrogenase 2

L-2-HG – ácido L-2-hidróxiglutárico

L-2-HGA – acidúria L-2-hidroxiglutárica

L-2-HGDH – L-2-hidroxiglutarato desidrogenase

L-malDH – L-malato desidrogenase
MBP – proteína básica da mielina
MDA – malondialdeído
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
NeuN - proteína nuclear neuronal
NMDA - N-metil-D-aspartato
NO• – óxido nítrico
O₂ – oxigênio molecular
O₂⁻ – ânion superóxido
OH• – radical hidroxila
ONOO⁻ – peroxinitrito
OPCs – células precursoras de oligodendrócitos
PTP - Poro de transição de permeabilidade mitocondrial
S100B – Proteína ligante de cálcio S100B
SNC – sistema nervoso central
SOD – superóxido dismutase
YKL040 – glicoproteína cartilaginosa 40

PARTE I: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidúrias orgânicas

As acidemias ou acidúrias orgânicas formam um grupo de doenças hereditárias metabólicas caracterizadas pelo acúmulo de um ou mais ácidos orgânicos nos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes afetados, sendo causadas pela deficiência da atividade de enzimas do metabolismo de aminoácidos, lipídeos ou carboidratos (Chalmers e Lawson, 1983). A frequência destas doenças na população em geral é pouco conhecida, o que pode ser creditado à falta de laboratórios especializados para o seu diagnóstico e ao desconhecimento médico sobre essas enfermidades. Na Holanda, país considerado referência para o diagnóstico de erros inatos do metabolismo, a incidência destas doenças é estimada em 1: 2.200 recém-nascidos, enquanto que, na Alemanha, Israel e Inglaterra é de aproximadamente 1: 6.000 - 1: 9.000 recém-nascidos (Hoffmann et al., 2004). Na Arábia Saudita, onde a taxa de consanguinidade é elevada, a frequência é de 1: 740 nascidos vivos (Rashed et al., 1994). Chalmers e colaboradores (Chalmers et al., 1980) demonstraram que as acidúrias orgânicas eram os erros inatos do metabolismo mais frequentes em crianças hospitalizadas, motivando diversos estudos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos a partir de então.

Clinicamente os pacientes afetados por acidúrias orgânicas apresentam predominantemente disfunção neurológica em suas mais diversas formas de expressão: convulsões, coma, ataxia, hipotonia, hipertonia, irritabilidade, tremores, movimentos coreatéticos, tetraparesia espástica, atraso no desenvolvimento psicomotor e outras manifestações (Wajner, 2019). As mais frequentes manifestações laboratoriais são cetonemia, cetonúria, neutropenia, trombocitopenia, acidose metabólica, baixos níveis de bicarbonato, hiperglicinemia, hiperamonemia, hipo/hiperglicemia, acidose láctica, aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres e outros (Beudet et al., 2014). A tomografia computadorizada e a ressonância magnética nuclear cerebrais revelaram alterações de substância branca (hipomielização e / ou desmielização), atrofia cerebral generalizada ou dos gânglios da base (necrose ou calcificação), megaencefalia, atrofia frontotemporal e atrofia cerebelar na maioria dos pacientes afetados por essas doenças (Mayatepek et al., 1996).

1.2. Acidúrias 2-hidroxi-glutáricas

O ácido 2-hidroxi-glutárico (2-HG) é um ácido dicarboxílico de 5 carbonos com uma hidroxila no carbono 2, o que confere a esta molécula um centro quiral que permite que este composto exista em duas conformações enantioméricas, ou seja, pode ser encontrado como ácido D-2-hidroxi-glutárico ou ácido L-2-hidroxi-glutárico (Figura 1).

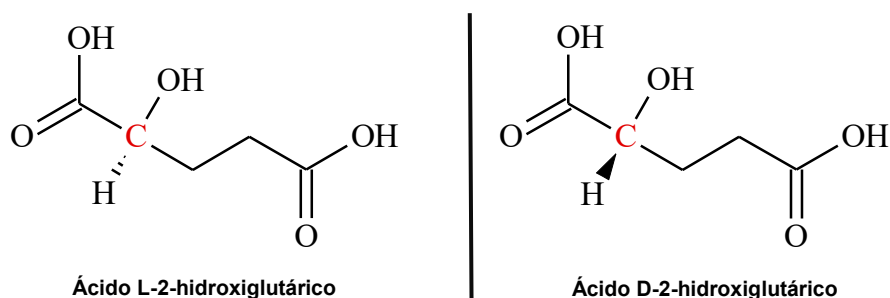


Figura 1. Estrutura química dos ácidos L-2-hidroxi-glutárico e D-2-hidroxi-glutárico destacando o carbono quiral em vermelho.

As duas formas enantioméricas do ácido 2-hidroxi-glutárico foram identificadas pela primeira vez como constituintes normais da urina humana em baixas concentrações (Gregersen et al., 1977). Em 1980, dois novos distúrbios hereditários do metabolismo caracterizados bioquimicamente por aumento desses enantiômeros foram descritos. Chalmers e colaboradores (Chalmers et al., 1980) identificaram um paciente com acidúria D-2-hidroxi-glutárica (D-2-HGA, OMIM # 600721 e OMIM # 613657), enquanto Duran e colaboradores (Duran et al., 1980) descreveram um caso de acidúria L-2-hidroxi-glutárica (L-2-HGA, OMIM # 236792), publicações estas que estabeleceram os marcadores bioquímicos (D-2-HG e L-2-HG) nessas duas doenças metabólicas distintas.

1.3. Acidúria D-2-hidroxi-glutárica

A acidúria D-2-hidroxi-glutárica (D-2-HGA) é uma doença neurometabólica autossômica recessiva, caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo tecidual e excreção aumentada do ácido D-2-hidroxi-glutárico (D-2-HG). Dois fenótipos distintos da D-2-HGA foram descritos: uma forma neonatal severa (tipo 1) (Kranendijk et al., 2010b) e uma variante infantil menos grave (tipo 2) (Kranendijk et al., 2010a).

Na década passada, estudos de biologia molecular foram capazes de estabelecer as bases moleculares que levam ao acúmulo do D-2-HG e assim começar a elucidar os fundamentos bioquímicos para a existência de dois fenótipos distintos de D-2-HGA. A

enzima mitocondrial hidróxiácido-oxoácido transidrogenase (HOT) catalisa a conversão do α -cetogluturato (2-KG) em D-2-HG (figura 2). Este metabólito, cuja função fisiológica ainda é desconhecida, é novamente convertido a 2-KG por ação da D-2-hidroxi-glutarato desidrogenase (D-2-HGDH) (figura 2). Uma mutação no gene que codifica a D-2-HGDH, provocando a diminuição ou perda total da atividade desta enzima, está associada ao aumento do D-2-HG, caracterizando bioquimicamente a acidúria D-2-hidroxi-glutárica tipo 1 (D-2-HGA1) (Kranendijk et al., 2010a).

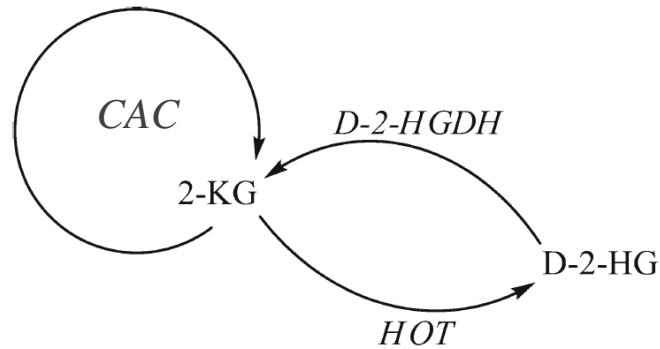


Figura 2. D-2-HG é formado a partir de 2-KG por ação da HOT. D-2-HGDH catalisa a conversão de D-2-HG a 2-KG. O acúmulo de D-2-HG em pacientes com D-2-HGA1 ocorre quando há deficiência da D-2-HGDH (Adaptado de *Kranendijk et al., 2012*).

Já a acidúria D-2-hidroxi-glutárica tipo 2 é causada por mutações no gene da isocitrato desidrogenase II (IDH2) (figura 3), que levam a um aumento de 8 vezes na atividade desta enzima e conferem a esta a capacidade de converter o alfa-cetogluturato em D-2-HG (Kranendijk et al., 2010b), sem alterar a atividade da HOT ou mesmo da D-2-HGDH.

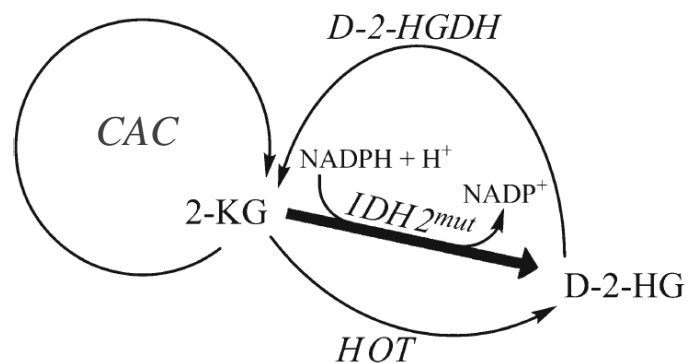


Figura 3. A IDH2 mutada ganha função de converter o 2-KG em D-2-HG. O D-2-HG também é formado pela HAT. A D-2-HGDH não consegue metabolizar completamente todo o D-2-HG gerado, resultando em acúmulo de D-2-HG em pacientes com D-2-HGA2 (Adaptado de *Kranendijk et al., 2012*).

1.3.1. Aspectos clínicos e neuropatológicos

As manifestações clínicas de ambos os fenótipos da D-2-HGA incluem retardo no desenvolvimento, hipotonia e convulsões. Contudo, alguns estudos demonstram que os pacientes acometidos pela D-2-HGA2 apresentam convulsões mais frequentes e o atraso no desenvolvimento é mais severo do que o observado em pacientes com D-2-HGA1. Além disso, cerca de metade dos pacientes com o tipo 2 apresenta cardiomiopatia (*Kranendijk et al., 2012*), achado este que pode ser potencialmente fatal. Por outro lado, a D-2-HGA1 é muito mais variável quanto à sintomatologia clínica do que a D-2-HGA2. Em determinados casos os pacientes não apresentam alterações neurológicas graves (D-2-HGA1). Já o fenótipo severo (D-2-HGA2) caracteriza-se principalmente por encefalopatia epilética de início neonatal ou infantil, além de movimentos distônicos ou coreoatetóticos e deficiência visual. Um terço dos pacientes morre durante a infância (*Kranendijk et al., 2012*).

Os achados neuropatológicos dos pacientes afetados são principalmente alargamento dos ventrículos laterais e alterações anatômicas nos gânglios da base. Além disso, um aumento dos espaços subaracnóides frontais, pseudocistos subependimais, sinais de atraso na maturação cerebral e anormalidades na substância branca cerebral com múltiplos focos são observadas por estudos de neuroimagem em ambos os fenótipos da D-2-HGA (*van der Knaap et al., 1999a, 1999b; Wajner et al., 2002*). Neste contexto, devido à disfunção neurológica severa e atrofia e outras anormalidades cerebrais apresentadas pelos pacientes, ambas as formas da D-2-HGA são classificadas como doenças neurometabólicas.

1.4. Acidúria L-2-hidroxi-glutárica

A acidúria L-2-hidroxi-glutárica (L-2-HGA), descrita primeiramente por Duran e colaboradores em 1980 e posteriormente caracterizada por Barth e colaboradores em 1983, é uma doença autossômica recessiva rara, considerada como uma acidemia orgânica cerebral, por afetar exclusivamente o sistema nervoso central (SNC). A única enzima conhecida por gerar L-2- HG em humanos é L-malato desidrogenase (L-malDH), cuja função catalítica primária é a conversão de L-malato em oxalacetato, mas que em

condições fisiológicas também catalisa a conversão do α -cetogluturato em L-2-HG (Fig. 4). O bloqueio metabólico presente nos pacientes afetados pela L-2-HGA deve-se à deficiência na atividade da enzima mitocondrial FAD-dependente L-2-hidroxiglutarato desidrogenase (L-2-HGDH, EC 1.1.99.2), como consequência de mutações patogênicas no gene *L2HGDH* localizado no cromossomo 14q21.3 (Rzem et al., 2004; Samuraki et al., 2008; Steenweg et al., 2010; Topçu et al., 2004). Essas mutações comprometem a atividade da L-2-HGDH, levando ao acúmulo do ácido L-2-hidroxiglutarato (L-2-HGH) no cérebro e nos líquidos biológicos dos pacientes, caracterizando-se como o principal achado bioquímico da L-2-HGA.

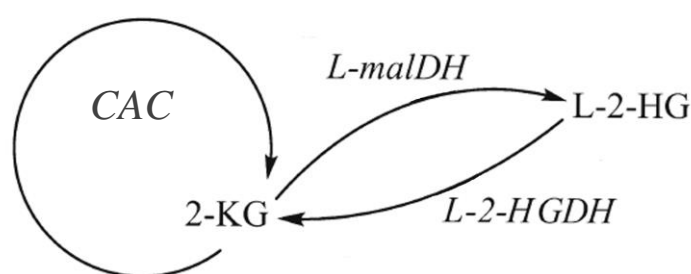


Figura 4. O L-2-HG é formado a partir de 2-KG por ação da L-malDH. O L-2-HGDH catalisa a conversão de L-2-HG a 2-KG. O acúmulo de L-2-HG em pacientes com L-2-HGA ocorre quando há deficiência da L-2-HGDH (Adaptado de *Kranendijk et al., 2012*).

1.4.1. Aspectos clínicos e neuropatológicos

Diferentemente dos pacientes com D-2-HGA, os pacientes acometidos pela L-2-HGA apresentam um fenótipo clínico homogêneo. As manifestações clínicas da doença podem começar a ser percebidas já na infância. Dentre eles podemos citar como principais o atraso no desenvolvimento motor e cognitivo, epilepsia e ataxia cerebelar (Steenweg et al., 2010). Geralmente a doença progride de forma lenta e progressiva, sendo que alguns pacientes com L-2-HGA com a forma mais branda podem permanecer sem diagnóstico até a adolescência, podendo ser diagnosticados apenas em idade adulta.

A maior parte dos pacientes acometidos pela L-2-HGA apresentam algum grau de déficit no desenvolvimento psicomotor e cerca de dois terços desenvolvem epilepsia e disfunção cerebelar. Além disso, aproximadamente metade dos pacientes possuem macrocefalia e sintomas extrapiramidais, incluindo tremor e distonia. Finalmente, um quarto dos pacientes acometidos pela L-2-HGA possuem problemas na fala (Kranendijk et al., 2012).

Os achados neuropatológicos dessa doença são principalmente anormalidades a nível cortical e subcorticais no núcleo dentado, globo pálido, putamen e no núcleo caudado, além de alterações cerebelares (Barbot et al., 1997; Barth et al., 1998; Gunduz et al., 2022; Kranendijk et al., 2012; Topçu et al., 2005). Conforme a doença progride, a intensidade das alterações na substância branca e nos gânglios da base começa a ficar mais difusa, seguida de atrofia da substância branca cerebral e ataxia cerebelar (Barbot et al., 1997; Steenweg et al., 2009).

1.5. Diagnóstico das acidúrias 2-hidroxi-glutáricas

O diagnóstico diferencial das acidúrias 2-hidroxi-glutáricas inicia com a avaliação clínica do paciente que possui um atraso no desenvolvimento não esclarecido e/ou que seja portador de disfunção neurológica de etiologia desconhecida, elevando o nível de suspeita para uma desordem metabólica. O diagnóstico para estas doenças inicia pela triagem urinária de ácidos orgânicos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) que revela um aumento nos níveis de 2-HG, sem revelar a forma do enantiômero e, portanto, do diagnóstico de D-2-HGA ou L-2-HGA. Contudo, a determinação da configuração quiral ainda precisa ser determinada e é feita por eletroforese capilar hifenizada com espectrometria de massa em tandem (CE-MS/MS) que permite a separação dos enantiômeros sem a etapa de derivatização (Švidrnoch et al., 2016). Embora as manifestações clínicas possam sugerir tanto D-2-HGA como L-2-HGA, a diferenciação quiral realizada através de CE-MS/MS é obrigatória para o correto diagnóstico diferencial e consequente confirmação de D-2-HGA ou L-2-HGA (Kranendijk et al., 2012). Subsequentemente, a caracterização genética e enzimática possibilita tanto confirmação de qual acidemia 2-hidroxi-glutárica o paciente é portador, bem como a diferenciação entre os 2 subtipos da D-2-HGA, representando uma importante informação para diagnóstico pré-natal futuro (Gibson et al., 1993b; Struys et al., 2004).

1.6. Tratamento das acidúrias 2-hidroxi-glutáricas

Até o momento não há tratamento disponível efetivo para a L-2-HGA e a D-2-HGA, embora riboflavina, carnitina e flavina adenina dinucleotídeo de sódio (FAD) são opções de tratamento que foram relatadas como benéficas e proporcionaram melhora parcial em dados limitados em L-2-HGA (Samuraki et al., 2008; Yilmaz, 2009). No que se refere à D-2-HGA, não há qualquer tratamento disponível. Tendo em vista a falta de

tratamento eficaz para essas doenças, tornou-se importante esclarecer a patogênese das mesmas que certamente facilitaria o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

1.7. Patogênese das acidúrias D- e L-2-hidroxi-glutáricas

Tendo em vista que as D-2-HGA tipo 1 e tipo 2 possuem como característica comum o acúmulo de D-2-HG nos fluidos corporais e principalmente no cérebro, é possível que o D-2-HG potencialmente contribui para a fisiopatologia das manifestações clínicas, tais como do atraso no desenvolvimento, hipotonia e epilepsia presentes em ambos os tipos da D-2-HGA. A superprodução de D-2-HG ocorre na mitocôndria, já que a D-2-HGDH e a IDH2 são enzimas mitocondriais. As concentrações de D-2-HG intracelular e mitocondriais são desconhecidas, já no plasma se sabe que, nos pacientes afetados, as concentrações do metabólito estão aumentadas de 30 a 840 vezes (26-757 μM) (Gibson et al., 1993a; Kranendijk et al., 2011, 2010a, 2010b). Os níveis de D-2HG no plasma de pacientes com o D-2-HGA2 são cerca de 5 vezes mais elevados do que nos pacientes com D-2-HGA1. Sabendo que os pacientes com o tipo 2 da doença apresentam sintomas mais severos do que os acometidos pelo tipo 1, sugere-se que possa existir uma correlação entre as concentrações de D-2-HG e a severidade da doença.

Por outro lado, há na literatura trabalhos demonstrando efeitos deletérios do D-2-HG sobre a bioenergética mitocondrial e a homeostase redox em tecidos de roedores e humanos com essa doença. Estudos *in vitro* demonstraram que a exposição de cérebro ao D-2-HG provocou diminuição da atividade da enzima creatina quinase e das atividades dos complexos IV e V da cadeia respiratória (da Silva et al., 2004, 2002; Kölker et al., 2002), além de induzir estresse oxidativo (Kölker et al., 2002; Latini et al., 2005, 2003b). Também foi demonstrado que a administração intraestriatal de D-2-HG a ratos Wistar de 30 dias induziu estresse oxidativo e algumas alterações histopatológicas (da Rosa et al., 2014) nesta estrutura cerebral. Além disso, o D-2-HG apresentou efeito excitotóxico em culturas primárias de neurônios de pintos através da ativação de receptores NMDA (Kölker et al., 2002). Recentemente, também foi demonstrado que a administração intracerebroventricular deste metabólito foi capaz de provocar estresse oxidativo, alterações bioenergéticas, morte neuronal e reatividade glial em ratos neonatos (Ribeiro et al., 2021). Por outro lado, a cardiotoxicidade exercida pelo D-2-HG já foi investigada em 2 estudos envolvendo modelos genéticos de D-2-HGA tipo 2 em roedores (Akabay et al., 2014; Wang et al., 2016), os quais demonstraram que o acúmulo do metabólito está diretamente relacionado a disfunção cardíaca em seus modelos animais e que o bloqueio

na produção deste metabólito foi capaz de melhorar a função cardíaca. No entanto, os mecanismos de cardiotoxicidade deste metabólito não foram investigados e permanecem desconhecidos.

No que se refere à L-2-HGA, ações neurotóxicas foram demonstradas para o L-2-HG. Assim, a exposição *in vitro* de tecidos cerebrais a concentrações elevadas de L-2-HG inibiu significativamente a atividade da creatina cinase em homogeneizado de cerebelo de ratos (da Silva et al., 2003), induziu estresse oxidativo (Latini et al., 2003a) e alterou a captação de glutamato em sinaptossomas e vesículas sinápticas (Junqueira et al., 2003), indicando disfunção bioenergética, bem como da homeostase redox e do sistema glutamatérgico como possíveis mecanismos fisiopatológicos para a L-2-HGA. Também foram demonstrados *in vivo* efeitos pró-oxidantes do L-2-HG em ratos adolescentes submetidos a injeção intraestriatal deste metabólito, bem como no córtex cerebral e estriado de ratos neonatos injetados intracerebroventricularmente (da Rosa et al., 2015; Ribeiro et al., 2018). No entanto, os efeitos de uma exposição a altas concentrações de L-2-HG no período neonatal sobre o cerebelo, estrutura cerebral muito afetada nessa condição patológica, bem como sobre estudos imunohistoquímicos com marcadores para astrogliose e neuroinflamação e morte neuronal, e também sobre o desenvolvimento motor e a cognição permanecem totalmente desconhecidos.

1.8. Mitocôndria, Ciclo do Ácido Cítrico, Fosforilação Oxidativa, Cadeia Transportadora de Elétrons e Parâmetros Respiratórios

As mitocôndrias são organelas recobertas por uma membrana externa, altamente permeável a pequenas moléculas e íons, e que possuem uma membrana interna impermeável à maioria das moléculas e íons (Nelson e Cox, 2017). Estas complexas estruturas subcelulares desempenham papel central no metabolismo energético por meio da fosforilação oxidativa (OXPHOS), respostas adaptativas ao estresse e de processos de biossíntese. Também desempenham papéis fundamentais em processos celulares, incluindo inflamação, homeostase redox e do cálcio, e morte celular (Bock e Tait, 2020; Faas e de Vos, 2020; Javadov et al., 2020; Nunnari e Suomalainen, 2012; Onishi et al., 2021; Popov, 2020).

Acetilcoenzima A ou outros intermediários oriundos do metabolismo da glicose, aminoácidos e ácidos graxos podem ser completamente oxidados a CO₂ no ciclo do ácido cítrico (CAC), produzindo as coenzimas reduzidas NADH (nicotinamida adenina

dinucleotídeo reduzido) e FADH_2 (flavina adenina dinucleotídeo reduzido), que irão suprir a cadeia respiratória mitocondria (CRM) (Nicholls e Ferguson, 2013).

A CRM é composta por vários complexos enzimáticos (complexos I, II, III, IV e V), os quais possuem grupamentos prostéticos especializados em exercer o papel de aceptores e doadores de elétrons, tendo a participação do citocromo c e uma coenzima lipossolúvel (coenzima Q). NADH e FADH_2 abastecem com elétrons os complexos I e II, respectivamente, sendo estas as vias convencionais de entrada de elétrons na CRM. O fluxo de elétrons através dos complexos da CRM é acompanhado ao bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, através dos complexos I, III e IV, gerando um gradiente eletroquímico que é utilizado pela ATP sintase (complexo V) para a síntese de ATP, e tendo o O_2 comoceptor final dos elétrons provenientes do complexo IV. Deste modo, a oxidação de substratos energéticos ligados ao CAC está acoplada ao processo de fosforilação do ADP (difosfato de adenosina), ou seja, quando a energia do gradiente eletroquímico é dissipada pelo fluxo de prótons de volta para a matriz mitocondrial, a energia liberada é utilizada pela ATP sintase para sintetizar moléculas de ATP (Nicholls e Ferguson 2013; Nelson e Cox 2021).

A existência de uma inter-relação de acoplamento entre os processos de transferência de elétrons, bombardeio de prótons, formação de gradiente eletroquímico e síntese de ATP com o consumo mitocondrial de oxigênio, faz com que a medida da quantidade de O_2 consumido seja um ótimo sensor da atividade do CRM. Experimentalmente, a respiração mitocondrial pode ser dividida em cinco estados respiratórios, sendo os estados 3 e 4 os mais amplamente utilizados. O estado 3 (estado fosforilante) é dado pelo consumo de oxigênio associado a oxidação de substratos capazes de fornecer elétrons à CRM em um meio suplementado com ADP, estimulando assim a produção de ATP. O estado 4 geralmente é estimulado por oligomicina, um inibidor da ATP sintase, refletindo o consumo de O_2 necessário para a formação e manutenção do gradiente eletroquímico, reduzindo a taxa da respiração (estado não-fosforilante). Ainda, é possível utilizar compostos desacopladores da fosforilação oxidativa que provocam um vazamento de prótons do espaço intermebrana para a matriz mitocondrial, estimulando a atividade da cadeia respiratória mitocondrial e o consumo de O_2 sem produção de ATP (estado desacoplado) (Nicholls e Ferguson, 2013).

1.9. Papel da Mitocôndria sobre a Homeostase de Cálcio

A manutenção da homeostase do cálcio celular, responsável pela sinalização e gerenciamento de uma série de atividades intracelulares, é uma das tarefas mais importantes desempenhadas pelas mitocôndrias. Quando íntegra e funcional, essa organela tem a capacidade de absorver cálcio do citosol ou liberá-lo, mantendo a concentração intracelular desse cátion em níveis ideais ao pleno funcionamento celular (Figueira et al., 2013; Rizzuto et al., 2012). A proteína transportadora mitocondrial responsável pela captação de cálcio foi recentemente elucidada, sendo um sistema uniporte de captação de cálcio (Baughman et al., 2011; de Stefani et al., 2011; Pan et al., 2013; Pendin et al., 2014). Por outro lado, a liberação de cálcio para a matriz é realizada pelos trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX) e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX) (Bernardi e von Stockum, 2012; Rizzuto et al., 2012).

A capacidade das mitocôndrias de absorver e reter cálcio é essencial para o tamponamento das concentrações citosólicas deste cátion, evitando flutuações que podem ser muito prejudiciais ao funcionamento celular (Figueira et al., 2013; Rizzuto et al., 2012). Contudo, uma alta taxa de absorção mitocondrial de cálcio, para além de sua capacidade de retenção, pode resultar em um estado chamado transição de permeabilidade, que é provocado pela abertura de um poro na membrana mitocondrial interna (Adam-Vizi e Starkov, 2010; Starkov, 2010; Zoratti e Szabò, 1995). Embora a identidade das proteínas que compõem o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP) permaneça desconhecida (Starkov, 2010), já se sabe que a ciclofilina D desempenha um papel crucial na abertura do PTP (Baines et al., 2005; Basso et al., 2005; Bernardi, 2013; Tanveer et al., 1996).

A célula pode sofrer graves consequências quando a abertura do PTP ocorre de forma permanente, incluindo a liberação de cálcio no citosol, inchamento mitocondrial, liberação de fatores apoptogênicos intramitocondriais como citocromo c (Liu et al., 1996), despolarização mitocondrial, perda de metabólitos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , glutathione reduzida (GSH), NADH e NADPH), prejuízo na síntese de ATP que, em última instância, resultam na morte da célula (Bernardi e von Stockum, 2012; Crompton, 1999; Rasola e Bernardi, 2011; Rizzuto et al., 2012). Inúmeros trabalhos *in vitro* e *in vivo* tem associado a indução do PTP com uma disfunção mitocondrial na presença de cálcio, demonstrando alteração nos parâmetros da homeostase bioenergética mitocondrial (Cecatto et al., 2020; Maciel et al., 2004; Mirandola et al., 2010). Além disso, o ataque oxidativo por espécies

reativas de oxigênio está descrito como um importante mecanismo potencializador da abertura do PTP (Adam-Vizi e Starkov, 2010; Kowaltowski et al., 2001). Neste contexto, altas concentrações de NADH previnem a abertura do PTP, por promover a redução do NADP⁺ catalisada pela transidrogenase mitocondrial e conseqüentemente melhoram a capacidade redox da mitocôndria (Hoek e Rydstrom, 1988; Lehninger et al., 1978; Zago et al., 2000).

1.10. Radicais Livres, Defesas Antioxidantes e Estresse oxidativo

Espécies reativas são moléculas ou átomos que frequentemente têm elétrons desemparelhados em seus orbitais, sendo capazes de existir independentemente, cuja instabilidade eletrônica promove uma maior propensão a reagir com outras moléculas ou átomos, levando a oxidação das mesmas (Halliwell, B., Gutteridge, 2015a; Southorn e Powis, 1988).

Sob condições fisiológicas, o O₂ é reduzido no complexo IV da CRM resultando na formação de H₂O. Todavia, centros redox presentes nos complexos da CRM, como nos complexos I e III, podem ser diretamente oxidados pelo O₂, resultando na transferência de um único elétron para essa molécula e gerando o ânion superóxido (O₂^{•-}). Por sua vez, a enzima superóxido dismutase (SOD) pode converter o O₂^{•-} a peróxido de hidrogênio (H₂O₂), uma espécie reativa com ausência de elétrons desemparelhados. O H₂O₂ pode reagir com Fe²⁺ dando origem ao radical hidroxila (OH[•]), um radical livre extremamente reativo. O O₂^{•-}, o H₂O₂ e o OH[•] fazem parte das chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs). Além das EROs, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), representadas principalmente pelo óxido nítrico (NO[•]) e o peroxinitrito (ONOO⁻) (Halliwell, B., Gutteridge, 2015a).

As espécies reativas atuam como moléculas sinalizadoras em funções fisiológicas cruciais, sendo essenciais para uma resposta celular adequada. A sinalização celular da insulina, adaptação ao exercício e a defesa contra infecções através da liberação de espécies reativas pelos neutrófilos são exemplos de processos significativamente influenciados pela geração fisiológica de EROs e ERNs (Aratani et al., 2012; Delanty e Dichter, 1998; Hamann et al., 2014; Irani, 2000; Wall et al., 2012; Webb et al., 2017). EROs e ERNs são constantemente gerados e eliminados por mecanismos de defesas antioxidantes endógenos. Contudo, quando produzidas em excesso, EROs e ERNs podem

ocasionar danos às células através da oxidação de biomoléculas, tais como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (Halliwell, B., Gutteridge, 2015a).

As defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas conferem as células um arsenal altamente especializado na detoxificação dos efeitos nocivos causados pelas espécies reativas. Essas defesas estão estrategicamente distribuídas em diferentes compartimentos celulares e tecidos e compreendem agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas SOD, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx); proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo) ao se ligarem aos mesmos, como as transferrinas; agentes que aprisionam espécies reativas e que são substratos de enzimas antioxidantes, como a GSH; além de proteínas que protegem biomoléculas de danos por outros mecanismos (Halliwell, B., Gutteridge, 2015b, 2015c).

Em situações onde o aumento de espécies reativas é relativamente pequeno, a resposta antioxidante será suficiente para compensar esse aumento. Entretanto, sob certas condições patológicas, a produção de espécies reativas estará aumentada, e as defesas antioxidantes podem ser insuficientes para restabelecer a homeostase redox (Halliwell e Gutteridge, 2015). Este rompimento do equilíbrio entre eventos pró-oxidantes e a capacidade antioxidante é descrito como estresse oxidativo, e pode representar um mecanismo central na fisiopatologia de doenças humanas (Halliwell, 2006). O estresse oxidativo ser resultado de uma produção aumentada de oxidantes quanto tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a combinação de quaisquer desses fatores (Halliwell, B., Gutteridge, 2015a).

Um nível moderado de estresse oxidativo pode ser tolerado pela maioria das células, o que muitas vezes causa um aumento na produção de enzimas antioxidantes para ajudar a neutralizar o excesso de espécies reativas. Em contrapartida, se o dano celular adjacente ao estresse oxidativo ocorrer de forma exacerbada, a célula pode sofrer morte celular por necrose ou apoptose (Halliwell e Gutteridge, 2015).

1.11. Melatonina

A melatonina é um hormônio neuroendócrino derivado do triptofano que é produzido e liberado principalmente pela glândula pineal em resposta a diminuição da luminosidade e está envolvido na regulação de funções biológicas, como sono, ritmo circadiano, imunidade e reprodução (Cipolla-Neto e Amaral, 2018). Para além de suas

ações fisiológicas, a melatonina tem demonstrado um potencial antioxidante em um número crescente de situações fisiológicas e patológicas. A melatonina exerce sua ação antioxidante através de uma variedade de mecanismos que envolvem a desintoxicação (scavenger) de EROs e ERNs e indiretamente através do aumento na expressão de enzimas antioxidantes (Pieri et al., 1994; Reiter et al., 2016). Além dessas ações bem descritas, a melatonina também pode quelar metais de transição, que estão envolvidos nas reações de Fenton/Haber-Weiss, reduzindo a formação do radical hidroxila que é considerado o radical livre mais tóxico (Gulcin et al., 2003). A distribuição intracelular ubíqua, mas desigual, da melatonina, incluindo suas altas concentrações nas mitocôndrias, provavelmente ajuda em sua capacidade de combater o estresse oxidativo e a apoptose celular (Reiter et al., 2016, 2013). A melatonina também demonstrou efeitos neuroprotetores, especialmente no que diz respeito ao SNC, em inúmeros modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* de distúrbios hereditários do metabolismo, frente ao estresse oxidativo induzido por metabólitos acumulados nestas doenças (da Silva et al., 2017; Moura et al., 2018; Ribeiro et al., 2021; Seminotti et al., 2019a).

1.12. Neuroinflamação

Respostas imunológicas agudas e de longo prazo são desencadeadas pelo sistema imunológico para manter a integridade e a funcionalidade dos tecidos e órgãos, mantendo assim um equilíbrio contínuo entre as agressões e as defesas teciduais. A resposta inflamatória no SNC é conhecida como neuroinflamação e é caracterizada pela ativação de células gliais, principalmente micróglia e astrócitos, sendo uma resposta de defesa do organismo contra um estímulo que induz dano (Ramos et al., 2017). A microglia é formada por células imunes inatas de origem mieloide que se instalam no SNC durante a embriogênese, tendo como função crucial a capacidade de gerar respostas imunes inatas e adaptativas significativas (Lenz e Nelson, 2018; Yang et al., 2010). A neuroinflamação geralmente tem início com o recrutamento e ativação da micróglia local em resposta a fatores de sinalização liberados pelo tecido neuronal (Hines et al., 2009; Kreutzberg, 1996).

Durante o processo de ativação microglial ocorrem alterações em termos de morfologia, tamanho, expressão de proteínas de superfície, bem como no perfil de citocinas e fatores de crescimento que são produzidos em grande quantidade (Norden et al., 2016). Dentre as alterações fisiológicas que promovem a modificação do fenótipo quiescente para a forma ativada da micróglia, destaca-se o aumento na expressão da

molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba1), fazendo com que esta proteína seja considerada um excelente marcador de ativação microglial (Hovens et al., 2014; Sasaki et al., 2001). A partir dessas alterações, a micróglia é capaz de fagocitar "restos" biológicos, incluindo corpos apoptóticos, e uma variedade de patógenos e partículas exógenas através de vias de fagocitose bem estabelecidas (Chan et al., 2003; Fu et al., 2014).

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no cérebro, que para além de funções de suporte aos neurônios, desempenham papéis ativos e essenciais na homeostase cerebral (Oksanen et al., 2019). Estas células regulam o fluxo sanguíneo, mantêm a barreira hematoencefálica (BHE), fornecem substratos energéticos aos neurônios, modulam a atividade sináptica, controlam a secreção de neurotrofinas, além de regular o equilíbrio extracelular de íons, fluidos e neurotransmissores (Kwon e Koh, 2020). Os astrócitos são reguladores cruciais das respostas imunes inatas e adaptativas no SNC. No entanto, a atividade exagerada dos astrócitos pode exacerbar reações inflamatórias e danos teciduais contribuindo para o estabelecimento do processo de neuroinflamação, ou promover imunossupressão e reparo tecidual (Colombo e Farina, 2016). Alterações na expressão molecular e morfologia dos astrócitos mediadas pela proteína glial fibrilar ácida (GFAP) podem indicar a gravidade da astrogliose reativa, sendo essa proteína considerada um marcador de reatividade astrocitária associado a inúmeras patologias que acometem o SNC (Sofroniew, 2009). Desta forma, na doença de Alzheimer, a proteína GFAP, bem como a proteína ligante de cálcio S100B, a glicoproteína cartilaginosa 40 (YKL040) e a D-serina são consideradas como biomarcadores de reatividade astrocitária no LCR, enquanto a GFAP e a S100B são biomarcadores séricos (Carter et al., 2019). Expressiva reatividade astrocitária durante as fases iniciais de patologias, incluindo lesão medular e encefalomielite autoimune experimental, são consistentemente correlacionados com resultados clínicos exacerbados, neuroinflamação, alteração da barreira hematoencefálica e morte neuronal (Colombo e Farina, 2016).

A neuroinflamação está presente em doenças neurodegenerativas comuns como as doenças de Parkinson e Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica. Nessas enfermidades o processo neuroinflamatório caracteriza-se por elevação nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias e na produção de espécies reativas que pode resultar na morte celular sob certas condições (Smith et al., 2012). Uma resposta neuroinflamatória aumentada também foi demonstrada em vários modelos experimentais de distúrbios hereditários do

metabolismo, tais como acidemia glutárica tipo I, hiperglicinemia, aciduria D-2-hidroxi glutárica e deficiência de S-adenosilhomocisteína hidrolase (Amaral et al., 2018; Guerreiro et al., 2021; Moura et al., 2016; Olivera-Bravo et al., 2015; Ribeiro et al., 2021; Seminotti et al., 2022a, 2019b)

1.13. Mielina

A bainha de mielina, estrutura formada por uma membrana lipídica rica em glicerofosfolipídios e colesterol, é gerada por longos prolongamentos da membrana plasmática que os oligodendrócitos estendem em camadas concêntricas ao redor dos axônios, facilitando a rápida comunicação entre os neurônios e assim elevando a velocidade dos potenciais de ação neuronais (Nave, 2010). A alta velocidade que ocorre a neurotransmissão saltatória em neurônios mielinizados só é possível graças a mielina, que reduz a capacitância e aumenta a resistência transversal ao longo do eixo da membrana axonal, diminuindo substancialmente a quantidade de energia necessária para restaurar as concentrações de íons em repouso após cada despolarização (Duncan et al., 2021).

Durante o neurodesenvolvimento as células precursoras de oligodendrócitos (OPCs) se multiplicam e se movem do neuroepitélio da zona ventricular/subventricular do cérebro para a substância branca em formação no sistema nervoso central (SNC). Após a identificação dos axônios-alvo, as OPCs se diferenciam em oligodendrócitos mielinizantes e dão início ao processo de crescimento da membrana e o envolvimento dos axônios ocorre logo depois (Simons and Nave, 2015). Os oligodendrócitos e neurônios têm uma relação de sinalização recíproca, na qual os oligodendrócitos recebem sinais dos axônios direcionando sua mielinização. Além disso, os oligodendrócitos também fornecem fatores tróficos para os axônios, lactato como combustível energético e têm papel fundamental na manutenção da integridade axonal (Dulamea, 2017; Duncan et al., 2021).

Nos mamíferos, o processo de mielinização no SNC é caracterizado pelo aparecimento tardio pré-natal e/ou pós-natal, crescimento e diferenciação de células precursoras de oligodendrócitos (OPCs) em oligodendrócitos maduros. Estudos recentes demonstraram que as OPCs mantêm sua capacidade proliferativa mesmo no SNC adulto, com variações regionais relacionadas à idade nas taxas de proliferação e maturação destas células, o que torna esta propriedade alvo de estratégias terapêuticas inovadoras para

doenças desmielinizantes (de Almeida et al., 2022; Fernandez-Castaneda and Gaultier, 2016; Hughes et al., 2013; Young et al., 2013).

Proteínas específicas desempenham um papel crucial em todas as etapas do processo de mielinização, desde a identificação do axônio até a compactação final e manutenção da bainha de mielina (Fulton et al., 2010). A proteína básica da mielina (MBP) é a proteína de maior prevalência na mielina. A MBP auxilia no processo de compactação e manutenção da estrutura da mielina por manter a adesão das faces citoplasmáticas da membrana celular (Fulton et al., 2010; Tzakos et al., 2005). A calmodulina é um dos ligantes de MBP mais bem estudados, quando ativada por cálcio, ela interage com a MBP, promovendo a estabilização da estrutura da mielina (Wang et al., 2011). Outra importante proteína constitutiva da mielina é a 2',3'-nucleotídeo cíclico 3'-fosfodiesterase (CNPase), compreendendo cerca de 4% do total das proteínas da mielina. A CNPase está relacionada à organização do citoesqueleto através da interação com heterodímeros de tubulina, induzindo a montagem de microtúbulos por copolimerização, auxiliando assim na regulação do crescimento de processo mielinizantes dos oligodendrócitos (Fulton et al., 2010; Lee et al., 2005).

Hipomielinização e desmielinização são alterações que têm sido relatadas em muitas doenças neurológicas, podendo ser causadas por danos aos oligodendrócitos, prejuízos na maturação de OPCs ou produção ineficiente de proteínas específicas da mielina (Han et al., 2013; Motavaf e Piao, 2021; Wang et al., 2018). Nesse particular, foi demonstrado *in vivo* que as células oligodendrocíticas (OPCs e maduros) representam a subpopulação celular do SNC mais vulnerável ao estresse oxidativo, podendo sofrer oxidação do DNA, nitração de proteínas e peroxidação de lipídeos, acarretando em prejuízos na capacidade mielinizante destas células (Giacci et al., 2018).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Esta tese objetivou investigar os efeitos da administração intracerebroventricular de L-2-HG a ratos neonatos (DPN1) sobre parâmetros da homeostase redox, marcadores imunohistoquímicos de dano neuronal, reatividade glial e mielinização em estruturas cerebrais de ratos jovens e adultos no intuito de esclarecer mecanismos fisiopatológicos da neurodegeneração observada em pacientes portadores da L-2-HGA. O desenvolvimento neuromotor, a motricidade e a cognição de ratos injetados no período neonatal com o L-2-HG também foram investigados. As ações neuroprotetoras da melatonina sobre as alterações neuroquímicas, histológicas e comportamentais causadas pelo L-2-HG também foram avaliadas. Finalmente foi investigada a influência do D-2-HG sobre importantes funções mitocondriais (metabolismo energético e retenção mitocondrial de cálcio) em preparações mitocondriais e homogeneizados de coração de ratos jovens, bem como em células H9c2 cultivados para avaliar se um comprometimento dessas funções mitocondriais poderia potencialmente contribuir para a cardiomiopatia apresentada pelos pacientes afetados pela D-2-HGA2.

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar os efeitos da administração icv do L-2-HG (0.75 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal) a ratos neonatos (DPN1) sobre parâmetros de estresse oxidativo (oxidação de DCFH, níveis de MDA, concentrações de GSH e a atividade das enzimas antioxidantes GPx e SOD) no cerebelo 6 horas após a injeção.
- b) Avaliar a influência da administração icv do L-2-HG (0.75 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal) a ratos neonatos sobre parâmetros imunohistoquímicos de reatividade astrocitária (GFAP e S100B), dano ou morte neuronal (NeuN), neuroinflamação (Iba1) e mielinização (MBP e CNPase) em estriado e córtex cerebral dos animais nos DPN15 e 75.
- c) Avaliar a influência da administração icv do L-2-HG (0.75 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal) a ratos neonatos sobre o desenvolvimento neuromotor, motricidade e cognição nos DPN7 e 45, respectivamente.

- d) Avaliar o efeito neuroprotetor da melatonina sobre as alterações neuroquímicas, imunohistoquímicas e comportamentais causadas pela injeção icv do L-2-HG a ratos neonatos.
- e) Avaliar os efeitos *in vitro* do ácido D-2-HG sobre um amplo espectro de parâmetros do metabolismo energético (respiração mitocondrial, produção de ATP, atividades dos complexos da cadeia respiratória, atividade de enzimas do CAC, da glutamato desidrogenase e da creatina cinase, bem como sobre a capacidade mitocondrial de retenção de cálcio e parâmetros de viabilidade) em preparações celulares (mitocondriais purificadas e homogeneizados) de coração de ratos jovens e/ou em cardiomioblastos cultivados (células H9c2).

PARTE II: ARTIGOS CIENTÍFICOS

CAPÍTULO I

L-2-hydroxyglutaric acid administration to neonatal rats elicits marked neurochemical alterations and long-term neurobehavioral disabilities mediated by oxidative stress

Rafael Teixeira Ribeiro, Andrey Vinícios Soares Carvalho, Rafael Palavro, Luz Elena Durán-Carabali, Ângela Beatris Zemniçak, Alexandre Umpierrez Amaral, Carlos Alexandre Netto, Moacir Wajner

Artigo científico publicado em

Neurotoxicity Research (2022)

CAPÍTULO II

Disruption of mitochondrial bioenergetics, calcium retention capacity and cell viability caused by D-2- hydroxyglutaric acid in the heart

Rafael Teixeira Ribeiro, Ana Cristina Roginski, Rafael Aguiar Marschner, Simone Magagnin Wajner, Roger Frigério Castilho, Alexandre Umpierrez Amaral, Moacir Wajner,

Artigo científico publicado em

BIOCHIMIE (2022)

PARTE III: DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Indivíduos afetados pelas D-2-HGA e L-2-HGA, apresentam sintomatologia clínica predominantemente neurológica, incluindo crises epiléticas graves, hipotonia, atraso no desenvolvimento psicomotor e ataxia, bem como atrofia cerebral com hipo/desmielinização (leucodistrofia) e outras anormalidades cerebrais cujos mecanismos patogênicos são ainda pouco conhecidos (Kranendijk et al., 2012; Steenweg et al., 2009). Aproximadamente metade dos pacientes com a forma mais grave de D-2-HGA (tipo 2) também apresentam alterações cardíacas que podem os levar ao desfecho fatal nos primeiros anos de vida e cujos mecanismos são praticamente desconhecidos. Estudos prévios, particularmente *in vitro*, mas também *ex vivo*, utilizando cérebro de ratos jovens (ratos Wistar com 30 dias de vida) demonstraram efeitos deletérios dos metabólitos acumulados nessas doenças (D-2-HG e L-2-HG) sobre o metabolismo energético, homeostase redox, além de algumas alterações do sistema glutamatérgico (da Rosa et al., 2014; da Silva et al., 2002; Junqueira et al., 2004; Kölker et al., 2002; Latini et al., 2005, 2003b).

No entanto, como as manifestações clínicas dessas doenças podem ocorrer já no período perinatal ou no primeiro ano de vida dos afetados, é fundamental investigar o efeito desses ácidos orgânicos em modelos neonatais, mimetizando a situação nos pacientes em que o acúmulo de D-2-HG e L-2-HG já ocorrem no nascimento ou mesmo antes. Nesse particular, um estudo recente de nosso grupo de pesquisa revelou que a administração *icv* de D-2-HG a ratos neonatos causou danos oxidativos aos lipídios, medido pelo aumento significativo nos níveis de malondialdeído (MDA), em estriado e córtex cerebral dos animais neonatos (Ribeiro et al., 2021). Também foi verificado que o D-2-HG aumentou a formação de grupamentos carbonila no córtex cerebral (dano oxidativo proteico) bem como a oxidação da 2',7' - diclorofluoresceína (DCFH) no córtex e no estriado, indicando aumento de EROs, nessas estruturas cerebrais, além de elevar as concentrações de nitratos e nitritos (parâmetro que avalia ERNs) no cérebro total. Finalmente, foi observado que o D-2-HG diminuiu as concentrações de GSH e elevou as atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT, indicando um provável mecanismo compensatório com aumento da transcrição gênica secundário a elevação das espécies reativas. Outros resultados interessantes desse trabalho foram as observações de que o dano oxidativo aos lipídeos e proteínas e o aumento da produção de espécies reativas induzido por D-2-HG foram prevenidos pelo pré-tratamento dos animais com o

antioxidante melatonina e o antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA MK-801, indicando o envolvimento de espécies ativas e dos receptores NMDA nesses efeitos. O mesmo estudo mostrou ainda que além das alterações neuroquímicas, houve dano no córtex cerebral e estriado (menos intenso) com vacuolização e redução do número de neurônios sugestivo de morte neuronal, além de intensa reatividade.

Por outro lado, verificamos em um estudo anterior que a administração icv aguda do L-2-HG a ratos neonatos causa estresse oxidativo e algumas alterações patológicas, incluindo formação de vacúolos e edema cerebral mais intensamente no córtex cerebral dos animais (Ribeiro et al., 2018). Também foi verificado nesse estudo que a melatonina e o MK-801 preveniram a lipoperoxidação e a diminuição de GSH no córtex cerebral e estriado dos ratos neonatos.

Dessa forma, o primeiro objetivo da presente investigação foi estudar se a administração icv de L-2-HG poderia também comprometer a homeostase redox no cerebelo de ratos neonatos, que corresponde a uma estrutura cerebral com severas anormalidades na ressonância magnética nuclear de pacientes da L-2-HGA, resultando em ataxia, bastante comum nos pacientes afetados por essa doença (Gunduz et al., 2022). Enfatize-se que não há estudos *in vitro* ou *ex vivo* na literatura sobre ações deletérias do L-2-HG sobre o cerebelo em idade neonatal. Verificamos que a administração icv do L-2-HG à ratos neonatos aumentou significativamente a produção de espécies ativas, determinada pelo aumento da oxidação do DCFH, que reflete predominantemente EROs (Halliwell e Gutteridge, 2015), no cerebelo dos animais 6 horas após a injeção. Já que houve aumento da produção de espécies ativas, testamos se esse aumento poderia provocar dano oxidativo aos lipídico e verificamos que o L-2-HG causou um aumento significativo dos níveis de MDA (produto final de peroxidação de ácidos graxos insaturados, representando um bom marcador de lipoperoxidação) no cerebelo. Salienta-se que a lipoperoxidação pode afetar membranas lipídicas das células, resultando em alterações na organização das mesmas, bem como na fluidez e na permeabilidade, podendo prejudicar o transporte de íons e os processos metabólicos (Yadav e Ramana, 2013).

Com relação às defesas antioxidantes, verificamos que o L-2-HG causou uma diminuição significativa nas concentrações de GSH no cerebelo, que pode ser ocasionado por um maior consumo provocado pelo aumento da produção de radicais livres observado neste tecido. Tendo em vista que o GSH desempenha um papel fundamental na manutenção do estado redox intracelular por ser o antioxidante não enzimático mais abundante no cérebro e também ser um eficiente protetor de grupos sulfidril, bem como um sequestrador de radicais livres, as concentrações desse antioxidante são utilizadas para avaliar a capacidade de um tecido em prevenir o dano oxidativo associado ao processo de produção de radicais livres (Halliwell, B., Gutteridge, 2015a). Assim, uma diminuição destas concentrações torna o cerebelo mais vulnerável ao dano oxidativo as suas biomoléculas, incluindo lipídeos.

Finalmente verificamos que a administração neonatal do L-2-HG provocou aumento significativo da atividade das enzimas GPx e SOD no cerebelo. Acreditamos que o aumento das atividades dessas enzimas tenha ocorrido devido à indução da expressão das mesmas a nível gênico por um mecanismo compensatório em resposta ao aumento na formação de espécies reativas, principalmente do radical superóxido e do peróxido de hidrogênio, mas essa hipótese requer estudos adicionais para que se possa estabelecer os mecanismos exatos que levaram ao aumento dessas atividades enzimáticas. Neste particular, é sabido que as EROs regulam a expressão de inúmeros genes, incluindo aqueles que codificam para enzimas antioxidantes por vias de sinalização específicas (Halliwell, B., Gutteridge, 2015a; Lakshminarayanan et al., 1998; Rushmore et al., 1991)..

Outros resultados que julgamos bastante importantes da presente investigação foram que o pré-tratamento dos ratos neonatos com a melatonina, uma hora antes da administração icv de L-2-HG, foi capaz de prevenir completamente, os efeitos pró-oxidantes do metabólito sobre o aumento dos níveis de MDA, formação de espécies ativas, pois normalizou o aumento da oxidação de DCFH, bem como a diminuição das concentrações de GSH. Esses resultados reforçam a hipótese de que o dano oxidativo lipídico, bem como a diminuição das defesas antioxidantes no cerebelo tenham sido causadas pela elevação da especialmente EROs, mais particularmente os radicais hidroxila e peroxil que sofrem ação “scavenger” da melatonina (Anisimov et al., 2006; Halliwell, B., Gutteridge, 2015c; Reiter et al., 2001). No entanto, o pré-tratamento com melatonina não foi capaz de normalizar o aumento das atividades da GPx e SOD mediada

pela injeção do metabólito, sugerindo que outras espécies reativas que não o superóxido e o peróxido de hidrogênio ou mesmo outros mecanismos estão envolvidos neste aumento de atividade das enzimas antioxidantes em resposta ao insulto pró-oxidante do L-2-HG.

O próximo passo de nossa investigação foi determinar se esse metabólito poderia alterar marcadores de dano cerebral no córtex e estriado, que também são lesados nos pacientes afetados por essa doença (Kranendijk et al., 2012; Weimar et al., 2013). Avaliamos os efeitos da administração icv de L-2-HG no período neonatal sobre marcadores de neurônios, astrócitos, micróglia e mielinização através de técnicas de imunofluorescência realizadas aos DPN15 e 75.

No que se refere a esses marcadores histoquímicos, a presente investigação mostrou pela primeira vez que a administração icv de L-2-HG em ratos neonatos causou efeitos de longa duração observados ao DPN15 e 75 dos animais, tais como perda neuronal (diminuição do número de células marcadas com NeuN), astrogliose (aumento de S100B e GFAP) e neuroinflamação (aumento de Iba1) no estriado e córtex cerebral.

A astrogliose, ou aumento da reatividade astrocitária, corresponde geralmente a uma condição desencadeada por dano ao SNC e caracterizada pela ativação e hipertrofia de astrócitos com aumento da expressão de marcadores astrocitários (S100B e GFAP), e, em casos graves, proliferação intensa dessas células (Anderson et al., 2014; Sofroniew e Vinters, 2010). Em condições fisiológicas, tais alterações astrocitárias têm o potencial de proteger os neurônios circundantes, mas em casos extremos os astrócitos podem perder funções essenciais, produzindo fatores potencialmente tóxicos, comprometendo e exacerbando o dano neuronal, como observado em diversas doenças neurodegenerativas (De Keyser et al., 2008; McGeer e McGeer, 2008; Nagele et al., 2004; Olivera-Bravo et al., 2011).

Já a diminuição significativa do número de células neurais marcadas com NeuN indica dano e/ou perda neuronal (Ünal-Çevik et al., 2004; Wolf et al., 1996). Enfatize-se que perda neuronal associada à astrogliose foi observada no cérebro de uma criança de 1 mês de idade com L-2-HGA (Chen et al., 1996). É possível, portanto, que esses achados histopatológicos possam ter sido devidos ao aumento nas concentrações cerebrais de L-2-HG.

Uma outra observação original do presente trabalho foi que a injeção neonatal de L-2-HG aumentou o conteúdo de Iba1 em ratos adolescentes e adultos, considerado um

excelente marcador de ativação da microglia durante processos inflamatórios (Hoogland et al., 2015; Sasaki et al., 2001). Enfatize-se que a ativação microglial pode levar à produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres (Norden et al., 2016; Seminotti et al., 2019b; Wirths et al., 2010), e em seu conjunto levando à neuroinflamação.

Verificamos também que um aumento transitório dos níveis de L-2-HG no SNC no período perinatal alcançado pela injeção de L-2-HG desencadeou uma lesão duradoura da substância branca no córtex cerebral e estriado no DPN75, determinada pela diminuição da imunofluorescência das proteínas associadas a mielina MBP e CNPase, que poderia explicar a hipomielinização observada em pacientes e no modelo genético animal de L-2HGA (Gunduz et al., 2022; Jović et al., 2014; Kranendijk et al., 2012; Rzem et al., 2015; Topçu et al., 2005).

Um outro aspecto inédito de nosso estudo foi que essas alterações neuroquímicas de longa duração foram totalmente prevenidas (NeuN, MBP e CNPase) ou atenuadas (Iba1, GFAP, S100B) pelo pré-tratamento com o antioxidante melanonina. Portanto, considerando observações prévias demonstrando que o L-2-HG induz estresse oxidativo no córtex cerebral e estriado de ratos adolescentes e jovens (da Rosa et al., 2015; Latini et al., 2003a; Ribeiro et al., 2018), aliadas aos resultados da presente investigação, mostrando os efeitos benéficos da melatonina sobre as alterações imunohistopatológicas induzidas por esse ácido orgânico acumulado na L-2-HGA, sugerimos o envolvimento dessa condição patológica nos efeitos neurotóxicos provocados pela injeção neonatal de L-2-HG. Tomados em seu conjunto, acreditamos que a neurotoxicidade induzida por L-2-HG parece exigir uma interação celular múltipla e complexa que, após um desencadeamento inicial induzido por níveis cerebrais tóxicos de L-2-HG, se autoperpetua durante semanas, levando ao dano progressivo de neurônios, astrócitos e proteínas mielinizantes.

Por outro lado, tendo em vista que os pacientes afetados pela L-2-HGA apresentam atraso no desenvolvimento motor e cognitivo, bem como alterações motoras e de equilíbrio (ataxia), e que a doença progride de forma lenta e progressiva (Gunduz et al., 2022; Steenweg et al., 2010), resolvemos avaliar o neurodesenvolvimento, a motricidade e cognição dos animais, que receberam administração icv com L-2-HG no período neonatal, ao longo do seu desenvolvimento e na idade adulta. A avaliação de marcos do desenvolvimento neuromotor e cognitivo é de suma importância para aferir o

impacto de um dano perinatal em modelos animais experimentais (Horvath et al., 2015), podendo representar uma ferramenta essencial para rastrear o desenvolvimento dos animais pós-injeção com o L-2-HG e assim entender se nosso modelo químico é capaz de mimetizar os achados característicos da L-2-HGA. Assim, iniciamos por determinar os efeitos do L-2-HG sobre uma bateria de testes de neurodesenvolvimento ao longo das primeiras semanas de vida. Relativamente à abertura de olhos, verificamos que os animais L-2-HG tiveram um atraso de um dia na abertura total de ambos os olhos (DPN13), o que pode sugerir uma maturação do sistema visual prejudicada pela administração de L-2-HG (Guan et al., 2017; Katz e Shatz, 1996; Pecka et al., 2014).

Outros testes utilizados para estudar o desenvolvimento neuromotor dos ratos foram o endireitamento, teste de aversão à borda e geotaxia negativa no DPN7. Nossos dados mostram que os animais que receberam a injeção de L-2-HG apresentaram uma resposta sensorio-motora deficiente, evidenciada por uma menor latência na realização de geotaxia negativa e endireitamento e uma pontuação diminuída no teste de aversão à borda. Também avaliamos se a administração de L-2-HG poderia causar distúrbios do desenvolvimento neuromotor associados à locomoção (teste de marcha) e força do tônus muscular (suspensão dos membros posteriores) no DPN7. A injeção icv de L-2-HG provocou uma diminuição acentuada da capacidade de marcha e da força muscular nos animais, o que está de acordo com as manifestações clínicas de alterações motoras observadas em pacientes com L-2HGA, onde se destaca a hipotonia, como um sintoma clássico de disfunção neurológica, sendo o achado mais prevalente nos estágios iniciais da doença (Kranendijk et al., 2012).

É importante ressaltar que o pré-tratamento com melatonina dos animais injetados com L-2-HG foi capaz de atenuar os déficits de neurodesenvolvimento na maioria dos testes aqui avaliados, denotando um efeito neuroprotetor desse antioxidante em nosso modelo experimental de L-2HGA. Nesse contexto, a melatonina tem sido amplamente empregada como agente neuroprotetor no combate ao estresse oxidativo, neuroinflamação e sinalização pró-apoptótica associada a diversas neuropatologias (Chitimus et al., 2020; Elsayed et al., 2021; Victor et al., 2021; Wakatsuki et al., 2001).

Déficits motores e cognitivos são características clínicas predominantes em pacientes com L-2-HGA e, à medida que a doença progride, a ataxia cerebelar e outros distúrbios motores tornam-se mais evidentes (Gunduz et al., 2022; Kranendijk et al., 2012; Steenweg et al., 2010). Neste estudo, verificamos que o L-2-HG causou déficit

motor no período neonatal, que persistiu na vida adulta, conforme verificado pela avaliação da função motora grosseira avaliada pelo teste do rota-rod e motricidade fina avaliada pelo teste de caminhada em escada no DPN45 dos animais. Nesse contexto, Gunduz et al (2022) correlacionaram movimentos irregulares e respostas somatossensoriais prejudicadas em pacientes com L-2-HGA com atrofia cerebelar. Assim, a perda acentuada de neurônios, reatividade glial e, principalmente, a desmielinização observada no córtex cerebral e estriado concomitante aos déficits motores mediados pela injeção icv de L-2-HG, demonstram o enorme potencial do nosso modelo para mimetizar os achados observados na L2HGA.

Observações em camundongos nocaute deficientes da enzima L-2-hidroxioglutarato desidrogenase ($l2hgdh^{-/-}$) revelaram lesões espongiiformes da substância branca, mais acentuadamente nas regiões subcorticais e gânglios da base, e mais moderadas no córtex cerebral, cerebelo e hipocampo, bem como déficits cognitivos relacionados à evocação de memória de trabalho e de referência avaliadas pelos testes de labirinto em Y e labirinto aquático Morris, respectivamente (Rzem et al., 2015). Em consonância com os dados do modelo genético, também encontramos um comprometimento da memória de trabalho, verificado pelo protocolo de memória de trabalho do labirinto aquático de Morris, mas sem alterar a memória de referência. Diferente da memória de referência, que é dependente do hipocampo, a memória de trabalho é principalmente dependente de conexões neuronais associadas ao córtex pré-frontal e ao cerebelo (Stein, 2021). Nossa hipótese é que uma possível razão pela qual não identificamos deficiências na memória de referência de longo prazo pode estar envolvida com um baixo envolvimento hipocampal em nosso modelo químico de L2HGA. Finalmente, observamos que o pré-tratamento com melatonina foi capaz de prevenir completamente os distúrbios motores a longo prazo e atenuar os déficits cognitivos induzidos pela injeção icv de L-2-HG.

Considerando que as concentrações cerebrais de L-2-HG em pacientes com L-2-HGA ainda não são bem estabelecidas, existindo apenas um relato recente na literatura que demonstrou através do uso de técnica de espectroscopia por ressonância magnética, demonstrando que as concentrações intracerebrais do metabólito podem atingir valores acima de 4 mM (Anghileri et al., 2016), é concebível que dose utilizadas neste trabalho (0,750 μ mol/g de peso) seja condizente com as concentrações encontradas em pacientes com L-2-HGA. Cabe também ressaltar que o L-2-HG se acumula no cérebro dos

pacientes devido à produção local e pela dificuldade que os ácidos dicarboxílicos tem de sair do SNC por não haver transportadores efetivos para esses compostos deixarem o tecido cerebral (Sauer et al., 2010), exercendo dessa forma seus efeitos neurotóxicos.

Em conclusão, este é o primeiro relato mostrando que a administração *in vivo* de L-2-HG a ratos neonatos prejudica a homeostase redox no cerebelo logo após a injeção icv e que o distúrbio do estado redox dessa estrutura pode ser prevenido pelo potente antioxidante melatonina. Tendo em vista os dados aqui apresentados, aliados a estudos anteriores em modelos *in vitro* (Latini et al., 2003a) e *in vivo* (da Rosa et al., 2015, 2014; Ribeiro et al., 2018) em roedores, podemos presumir que um desequilíbrio da homeostase redox causado por concentrações elevadas de L-2-HG pode potencialmente contribuir, pelo menos em parte, para as alterações neurológicas que acomete os pacientes com L-2-HGA. Nesse particular, a presente investigação também demonstrou efeitos de longa duração nas principais estruturas cerebrais danificadas na L-2HGA (córtex cerebral e estriado), tais como perda neuronal, astrogliose, ativação da micróglia associada à neuroinflamação e alterações de mielinização que podem ser parcialmente secundárias ao estresse oxidativo, visto que a melatonina também preveniu ou atenuou a maioria dessas alterações imunohistoquímicas provocadas L-2-HG.

Por estas razões, é possível que os resultados da presente investigação (Figura 5), agindo sinergicamente com outros fatores intrínsecos (severidade das mutações patogênicas) e extrínsecos, podem potencialmente contribuir para explicar a fisiopatologia dos sintomas neurológicos e anormalidades cerebrais observadas nos pacientes afetados pela L-2-HGA. Caso nossos resultados neste modelo animal *in vivo* possam ser confirmados nos modelos nocaute dessas doenças e em tecidos (fibroblastos cultivados) de indivíduos afetados por L-2-HGA, é tentador especular que antioxidantes poderiam ser suplementados aos pacientes afetados como uma terapia adjuvante potencial para prevenir ou atenuar o dano oxidativo que parece estar atrelado à patologia desta doença.

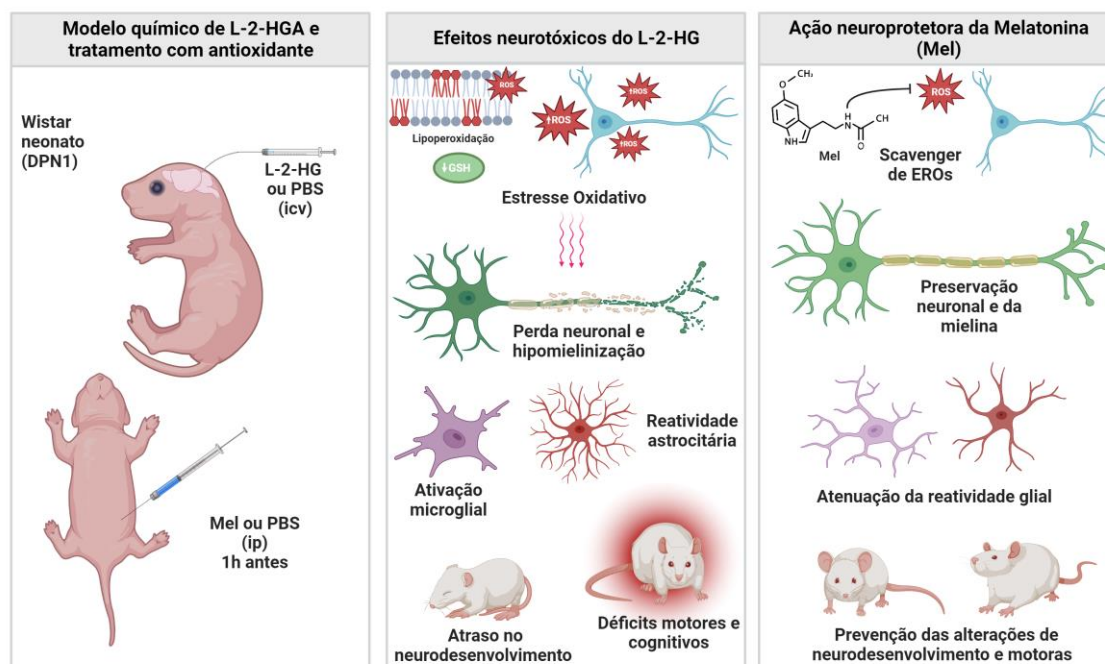


Figura 5. Mecanismos de neurotoxicidade medidos pelo L-2-HG. A administração intracerebroventricular do metabólito causa estresse oxidativo expressivo levando a dano neuronal, reatividade glial, hipomielinização e prejuízos no neurodesenvolvimento, atividade motora e cognição. A figura também mostra o papel neuroprotetor da melatonina (Mel) prevenindo os efeitos deletérios induzidos pelo L-2-HG.

A outra parte desse estudo objetivou avaliar os efeitos do D-2-HG, que se encontra bastante elevado na D-2-HGA, sobre funções mitocondriais críticas no coração de ratos adolescentes (30 dias de vida), uma vez que, pacientes com a D-2-HGA2 frequentemente desenvolvem cardiomiopatia que pode os levar à morte e que, por outro lado, os mecanismos precisos da cardiotoxicidade ainda são pouco conhecidos na D-2-HGA2. Nesse particular, convém salientar que pacientes afetados por D-2-HGA documentados excretam quantidades aumentadas de intermediários do ciclo de lactato e ácido cítrico ou ácidos dicarboxílicos, sugerindo uma disfunção mitocondrial primária ou funcional (van der Knaap et al., 1999a).

A hipótese de que o acúmulo de D-2-HG pode representar um fator determinante na cardiomiopatia que acomete pacientes com D-2-HGA2 é corroborada pelos estudos que demonstram que o uso de inibidores seletivos de IDH2 foram capazes de reduzir a produção de D-2-HG e, em paralelo, melhoraram as funções cardíacas e preveniram a cardiomiopatia em modelos de camundongos com D-2HGA2 (Akabay et al., 2014; Wang et al., 2016). No entanto, os mecanismos celulares subjacentes que levam ao dano cardíaco em D-2HGA2 permanecem pouco compreendidos.

Em nosso estudo, verificamos que o D-2-HG comprometeu marcadamente a bioenergética mitocondrial em várias preparações de coração de ratos em desenvolvimento, bem como em cardiomiócitos cultivados. Esse metabólito inibiu a respiração em mitocôndrias cardíacas purificadas, bem como em condições nas quais as mitocôndrias estavam dentro de um sistema celular integrado que mais se assemelha à condição *in vivo* (células H9c2 permeabilizadas e homogeneizados de coração). Também observamos que o D-2-HG inibiu acentuadamente a atividade da citocromo *c* oxidase (complexo IV) nas células H9c2, o que corrobora com estudos prévios realizados *in vitro* e *in vivo* em cérebro de ratos (da Silva et al., 2002; Ribeiro et al., 2021), músculo esquelético e coração (Latini et al., 2005), bem como em células THP-1 (linha celular monocítica humana) (Chan et al., 2015). Outro resultado interessante e original de nosso trabalho foi que o D-2-HG causou uma redução na atividade das enzimas citrato sintase e α -cetoglutarato desidrogenase, o que pode potencialmente levar a um bloqueio do CAC e subsequente diminuição do fornecimento de coenzimas reduzidas para a cadeia de transporte de elétrons, possivelmente contribuindo com o comportamento de inibidor metabólico de D-2-HG sobre a respiração mitocondrial. A inibição dessas atividades enzimáticas, mais especificamente da α -cetoglutarato desidrogenase, pode potencialmente explicar resultados anteriores demonstrando que o D-2-HG causou uma redução da produção de CO₂ a partir de acetato e de glicose no coração e músculo esquelético de ratos, respectivamente, indicando um comprometimento da glicólise aeróbica e/ou atividade do CAC nesses tecidos (Latini et al., 2005).

Observamos também que o D-2-HG inibiu a atividade da creatina cinase (CK) em células H9c2, o que aliado aos outros efeitos aqui observados na respiração mitocondrial, pode agravar ainda mais a homeostase energética celular. Além disso, nosso presente achado de inibição de CK induzida por D-2-HG em cardiomioblastos está de acordo com estudos anteriores *in vitro* e *in vivo* demonstrando que D-2-HG causa inibição de CK em cérebro de rato (da Silva et al., 2004; Ribeiro et al., 2021).

Outra observação original e importante do presente estudo foi que o D-2-HG reduziu acentuadamente a capacidade das mitocôndrias cardíacas de reter Ca²⁺, prejudicando, portanto, a homeostase celular do Ca²⁺ que é vital para a contratilidade dos cardiomiócitos (Drago et al., 2012; Luo e Anderson, 2013). Este efeito foi provavelmente ligado à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP), uma vez

que a ciclosporina A, um inibidor clássico de MPT, impediu totalmente a redução da capacidade de retenção de Ca^{2+} induzida por D-2-HG.

Por fim, demonstramos que o D-2-HG diminuiu a viabilidade celular, determinada por ensaios de incorporação de MTT e PI em células H9c2 cultivadas. D-2-HG diminuiu significativamente a formação de formazan (ensaio do MTT), indicando baixa atividade de desidrogenases (esta sonda está intimamente ligada à atividade de desidrogenases mitocondriais) e/ou à perda de viabilidade celular (Rai et al., 2018). D-2-HG também causou um aumento significativo do número de células PI-positivas, apoiando ainda mais que este metabólito promove a morte celular ou ao menos lesão de membrana plasmática de células cardíacas. A associação entre disfunção mitocondrial e morte celular foi relatada anteriormente em vários trabalhos avaliando mecanismos fisiopatológicos em doenças cardíacas (Ong e Gustafsson, 2012; Rosenberg, 2004). Assim, nossos achados apontam para uma disfunção mitocondrial secundária causada pelo D-2-HG no coração, inibindo várias funções mitocondriais causadas pelo metabólito que mais se acumula neste distúrbio.

Concluindo, se os presentes resultados forem confirmados em tecidos (fibroblastos cultivados) de pacientes com D2HGA2, presume-se que os mecanismos patológicos aqui descritos (Figura 6) levando a disfunção mitocondrial possam estar relacionados com a cardiomiopatia dos pacientes afetados por essa doença e possam também contribuir para o desenvolvimento de novas terapias destinadas a melhorar a disfunção mitocondrial nesta doença, incluindo por exemplo agentes promotores da biogênese mitocondrial (agonistas PPAR, como o bezafibrato) ou agentes anapleróticos (triptanoína) já utilizados em algumas doenças hereditárias do metabolismo intermediário (Dabner et al., 2021; Karunanidhi et al., 2022; Seminotti et al., 2022b; Shiraishi et al., 2021; Vockley et al., 2022, 2021). A triptanoína por ser um triacilglicerol com cada ácido graxo contendo 7 carbonos, quando metabolizada gera duas acetil-Coa e um propionil-Coa por unidade de ácido graxo. Assim, a triptanoína serve como fonte de intermediários do CAC e conseqüentemente ajuda no combatendo a deficiência energética dos tecidos com alta demanda de acetil-Coa, como cérebro e coração (Vockley et al., 2022).

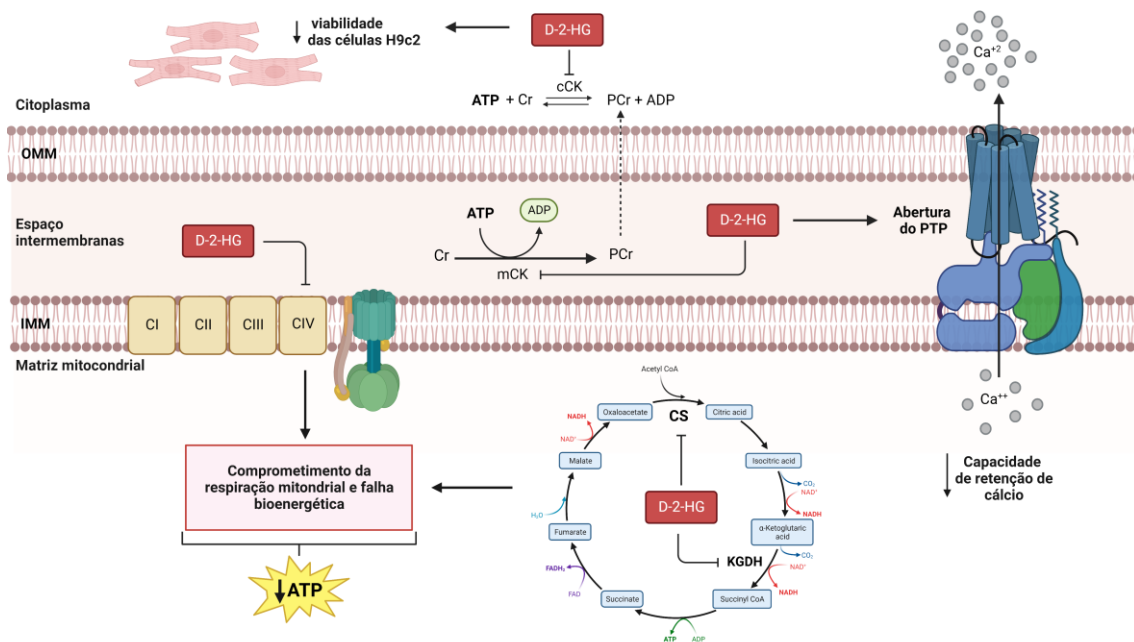


Figura 6. Mecanismos de mitotoxicidade provocados pelo ácido D-2-hidroxi glutárico (D-2-HG) no coração. A figura mostra os efeitos inibitórios de D-2-HG nas atividades da citocromo c oxidase (CIV), creatina quinase citosólica e mitocondrial (cCK e mCK), citrato sintase (CS) e α -cetoglutárico desidrogenase (KGDH), como bem como um comprometimento da respiração mitocondrial e produção de ATP. D-2-HG também diminuiu a capacidade de retenção de cálcio mitocondrial com o envolvimento da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP). Por fim, a viabilidade dos cardiomiócitos foi reduzida pelo D-2-HG possivelmente devido às ações sinérgicas de todos esses mecanismos de disfunção mitocondrial. Cr, creatina; IMM, membrana mitocondrial interna, OMM, membrana mitocondrial externa; PCr, fosfocreatina.

PARTE IV: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CONCLUSÕES

- A administração intracerebral de L-2-HG aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio, provocou dano oxidativo lipídico e alterou as defesas antioxidantes no cerebelo de ratos neonatos 6 horas após a injeção. A maioria desses efeitos foi prevenida pelo potente antioxidante melatonina, implicando que a geração de espécies reativas pode estar subjacente ao estado redox celular alterado. Além disso, o L-2-HG foi capaz de induzir efeitos de longa duração (15 e 75 dias após a injeção), tais como perda neuronal (diminuição do número de células NeuN positivas), astrogliose (aumento das concentrações de GFAP e S100B), ativação microglial, neuroinflamação (aumento dos níveis da proteína Iba1) e distúrbios na mielinização (diminuição na concentração das proteínas de mielina MBP e CNPase) no córtex cerebral e estriado dos animais, cujos efeitos foram totalmente prevenidos ou atenuados pela melatonina, sugerindo que a produção aumentada de espécies ativas possa ter contribuído para essas alterações imunohistoquímicas. Atrasos no neurocomportamentais, bem como, déficits motores e cognitivos de ratos adultos mediados pelo L-2-HG foram atenuados ou prevenidos pelo pré-tratamento com melatonina, indicando a ação do estresse oxidativo nessas alterações comportamentais.
- Em resumo, a administração neonatal de L-2-HG, principal metabólito acumulado na L-2-HGA, provoca estresse oxidativo no cerebelo logo após a injeção, bem como diminuição da quantidade de neurônios, astrogliose, neuroinflamação e hipomielinização de longa duração e finalmente atraso do desenvolvimento neuromotor e déficit cognitivo nos

animais adultos (45 dias de vida) que foram provavelmente causados por estresse oxidativo, uma vez que o antioxidante melatonina foi capaz de prevenir essas alterações neurológicas.

- O D-2-HG comprometeu a respiração celular em preparações mitocondriais purificadas e homogeneizados brutos de coração de ratos jovens, bem como em células cardíacas cultivados *in vitro*.
- O D-2-HG inibiu a atividade das enzimas alfa-cetoglutarato desidrogenase, citrato sintase, creatina quinase e citocromo c oxidase (complexo IV da cadeia respiratória), bem como a produção de ATP.
- O D-2-HG comprometeu a capacidade de retenção de Ca^{2+} mitocondrial em preparações mitocondriais do coração e em mioblastos H9c2, bem como a viabilidade de células H9c2 cultivadas (diminuição das concentrações de MTT e aumento da incorporação de iodeto de propídio). L-2HG não alterou alguns desses parâmetros (atividades do complexo IV e da creatina quinase) em preparações cardíacas, indicando um efeito inibitório seletivo do enantiômero D.
- Em conclusão, presume-se que o D-2-HG prejudica funções mitocondriais essenciais para a viabilidade celular no coração (bioenergética e a capacidade de retenção de Ca^{2+}), podendo esses mecanismos patológicos estarem potencialmente envolvidos na cardiomiopatia comumente observada na D2HGA2.

PERSPECTIVAS

- Avaliar funções mitocondriais (respiração celular, fosforilação oxidativa, e retenção mitocondrial de cálcio) e homeostase redox no modelo nocaute de acidúria D-2-hydroxiglutárica no coração e cérebro dos animais ao longo do desenvolvimento.
- Avaliar funções mitocondriais (respiração celular, fosforilação oxidativa e retenção mitocondrial de cálcio) e homeostase redox no modelo nocaute de acidúria L-2-hydroxiglutárica no cérebro dos animais ao longo do desenvolvimento.
- Avaliar funções mitocondriais (respiração celular, fosforilação oxidativa e retenção mitocondrial de cálcio) e homeostase redox em fibroblastos cultivados de pacientes afetados pelas acidúrias D-2-hydroxiglutárica tipo 1 e 2 e acidúria L-2-hydroxiglutárica.
- Avaliar os efeitos do tratamento com bezafibrato (30 ou 100 mg/kg/dia em animais; 10 μ M em células), triheptanoína (2,5 ou 4 g/kg/dia em animais; 144 mM em células) sobre as possíveis alterações detectadas nos animais nocaute com acidúria D-2-hydroxiglutárica, bem como em células (fibroblastos) de pacientes.
- Avaliar os efeitos do tratamento com BEZ (30 ou 100 mg/kg/dia) ou do antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA MK-801 sobre alterações da homeostase energética e mitocondrial, histopatológicas, imunohistoquímicas e comportamentais provocadas pela administração de D-2-HG em córtex cerebral e estriado de ratos eutanasiados 7 dias após a injeção.

- Estudar os efeitos *in vitro* e *ex vivo* do D-2-HG e do L-2-HG sobre parâmetros do sistema glutamatérgico (captação e liberação de glutamato, expressão de receptores e transportadores glutatérgicos, influxo de cálcio e atividade da enzima glutamina sintetase) em cérebro de ratos ao longo do desenvolvimento, tendo em vista a similaridade desses metabólitos com o glutamato.

REFERÊNCIAS

- Adam-Vizi, V., Starkov, A.A., 2010. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100465>
- Akbay, E.A., Moslehi, J., Christensen, C.L., Saha, S., Tchaicha, J.H., Ramkisson, S.H., Stewart, K.M., Carretero, J., Kikuchi, E., Zhang, H., Cohoon, T.J., Murray, S., Liu, W., Uno, K., Fisch, S., Jones, K., Gurumurthy, S., Gliser, C., Choe, S., Keenan, M., Son, J., Stanley, I., Losman, J.A., Padera, R., Bronson, R.T., Asara, J.M., Abdel-Wahab, O., Amrein, P.C., Fathi, A.T., Danial, N.N., Kimmelman, A.C., Kung, A.L., Ligon, K.L., Yen, K.E., Kaelin, W.G., Bardeesy, N., Wong, K.-K., 2014. D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH2 causes cardiomyopathy and neurodegeneration in mice. *Genes Dev* 28, 479–490. <https://doi.org/10.1101/gad.231233.113>
- Amaral, A.U., Seminotti, B., da Silva, J.C., de Oliveira, F.H., Ribeiro, R.T., Vargas, C.R., Leipnitz, G., Santamaría, A., Souza, D.O., Wajner, M., 2018. Induction of Neuroinflammatory Response and Histopathological Alterations Caused by Quinolinic Acid Administration in the Striatum of Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient Mice. *Neurotox Res* 33, 593–606. <https://doi.org/10.1007/S12640-017-9848-0>
- Anderson, M.A., Ao, Y., Sofroniew, M. V., 2014. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett* 565, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>
- Anghileri, E., Bertolino, N., Salsano, E., Antelmi, L., Carpinelli, P., Castellotti, B., Zucca, I., Gellera, C., Bisogno, R., Caccia, C., Cuccarini, V., 2016. In-vivo brain H1-MR-Spectroscopy identification and quantification of 2-hydroxyglutarate in L-2-Hydroxyglutaric aciduria. *Brain Res* 1648, 506–511. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.08.013>
- Anisimov, V.N., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Anisimov, S. V, Vesnushkin, G.M., Vinogradova, I.A., 2006. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta* 1757, 573–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.03.012>
- Aratani, Y., Miura, N., Ohno, N., Suzuki, K., 2012. [Role of neutrophil-derived reactive oxygen species in host defense and inflammation]. *Med Mycol J* 53, 123–8.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., Bobbins, J., Molkentin, J.D., 2005. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434, 658–662. <https://doi.org/10.1038/NATURE03434>
- Barbot, C., Fineza, I., Diogo, L., Maia, M., Melo, J., Guimarães, A., Pires, M.M., Cardoso, M.L., Vilarinho, L., 1997. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: Clinical, biochemical and magnetic resonance imaging in six Portuguese pediatric patients. *Brain Dev* 19, 268–273. [https://doi.org/10.1016/S0387-7604\(97\)00574-3](https://doi.org/10.1016/S0387-7604(97)00574-3)
- Barth, P.G., Wanders, R.J.A., Scholte, H.R., Abeling, N., Jakobs, C., Schutgens, R.B.H., Vreken, P., 1998. L-2-hydroxyglutaric aciduria and lactic acidosis. *J Inher Metab Dis* 21, 251–254. <https://doi.org/10.1023/A:1005316121584>

- Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M.A., Bernardi, P., 2005. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 280, 18558–18561. <https://doi.org/10.1074/JBC.C500089200>
- Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., Koteliensky, V., Mootha, V.K., 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 341–345. <https://doi.org/10.1038/NATURE10234>
- Beaudet, A.L., Scriver, C.R., Sly, W.S., Valle, D., 2014. Genetics, Biochemistry, and Molecular Bases of Variant Human Phenotypes, in: Beaudet, A.L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Antonarakis, S.E., Ballabio, A., Gibson, K.M., Mitchell, G. (Eds.), *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY.
- Bernardi, P., 2013. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol* 4. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2013.00095>
- Bernardi, P., von Stockum, S., 2012. The permeability transition pore as a Ca(2+) release channel: new answers to an old question. *Cell Calcium* 52, 22–27. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2012.03.004>
- Bock, F.J., Tait, S.W.G., 2020. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 85–100. <https://doi.org/10.1038/S41580-019-0173-8>
- Carter, S.F., Herholz, K., Rosa-Neto, P., Pellerin, L., Nordberg, A., Zimmer, E.R., 2019. Astrocyte Biomarkers in Alzheimer’s Disease. *Trends Mol Med* 25, 77–95. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.11.006>
- Cecatto, C., Amaral, A.U., Wajner, A., Wajner, S.M., Castilho, R.F., Wajner, M., 2020. Disturbance of mitochondrial functions associated with permeability transition pore opening induced by cis-5-tetradecenoic and myristic acids in liver of adolescent rats. *Mitochondrion* 50, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2019.09.008>
- Chalmers, R.A., Purkiss, P., Watts, R.W., Lawson, A.M., 1980. Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. *J Inher Metab Dis* 3, 27–43.
- Chalmers, R.A. and Lawson, A., 1983. Organic acids in man: analytical chemistry, biochemistry, and diagnosis of the organic acidurias. *Arch Dis Child* 58, 240. <https://doi.org/10.1136/adc.58.3.240-c>
- Chan, A., Seguin, R., Magnus, T., Papadimitriou, C., Toyka, K. v., Antel, J.P., Gold, R., 2003. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: Termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. *Glia* 43, 231–242. <https://doi.org/10.1002/glia.10258>
- Chan, S.M., Thomas, D., Corces-Zimmerman, M.R., Xavy, S., Rastogi, S., Hong, W.-J., Zhao, F., Medeiros, B.C., Tyvoll, D.A., Majeti, R., 2015. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations induce BCL-2 dependence in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 21, 178–184. <https://doi.org/10.1038/nm.3788>
- Chen, E., Nyhan, W.L., Jakobs, C., Greco, C.M., Barkovich, A.J., Cox, V.A., Packman, S., 1996. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: neuropathological correlations and first report of severe

- neurodegenerative disease and neonatal death. *J Inher Metab Dis* 19, 335–343. <https://doi.org/10.1007/BF01799264>
- Chitimus, D.M., Popescu, M.R., Voiculescu, S.E., Panaitescu, A.M., Pavel, B., Zagrean, L., Zagrean, A.M., 2020. Melatonin's Impact on Antioxidative and Anti-Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and Disease. *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 1211 10, 1211. <https://doi.org/10.3390/BIOM10091211>
- Cipolla-Neto, J., Amaral, F.G. do, 2018. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocr Rev* 39, 990–1028. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00084>
- Colombo, E., Farina, C., 2016. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol* 37, 608–620. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2016.06.006>
- Crompton, M., 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 (Pt 2), 233–249. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3410233>
- da Rosa, M.S., João Ribeiro, C.A., Seminotti, B., Teixeira Ribeiro, R., Umpierrez Amaral, A., de Moura Coelho, D., de Oliveira, F.H., Leipnitz, G., Wajner, M., 2015. In vivo intracerebral administration of L-2-hydroxyglutaric acid provokes oxidative stress and histopathological alterations in striatum and cerebellum of adolescent rats. *Free Radic Biol Med* 83, 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.008>
- da Rosa, M.S., Seminotti, B., Amaral, A.U., Parmeggiani, B., de Oliveira, F.H., Leipnitz, G., Wajner, M., 2014. Disruption of redox homeostasis and histopathological alterations caused by in vivo intrastriatal administration of D-2-hydroxyglutaric acid to young rats. *Neuroscience* 277, 281–293. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.07.011>
- da Silva, C.G., Bueno, A.R.F., Schuck, P.F., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A.J., Rosa, R.B., Dutra Filho, C.S., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., 2004. Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Neurochem Int* 44, 45–52. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(03\)00098-6](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(03)00098-6)
- da Silva, C.G., Bueno, A.R.F., Schuck, P.F., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A.J., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S., Wajner, M., 2003. L-2-Hydroxyglutaric acid inhibits mitochondrial creatine kinase activity from cerebellum of developing rats. *International Journal of Developmental Neuroscience* 21, 217–224. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(03\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(03)00035-2)
- da Silva, C.G., Ribeiro, C.A.J., Leipnitz, G., Dutra-Filho, C.S., Wyse, Â.T.S., Wannmacher, C.M.D., Sarkis, J.J.F., Jakobs, C., Wajner, M., 2002. Inhibition of cytochrome c oxidase activity in rat cerebral cortex and human skeletal muscle by d-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1586, 81–91. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(01\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(01)00088-6)
- da Silva, J.C., Amaral, A.U., Cecatto, C., Wajner, A., dos Santos Godoy, K., Ribeiro, R.T., de Mello Gonçalves, A., Zanatta, Â., da Rosa, M.S., Loureiro, S.O., Vargas, C.R., Leipnitz, G., de Souza, D.O.G., Wajner, M., 2017. α -Keto adipic Acid and α -Amino adipic Acid Cause Disturbance of Glutamatergic Neurotransmission and Induction of Oxidative Stress In Vitro in Brain of Adolescent Rats. *Neurotox Res* 32, 276–290. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9735-8>

- Dabner, L., Pieleas, G.E., Steward, C.G., Hamilton-Shield, J.P., Ness, A.R., Rogers, C.A., Bucciarelli-Ducci, C., Greenwood, R., Ellis, L., Sheehan, K., Reeves, B.C., 2021. Treatment of Barth Syndrome by Cardiolipin Manipulation (CARDIOMAN) With Bezafibrate: Protocol for a Randomized Placebo-Controlled Pilot Trial Conducted in the Nationally Commissioned Barth Syndrome Service. *JMIR Res Protoc* 10, e22533. <https://doi.org/10.2196/22533>
- de Almeida, M.M.A., Watson, A.E.S., Bibi, S., Dittmann, N.L., Goodkey, K., Sharafodinzadeh, P., Galleguillos, D., Nakhaei-Nejad, M., Kosaraju, J., Steinberg, N., Wang, B.S., Footz, T., Giuliani, F., Wang, J., Sipione, S., Edgar, J.M., Voronova, A., 2022. Fractalkine enhances oligodendrocyte regeneration and remyelination in a demyelination mouse model. *Stem Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2022.12.001>
- De Keyser, J., Mostert, J.P., Koch, M.W., 2008. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci* 267, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.08.044>
- de Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabó, I., Rizzuto, R., 2011. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 336–340. <https://doi.org/10.1038/NATURE10230>
- Delanty, N., Dichter, M.A., 1998. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand* 98, 145–53.
- Drago, I., de Stefani, D., Rizzuto, R., Pozzan, T., 2012. Mitochondrial Ca²⁺ uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca²⁺ peaks in cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 12986–12991. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210718109>
- Dulamea, A.O., 2017. The contribution of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitor cells to central nervous system repair in multiple sclerosis: perspectives for remyelination therapeutic strategies. *Neural Regen Res* 12, 1939–1944. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.221146>
- Duncan, G.J., Simkins, T.J., Emery, B., 2021. Neuron-Oligodendrocyte Interactions in the Structure and Integrity of Axons. *Front Cell Dev Biol* 9, 460. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.653101/BIBTEX>
- Duran, M., Kamerling, J.P., Bakker, H.D., van Gennip, A.H., Wadman, S.K., 1980. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: an inborn error of metabolism? *J Inherit Metab Dis* 3, 109–12.
- Elsayed, N.A., Boyer, T.M., Burd, I., 2021. Fetal Neuroprotective Strategies: Therapeutic Agents and Their Underlying Synaptic Pathways. *Front Synaptic Neurosci* 13, 33. <https://doi.org/10.3389/FNSYN.2021.680899/BIBTEX>
- Faas, M.M., de Vos, P., 2020. Mitochondrial function in immune cells in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165845>
- Fernandez-Castaneda, A., Gaultier, A., 2016. Adult oligodendrocyte progenitor cells - multifaceted regulators of the CNS in health and disease. *Brain Behav Immun* 57, 1. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2016.01.005>
- Figueira, T.R., Barros, M.H., Camargo, A.A., Castilho, R.F., Ferreira, J.C.B., Kowaltowski, A.J., Sluse, F.E., Souza-Pinto, N.C., Vercesi, A.E., 2013. Mitochondria as a source of reactive

- oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxid Redox Signal* 18, 2029–2074. <https://doi.org/10.1089/ARS.2012.4729>
- Fu, R., Shen, Q., Xu, P., Luo, J.J., Tang, Y., 2014. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol* 49, 1422–1434. <https://doi.org/10.1007/S12035-013-8620-6>
- Fulton, D., Paez, P.M., Campagnoni, A.T., 2010. The multiple roles of myelin protein genes during the development of the oligodendrocyte. *ASN Neuro* 2, 25–37. <https://doi.org/10.1042/AN20090051>
- Giacci, M.K., Bartlett, C.A., Smith, N.M., Iyer, K.S., Toomey, L.M., Jiang, H., Guagliardo, P., Kilburn, M.R., Fitzgerald, M., 2018. Oligodendroglia Are Particularly Vulnerable to Oxidative Damage after Neurotrauma In Vivo. *The Journal of Neuroscience* 38, 6491. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1898-17.2018>
- Gibson, K.M., Craigen, W., Herman, G.E., Jakobs, C., 1993a. D-2-hydroxyglutaric aciduria in a newborn with neurological abnormalities: a new neurometabolic disorder? *J Inher Metab Dis* 16, 497–500.
- Gibson, K.M., ten Brink, H.J., Schor, D.S., Kok, R.M., Bootsma, A.H., Hoffmann, G.F., Jakobs, C., 1993b. Stable-isotope dilution analysis of D- and L-2-hydroxyglutaric acid: application to the detection and prenatal diagnosis of D- and L-2-hydroxyglutaric acidemias. *Pediatr Res* 34, 277–80. <https://doi.org/10.1203/00006450-199309000-00007>
- Gregersen, N., Ingerslev, J., Rasmussen, K., 1977. Low molecular weight organic acids in the urine of the newborn. *Acta Paediatr Scand* 66, 85–9.
- Guan, W., Cao, J.-W., Liu, L.-Y., Zhao, Z.-H., Fu, Y., Yu, Y.-C., 2017. Eye opening differentially modulates inhibitory synaptic transmission in the developing visual cortex. *Elife* 6. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.32337>
- Guerreiro, G., Faverzani, J., Moura, A.P., Volfart, V., Gome dos Reis, B., Sitta, A., Gonzalez, E.A., de Lima Rosa, G., Coitinho, A.S., Baldo, G., Wajner, M., Vargas, C.R., 2021. Protective effects of L-carnitine on behavioral alterations and neuroinflammation in striatum of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice. *Arch Biochem Biophys* 709. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2021.108970>
- Gulcin, İ., Buyukokuroglu, M.E., Kufrevioglu, O.I., 2003. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *J Pineal Res* 34, 278–281. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.00042.x>
- Gunduz, A., Aktuglu-Zeybek, A.C., Tezer, D., Enver, E.O., Zubarioglu, T., Kiykim, E., E. Kiziltan, M., 2022. Postural tremor in L-2-hydroxyglutaric aciduria is associated with cerebellar atrophy. *Neurol Sci* 43, 2051–2058. <https://doi.org/10.1007/S10072-021-05555-X>
- Halliwell, B., 2006. Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiol* 141, 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2015a. Oxygen: boon yet bane, in: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc., New York, NY, pp. 1–29.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2015b. Antioxidants from the diet, in: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc., New York, NY, pp. 153–197.

- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2015c. Antioxidant defenses synthesized in vivo, in: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc., New York, NY, pp. 77–151.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death, in: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, NY, pp. 199–2083.
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Hamann, I., Petroll, K., Grimm, L., Hartwig, A., Klotz, L.-O., 2014. Insulin-like modulation of Akt/FoxO signaling by copper ions is independent of insulin receptor. *Arch Biochem Biophys* 558, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.004>
- Han, H., Myllykoski, M., Ruskamo, S., Wang, C., Kursula, P., 2013. Myelin-specific proteins: a structurally diverse group of membrane-interacting molecules. *Biofactors* 39, 233–241. <https://doi.org/10.1002/BIOF.1076>
- Hines, D.J., Hines, R.M., Mulligan, S.J., Macvicar, B.A., 2009. Microglia processes block the spread of damage in the brain and require functional chloride channels. *Glia* 57, 1610–1618. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20874>
- Hoek, J.B., Rydstrom, J., 1988. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem J* 254, 1–10. <https://doi.org/10.1042/BJ2540001>
- Hoffmann, G.F., von Kries, R., 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, 76–80. <https://doi.org/10.1007/s00431-003-1246-3>
- Hoogland, I.C.M., Houbolt, C., van Westerloo, D.J., van Gool, W.A., van de Beek, D., 2015. Systemic inflammation and microglial activation: Systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation* 12, 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12974-015-0332-6/TABLES/5>
- Horvath, G., Reglődi, D., Farkas, J., Vadasz, G., Mammel, B., Kvarik, T., Bodzai, G., Kiss-Illes, B., Farkas, D., Matkovits, A., Manavalan, S., Gaszner, B., Tamas, A., Kiss, P., 2015. Perinatal positive and negative influences on the early neurobehavioral reflex and motor development. *Adv Neurobiol* 10, 149–167. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1372-5_8
- Hovens, I.B., Nyakas, C., Schoemaker, R.G., 2014. A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. *Neuroimmunol Neuroinflamm* 1, 82–88. <https://doi.org/10.4103/2347-8659.139719>
- Hughes, E.G., Kang, S.H., Fukaya, M., Bergles, D.E., 2013. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat Neurosci* 16, 668–676. <https://doi.org/10.1038/NN.3390>
- Irani, K., 2000. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 87, 179–83.
- Javadov, S., Kozlov, A. v., Camara, A.K.S., 2020. Mitochondria in Health and Diseases. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/CELLS9051177>

- Jović, N.J., Kosać, A., Koprivšek, K., 2014. L-2-hydroxyglutaric aciduria: A case report. *Srp Arh Celok Lek* 142, 337–341. <https://doi.org/10.2298/SARH1406337J>
- Junqueira, D., Brusque, A.M., Porciúncula, L.O., Rotta, L.N., Frizzo, M.E.S., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M.D., Souza, D.O., Wajner, M., 2004. In vitro effects of D-2-hydroxyglutaric acid on glutamate binding, uptake and release in cerebral cortex of rats. *J Neurol Sci* 217, 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2003.10.005>
- Junqueira, D., Brusque, A.M., Porciúncula, L.O., Rotta, L.N., Ribeiro, C.A.J., Frizzo, M.E.S., Dutra Filho, C.S., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S., Souza, D.O., Wajner, M., 2003. Effects of L-2-hydroxyglutaric acid on various parameters of the glutamatergic system in cerebral cortex of rats. *Metab Brain Dis* 18, 233–243. <https://doi.org/10.1023/A:1025559200816>
- Karunanidhi, A., Van't Land, C., Rajasundaram, D., Grings, M., Vockley, J., Mohsen, A., 2022. Medium branched chain fatty acids improve the profile of tricarboxylic acid cycle intermediates in mitochondrial fatty acid β -oxidation deficient cells: A comparative study. *J Inher Metab Dis* 45, 541–556. <https://doi.org/10.1002/jimd.12480>
- Katz, L.C., Shatz, C.J., 1996. Synaptic Activity and the Construction of Cortical Circuits. *Science* (1979) 274, 1133–1138. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.274.5290.1133>
- Kölker, S., Pawlak, V., Ahlemeyer, B., Okun, J.G., Hörster, F., Mayatepek, E., Krieglstein, J., Hoffmann, G.F., Köhr, G., 2002. NMDA receptor activation and respiratory chain complex V inhibition contribute to neurodegeneration in D-2-hydroxyglutaric aciduria. *European Journal of Neuroscience* 16, 21–28. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02055.x>
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2001. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495, 12–15. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02316-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02316-X)
- Kranendijk, M., Salomons, G.S., Gibson, K.M., Van Schaftingen, E., Jakobs, C., Struys, E.A., 2011. A lymphoblast model for IDH2 gain-of-function activity in d-2-hydroxyglutaric aciduria type II: Novel avenues for biochemical and therapeutic studies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1812, 1380–1384. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.08.006>
- Kranendijk, M., Struys, E.A., Gibson, K.M., Wickenhagen, W. V., Abdenur, J.E., Buechner, J., Christensen, E., De Kremer, R.D., Errami, A., Gissen, P., Gradowska, W., Hobson, E., Islam, L., Korman, S.H., Kurczynski, T., Maranda, B., Meli, C., Rizzo, C., Sansaricq, C., Trefz, F.K., Webster, R., Jakobs, C., Salomons, G.S., 2010a. Evidence for genetic heterogeneity in D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Hum Mutat* 31, 279–283. <https://doi.org/10.1002/humu.21186>
- Kranendijk, M., Struys, E.A., Salomons, G.S., van der Knaap, M.S., Jakobs, C., 2012. Progress in understanding 2-hydroxyglutaric acidurias. *J Inher Metab Dis* 35, 571–587. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9462-5>
- Kranendijk, M., Struys, E.A., van Schaftingen, E., Gibson, K.M., Kanhai, W.A., van der Knaap, M.S., Amiel, J., Buist, N.R., Das, A.M., de Klerk, J.B., Feigenbaum, A.S., Grange, D.K., Hofstede, F.C., Holme, E., Kirk, E.P., Korman, S.H., Morava, E., Morris, A., Smeitink, J., Sukhai, R.N., Vallance, H., Jakobs, C., Salomons, G.S., 2010b. IDH2 mutations in patients with D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Science* 330, 336. <https://doi.org/10.1126/science.1192632>
- Kreutzberg, G.W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19, 312–318. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)

- Kwon, H.S., Koh, S.H., 2020. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration* 2020 9:1 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40035-020-00221-2>
- Lakshminarayanan, V., Drab-Weiss, E.A., Roebuck, K.A., 1998. H₂O₂ and tumor necrosis factor- α induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- κ B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem* 273, 32670–8.
- Latini, A., da Silva, C.G., Ferreira, G.C., Schuck, P.F., Scussiato, K., Sarkis, J.J., Dutra Filho, C.S., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., 2005. Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab* 86, 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.05.002>
- Latini, A., Scussiato, K., Borba Rosa, R., Leipnitz, G., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., 2003a. Induction of oxidative stress by L-2-hydroxyglutaric acid in rat brain. *J Neurosci Res* 74, 103–110. <https://doi.org/10.1002/jnr.10735>
- Latini, A., Scussiato, K., Rosa, R.B., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., 2003b. D-2-hydroxyglutaric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *European Journal of Neuroscience* 17, 2017–2022. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02639.x>
- Lee, J., Gravel, M., Zhang, R., Thibault, P., Braun, P.E., 2005. Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. *J Cell Biol* 170, 661–673. <https://doi.org/10.1083/JCB.200411047>
- Lehninger, A.L., Vercesi, A., Bababunmi, E.A., 1978. Regulation of Ca²⁺ release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1690–1694. <https://doi.org/10.1073/PNAS.75.4.1690>
- Lenz, K.M., Nelson, L.H., 2018. Microglia and beyond: Innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function. *Front Immunol* 9, 698. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00698/BIBTEX>
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147–157. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80085-9)
- Luo, M., Anderson, M.E., 2013. Mechanisms of Altered Ca²⁺ Handling in Heart Failure. *Circ Res* 113, 690–708. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301651>
- Maciel, E.N., Kowaltowski, A.J., Schwalm, F.D., Rodrigues, J.M., Souza, D.O., Vercesi, A.E., Wajner, M., Castilho, R.F., 2004. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca²⁺ and respiratory chain complex II inhibition. *J Neurochem* 90, 1025–1035. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2004.02565.X>
- 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 sibship with severe progressive encephalomyelopathy: a new genetic disease? *Eur J Pediatr* 155, 398–403.

- McGeer, P.L., McGeer, E.G., 2008. Glial reactions in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 23, 474–483. <https://doi.org/10.1002/mds.21751>
- Mirandola, S.R., Melo, D.R., Saito, Â., Castilho, R.F., 2010. 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *J Neurosci Res* 88, 630–639. <https://doi.org/10.1002/JNR.22239>
- Motavaf, M., Piao, X., 2021. Oligodendrocyte Development and Implication in Perinatal White Matter Injury. *Front Cell Neurosci* 15, 444. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2021.764486/BIBTEX>
- Moura, A.P., Parmeggiani, B., Gasparotto, J., Grings, M., Fernandez Cardoso, G.M., Seminotti, B., Moreira, J.C.F., Gelain, D.P., Wajner, M., Leinritz, G., 2018. Glycine Administration Alters MAPK Signaling Pathways and Causes Neuronal Damage in Rat Brain: Putative Mechanisms Involved in the Neurological Dysfunction in Nonketotic Hyperglycinemia. *Mol Neurobiol* 55, 741–750. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0319-z>
- Moura, A.P., Parmeggiani, B., Grings, M., Alvorcem, L. de M., Boldrini, R.M., Bumbel, A.P., Motta, M.M., Seminotti, B., Wajner, M., Leinritz, G., 2016. Intracerebral Glycine Administration Impairs Energy and Redox Homeostasis and Induces Glial Reactivity in Cerebral Cortex of Newborn Rats. *Mol Neurobiol* 53, 5864–5875. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9493-7>
- Nagele, R.G., Wegiel, Jerzy, Venkataraman, V., Imaki, H., Wang, K.-C., Wegiel, Jarek, 2004. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25, 663–74. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.01.007>
- Nave, K.A., 2010. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468, 244–252. <https://doi.org/10.1038/NATURE09614>
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2017. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7th ed.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S., 2013. *Bioenergetics*, Bioenergetics: Fourth Edition. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-64902-9>
- Norden, D.M., Trojanowski, P.J., Villanueva, E., Navarro, E., Godbout, J.P., 2016. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia* 64, 300–316. <https://doi.org/10.1002/GLIA.22930>
- Nunnari, J., Suomalainen, A., 2012. Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell* 148, 1145. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.02.035>
- Oksanen, M., Lehtonen, S., Jaronen, M., Goldsteins, G., Hämäläinen, R.H., Koistinaho, J., 2019. Astrocyte alterations in neurodegenerative pathologies and their modeling in human induced pluripotent stem cell platforms. *Cell Mol Life Sci* 76, 2739–2760. <https://doi.org/10.1007/S00018-019-03111-7>
- Olivera-Bravo, S., Fernández, A., Sarlabós, M.N., Rosillo, J.C., Casanova, G., Jiménez, M., Barbeito, L., 2011. Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I. *PLoS One* 6, e20831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020831>

- Olivera-Bravo, S., Ribeiro, C.A.J., Isasi, E., Trías, E., Leipnitz, G., Díaz-Amarilla, P., Woontner, M., Beck, C., Goodman, S.I., Souza, D., Wajner, M., Barbeito, L., 2015. Striatal neuronal death mediated by astrocytes from the *Gcdh*^{-/-} mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet* 24, 4504–4515. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv175>
- Ong, S.-B., Gustafsson, A.B., 2012. New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium. *Cardiovasc Res* 94, 190–196. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr312>
- Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., Okamoto, K., 2021. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *EMBO J* 40. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2020104705>
- Pan, X., Liu, J., Nguyen, T., Liu, C., Sun, J., Teng, Y., Fergusson, M.M., Rovira, I.I., Allen, M., Springer, D.A., Aponte, A.M., Gucek, M., Balaban, R.S., Murphy, E., Finkel, T., 2013. The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Cell Biol* 15, 1464–1472. <https://doi.org/10.1038/NCB2868>
- Pecka, M., Han, Y., Sader, E., Mrcic-Flogel, T.D., 2014. Experience-Dependent Specialization of Receptive Field Surround for Selective Coding of Natural Scenes. *Neuron* 84, 457–469. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.010>
- Pendin, D., Greotti, E., Pozzan, T., 2014. The elusive importance of being a mitochondrial Ca(2+) uniporter. *Cell Calcium* 55, 139–145. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2014.02.008>
- Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R., Marcheselli, F., 1994. Melatonin: A peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 55, PL271–PL276. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00666-0](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00666-0)
- Popov, L.D., 2020. Mitochondrial biogenesis: An update. *J Cell Mol Med* 24, 4892. <https://doi.org/10.1111/JCMM.15194>
- Rai, Y., Pathak, R., Kumari, N., Sah, D.K., Pandey, S., Kalra, N., Soni, R., Dwarakanath, B.S., Bhatt, A.N., 2018. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci Rep* 8, 1531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>
- Ramos, J.M.P., Bussi, C., Gaviglio, E.A., Arroyo, D.S., Baez, N.S., Rodriguez-Galan, M.C., Iribarren, P., 2017. Type I IFNs Are Required to Promote Central Nervous System Immune Surveillance through the Recruitment of Inflammatory Monocytes upon Systemic Inflammation. *Front Immunol* 8. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01666>
- Rashed, M., Ozand, P.T., al Aqeel, A., Gascon, G.G., 1994. Experience of King Faisal Specialist Hospital and Research Center with Saudi organic acid disorders. *Brain Dev* 16 Suppl, 1–6.
- Rasola, A., Bernardi, P., 2011. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* 50, 222–233. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2011.04.007>
- Reiter, R.J., Mayo, J.C., Tan, D.-X., Sainz, R.M., Alatorre-Jimenez, M., Qin, L., 2016. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res* 61, 253–278. <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>

- Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C., Qi, W., 2001. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 34, 237–56. <https://doi.org/10.1385/CBB:34:2:237>
- Reiter, R.J., Tan, D.-X., Rosales-Corral, S., Manchester, L.C., 2013. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini Rev Med Chem* 13, 373–84. <https://doi.org/10.2174/1389557511313030006>
- Ribeiro, R.T., Seminotti, B., Zanatta, Â., de Oliveira, F.H., Amaral, A.U., Leipnitz, G., Wajner, M., 2021. Neuronal Death, Glial Reactivity, Microglia Activation, Oxidative Stress and Bioenergetics Impairment Caused by Intracerebroventricular Administration of D-2-hydroxyglutaric Acid to Neonatal Rats. *Neuroscience* 471, 115–132. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2021.07.024>
- Ribeiro, R.T., Zanatta, Â., Amaral, A.U., Leipnitz, G., de Oliveira, F.H., Seminotti, B., Wajner, M., 2018. Experimental Evidence that In Vivo Intracerebral Administration of L-2-Hydroxyglutaric Acid to Neonatal Rats Provokes Disruption of Redox Status and Histopathological Abnormalities in the Brain. *Neurotox Res* 33, 681–692. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9874-6>
- Rizzuto, R., de Stefani, D., Raffaello, A., Mammucari, C., 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 566–578. <https://doi.org/10.1038/NRM3412>
- Rosenberg, P., 2004. Mitochondrial dysfunction and heart disease. *Mitochondrion* 4, 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.016>
- Rushmore, T.H., Morton, M.R., Pickett, C.B., 1991. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 266, 11632–9.
- Rzem, R., Achouri, Y., Marbaix, E., Schakman, O., Wiame, E., Marie, S., Gailly, P., Vincent, M.F., Veiga-Da-cunha, M., van Schaftingen, E., 2015. A mouse model of L-2-hydroxyglutaric aciduria, a disorder of metabolite repair. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119540>
- Rzem, R., Veiga-Da-Cunha, M., Noël, G., Goffette, S., Nassogne, M.C., Tabarki, B., Schöller, C., Marquardt, T., Vikkula, M., van Schaftingen, E., 2004. A gene encoding a putative FAD-dependent L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase is mutated in L-2-hydroxyglutaric aciduria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16849–16854. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0404840101>
- Samuraki, M., Komai, K., Hasegawa, Y., Kimura, M., Yamaguchi, S., Terada, N., Yamada, M., 2008. A successfully treated adult patient with L-2-hydroxyglutaric aciduria. *Neurology* 70, 1051–1052. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000287141.90944.95>
- Sasaki, Y., Ohsawa, K., Kanazawa, H., Kohsaka, S., Imai, Y., 2001. Iba1 Is an Actin-Cross-Linking Protein in Macrophages/Microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 292–297. <https://doi.org/10.1006/BBRC.2001.5388>
- Sauer, S.W., Opp, S., Mahringer, A., Kamiński, M.M., Thiel, C., Okun, J.G., Fricker, G., Morath, M.A., Kölker, S., 2010. Glutaric aciduria type I and methylmalonic aciduria: Simulation of cerebral import and export of accumulating neurotoxic dicarboxylic acids in in vitro

- models of the blood–brain barrier and the choroid plexus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802, 552–560.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.03.003>
- Seminotti, B., Brondani, M., Ribeiro, R.T., Leipnitz, G., Wajner, M., 2022a. Disturbance of Mitochondrial Dynamics, Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Crosstalk, Redox Homeostasis, and Inflammatory Response in the Brain of Glutaryl-CoA Dehydrogenase-Deficient Mice: Neuroprotective Effects of Bezafibrate. *Mol Neurobiol* 59, 4839–4853.
<https://doi.org/10.1007/s12035-022-02887-3>
- Seminotti, B., Brondani, M., Ribeiro, R.T., Leipnitz, G., Wajner, M., 2022b. Disturbance of Mitochondrial Dynamics, Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Crosstalk, Redox Homeostasis, and Inflammatory Response in the Brain of Glutaryl-CoA Dehydrogenase-Deficient Mice: Neuroprotective Effects of Bezafibrate. *Mol Neurobiol* 59, 4839–4853.
<https://doi.org/10.1007/s12035-022-02887-3>
- Seminotti, B., da Silva, J.C., Ribeiro, R.T., Leipnitz, G., Wajner, M., 2019a. Free Radical Scavengers Prevent Argininosuccinic Acid-Induced Oxidative Stress in the Brain of Developing Rats: a New Adjuvant Therapy for Argininosuccinate Lyase Deficiency? *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01825-0>
- Seminotti, B., Zanatta, Â., Ribeiro, R.T., da Rosa, M.S., Wyse, A.T.S., Leipnitz, G., Wajner, M., 2019b. Disruption of Brain Redox Homeostasis, Microglia Activation and Neuronal Damage Induced by Intracerebroventricular Administration of S-Adenosylmethionine to Developing Rats. *Mol Neurobiol* 56, 2760–2773. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1275-6>
- Shiraishi, H., Yamada, K., Egawa, K., Ishige, M., Ochi, F., Watanabe, A., Kawakami, S., Kuzume, K., Watanabe, K., Sameshima, K., Nakamagoe, K., Tamaoka, A., Asahina, N., Yokoshiki, S., Kobayashi, K., Miyakoshi, T., Oba, K., Isoe, T., Hayashi, H., Yamaguchi, S., Sato, N., 2021. Efficacy of bezafibrate for preventing myopathic attacks in patients with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Brain Dev* 43, 214–219.
<https://doi.org/10.1016/J.BRAINDEV.2020.07.019>
- Simons, M., Nave, K.A., 2015. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A020479>
- Smith, J.A., Das, A., Ray, S.K., Banik, N.L., 2012. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 87, 10–20.
<https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2011.10.004>
- Sofroniew, M. v., 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32, 638–647. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2009.08.002>
- Sofroniew, M. V., Vinters, H. V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Southorn, P.A., Powis, G., 1988. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 63, 381–9.
- Starkov, A.A., 2010. The molecular identity of the mitochondrial Ca²⁺ sequestration system. *FEBS J* 277, 3652–3663. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2010.07756.X>

- Steenweg, M.E., Jakobs, C., Errami, A., van Dooren, S.J.M., Adeva Bartolomé, M.T., Aerssens, P., Augoustides-Savvopoulou, P., Baric, I., Baumann, M., Bonafé, L., Chabrol, B., Clarke, J.T.R., Clayton, P., Coker, M., Cooper, S., Falik-Zaccari, T., Gorman, M., Hahn, A., Hasanoglu, A., King, M.D., de Klerk, H.B.C., Korman, S.H., Lee, C., Meldgaard Lund, A., Mejaski-Bosnjak, V., Pascual-Castroviejo, I., Raadhyaksha, A., Rootwelt, T., Roubertie, A., Ruiz-Falco, M.L., Scalais, E., Schimmel, U., Seijo-Martinez, M., Suri, M., Sykut-Cegielska, J., Trefz, F.K., Uziel, G., Valayannopoulos, V., Vianey-Saban, C., Vlaho, S., Vodopiutz, J., Wajner, M., Walter, J., Walter-Derbort, C., Yapici, Z., Zafeiriou, D.I., Spreeuwenberg, M.D., Celli, J., den Dunnen, J.T., van der Knaap, M.S., Salomons, G.S., 2010. An overview of L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene (L2HGDH) variants: a genotype-phenotype study. *Hum Mutat* 31, 380–390. <https://doi.org/10.1002/humu.21197>
- Steenweg, M.E., Salomons, G.S., Yapici, Z., Uziel, G., Scalais, E., Zafeiriou, D.I., Ruiz-Falco, M.L., Mejaški-Bošnjak, V., Augoustides-Savvopoulou, P., Wajner, M., Walter, J., Verhoeven-Duif, N.M., Struys, E.A., Jakobs, C., van der Knaap, M.S., 2009. L-2-Hydroxyglutaric Aciduria: Pattern of MR Imaging Abnormalities in 56 Patients. *1. https://doi.org/10.1148/radiol.2513080647* 251, 856–865. <https://doi.org/10.1148/RADIOL.2513080647>
- Stein, H., 2021. Why Does the Neocortex Need the Cerebellum for Working Memory? *The Journal of Neuroscience* 41, 6368. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0701-21.2021>
- Struys, E.A., Jansen, E.E.W., Verhoeven, N.M., Jakobs, C., 2004. Measurement of urinary D- and L-2-hydroxyglutarate enantiomers by stable-isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry after derivatization with diacetyl-L-tartaric anhydride. *Clin Chem* 50, 1391–5. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.033399>
- Švidrnoch, M., Příbylka, A., Bekárek, V., Ševčík, J., Smolka, V., Maier, V., 2016. Enantioseparation of d,l-2-hydroxyglutaric acid by capillary electrophoresis with tandem mass spectrometry—Fast and efficient tool for d- and l-2-hydroxyglutaric acidurias diagnosis. *J Chromatogr A* 1467, 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.095>
- Tanveer, A., Virji, S., Andreeva, L., Totty, N.F., Hsuan, J.J., Ward, J.M., Crompton, M., 1996. Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. *Eur J Biochem* 238, 166–172. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1996.0166Q.X>
- Topçu, M., Aydın, Ö.F., Yalçinkaya, C., Haliloğlu, G., Aysun, S., Anlar, B., Topaloğlu, H., Turanlı, G., Yalnizoğlu, D., Kesimer, M., Coşkun, T., 2005. L-2-hydroxyglutaric aciduria: a report of 29 patients. *Turk J Pediatr* 47, 1–7.
- Topçu, M., Jobard, F., Halliez, S., Coskun, T., Yalçinkaya, C., Gerceker, F.O., Wanders, R.J.A., Prud'homme, J.F., Lathrop, M., Özguc, M., Fischer, J., 2004. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: identification of a mutant gene C14orf160, localized on chromosome 14q22.1. *Hum Mol Genet* 13, 2803–2811. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDH300>
- Tzakos, A., Kursula, P., Troganis, A., Theodorou, V., Tselios, T., Svarnas, C., Matsoukas, J., Apostolopoulos, V., Gerothanassis, I., 2005. Structure and function of the myelin proteins: current status and perspectives in relation to multiple sclerosis. *Curr Med Chem* 12, 1569–1587. <https://doi.org/10.2174/0929867054039026>

- Ünal-Çevik, I., Kiliç, M., Gürsoy-Özdemir, Y., Gurer, G., Dalkara, T., 2004. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: A cautionary note. *Brain Res* 1015, 169–174. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2004.04.032>
- van der Knaap, M.S., Jakobs, C., Hoffmann, G.F., Duran, M., Muntau, A.C., Schweitzer, S., Kelley, R.I., Parrot-Roulaud, F., Amiel, J., de Lonlay, P., Rabier, D., Eeg-Olofsson, O., 1999a. D-2-hydroxyglutaric aciduria: further clinical delineation. *J Inherit Metab Dis* 22, 404–13. <https://doi.org/10.1023/a:1005548005393>
- van der Knaap, M.S., Jakobs, C., Hoffmann, G.F., Nyhan, W.L., Renier, W.O., Smeitink, J.A.M., Catsman-Berrepoets, C.E., Hjalmarson, O., Vallance, H., Sugita, K., Bowe, C.M., Herrin, J.T., Craigen, W.J., Buist, N.R.M., Brookfield, D.S.K., Chalmers, R.A., 1999b. D-2-Hydroxyglutaric aciduria: biochemical marker or clinical disease entity? *Ann Neurol* 45, 111–9. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199901\)45:1<111::AID-ART17>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199901)45:1<111::AID-ART17>3.0.CO;2-N)
- Victor, S., Rocha-Ferreira, E., Rahim, A., Hagberg, H., Edwards, D., 2021. New possibilities for neuroprotection in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *European Journal of Pediatrics* 2021 181:3 181, 875–887. <https://doi.org/10.1007/S00431-021-04320-8>
- Vockley, J., Burton, B., Berry, G., Longo, N., Phillips, J., Sanchez-Valle, A., Chapman, K., Tanpaiboon, P., Grunewald, S., Murphy, E., Lu, X., Cataldo, J., 2021. Effects of triheptanoin (UX007) in patients with long-chain fatty acid oxidation disorders: Results from an open-label, long-term extension study. *J Inherit Metab Dis* 44, 253–263. <https://doi.org/10.1002/jimd.12313>
- Vockley, J., Enns, G.M., Ramirez, A.N., Bedrosian, C.L., Reineking, B., Lu, X., Ray, K., Rahman, S., Marsden, D., 2022. Response to triheptanoin therapy in critically ill patients with LC-FAOD: Report of patients treated through an expanded access program. *Mol Genet Metab* 136, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2022.04.001>
- Wajner, M., 2019. Neurological manifestations of organic acidurias. *Nat Rev Neurol* 15, 253–271. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0161-9>
- Wajner, M., Vargas, C.R., Funayama, C., Fernandez, A., Elias, M.L.C., Goodman, S.I., Jakobs, C., van der Knaap, M.S., 2002. D-2-hydroxyglutaric aciduria in a patient with a severe clinical phenotype and unusual MRI findings. *J Inherit Metab Dis* 25, 28–34. <https://doi.org/10.1023/A:1015165212965/METRICS>
- Wakatsuki, A., Okatani, Y., Shinohara, K., Ikenoue, N., Fukaya, T., 2001. Melatonin protects against ischemia/reperfusion-induced oxidative damage to mitochondria in fetal rat brain. *J Pineal Res* 31, 167–172. <https://doi.org/10.1034/J.1600-079X.2001.310211.X>
- Wall, S.B., Oh, J.-Y., Diers, A.R., Landar, A., 2012. Oxidative Modification of Proteins: An Emerging Mechanism of Cell Signaling. *Front Physiol* 3, 369. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00369>
- Wang, C., Neugebauer, U., Bürck, J., Myllykoski, M., Baumgärtel, P., Popp, J., Kursula, P., 2011. Charge Isomers of Myelin Basic Protein: Structure and Interactions with Membranes, Nucleotide Analogues, and Calmodulin. *PLoS One* 6, e19915. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0019915>

- Wang, F., Travins, J., Lin, Z., Si, Y., Chen, Y., Powe, J., Murray, S., Zhu, D., Artin, E., Gross, S., Santiago, S., Steadman, M., Kernysky, A., Straley, K., Lu, C., Pop, A., Struys, E.A., Jansen, E.E.W., Salomons, G.S., David, M.D., Quivoron, C., Penard-Lacronique, V., Regan, K.S., Liu, W., Dang, L., Yang, H., Silverman, L., Agresta, S., Dorsch, M., Biller, S., Yen, K., Cang, Y., Su, S.S.M., Jin, S., 2016. A small molecule inhibitor of mutant IDH2 rescues cardiomyopathy in a D-2-hydroxyglutaric aciduria type II mouse model. *J Inherit Metab Dis* 39, 807–820. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9960-y>
- Wang, F., Yang, Y.J., Yang, N., Chen, X.J., Huang, N.X., Zhang, J., Wu, Y., Liu, Z., Gao, X., Li, T., Pan, G.Q., Liu, S.B., Li, H.L., Fancy, S.P.J., Xiao, L., Chan, J.R., Mei, F., 2018. Enhancing Oligodendrocyte Myelination Rescues Synaptic Loss and Improves Functional Recovery after Chronic Hypoxia. *Neuron* 99, 689-701.e5. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.07.017>
- Webb, R., Hughes, M.G., Thomas, A.W., Morris, K., 2017. The Ability of Exercise-Associated Oxidative Stress to Trigger Redox-Sensitive Signalling Responses. *Antioxidants (Basel)* 6, 63. <https://doi.org/10.3390/antiox6030063>
- Weimar, C., Schlamann, M., Krägeloh-Mann, I., Schöls, L., 2013. L-2 hydroxyglutaric aciduria as a rare cause of leukencephalopathy in adults. *Clin Neurol Neurosurg* 115, 765–766. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.06.040>
- Wirhth, O., Breyhan, H., Marcello, A., Cotel, M.C., Brück, W., Bayer, T.A., 2010. Inflammatory changes are tightly associated with neurodegeneration in the brain and spinal cord of the APP/PS1KI mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31, 747–757. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2008.06.011>
- Wolf, H.K., Buslei, R., Schmidt-Kastner, R., Schmidt-Kastner, P.K., Pietsch, T., Wiestler, O.D., Blümcke, I., 1996. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* 44, 1167–1171. <https://doi.org/10.1177/44.10.8813082>
- Yadav, U.C.S., Ramana, K. V., 2013. Regulation of NF-κB-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 690545. <https://doi.org/10.1155/2013/690545>
- Yang, I., Han, S.J., Kaur, G., Crane, C., Parsa, A.T., 2010. The Role of Microglia in Central Nervous System Immunity and Glioma Immunology. *J Clin Neurosci* 17, 6. <https://doi.org/10.1016/J.JOCN.2009.05.006>
- Yilmaz, K., 2009. Riboflavin treatment in a case with l-2-hydroxyglutaric aciduria. *European Journal of Paediatric Neurology* 13, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2008.01.003>
- Young, K.M., Psachoulia, K., Tripathi, R.B., Dunn, S.J., Cossell, L., Attwell, D., Tohyama, K., Richardson, W.D., 2013. Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron* 77, 873–885. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2013.01.006>
- Zago, E.B., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2000. The redox state of endogenous pyridine nucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the permeability transition pore. *FEBS Lett* 478, 29–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01815-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01815-9)

Zoratti, M., Szabò, I., 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241, 139–176. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(95\)00003-A](https://doi.org/10.1016/0304-4157(95)00003-A)