

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

**ADMINISTRAÇÃO INTRAESTRIATAL DE HIPOXANTINA ALTERA PERFIL  
INFLAMATÓRIO E NEUROENERGÉTICO VIA ESTRESSE OXIDATIVO EM  
ESTRIADO DE RATOS**

**HELENA BIASIBETTI BRENDLER**

**ORIENTADORA**

**Profª. Drª. Angela Terezinha de Souza Wyse**

Porto Alegre

2017

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

**ADMINISTRAÇÃO INTRAESTRIATAL DE HIPOXANTINA ALTERA PERFIL  
INFLAMATÓRIO E NEUROENERGÉTICO VIA ESTRESSE OXIDATIVO EM  
ESTRIADO DE RATOS**

**HELENA BIASIBETTI BRENDLER**

**ORIENTADORA**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Angela Terezinha de Souza Wyse**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre

2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Biasibetti Brendler, Helena  
ADMINISTRAÇÃO INTRAESTRIATAL DE HIPOXANTINA  
ALTERA PERFIL INFLAMATÓRIO E NEUROENERGÉTICO VIA  
ESTRESSE OXIDATIVO EM ESTRIADO DE RATOS / Helena  
Biasibetti Brendler. -- 2017.  
134 f.

Orientadora: Angela Terezinha de Souza Wyse.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Hipoxantina. 2. Neuroinflamação. 3. Estresse  
oxidativo. 4. Neuroenergética. I. Wyse, Angela  
Terezinha de Souza, orient. II. Título.

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

*Dedico este trabalho à **minha família,**  
pela confiança, incentivo e amor incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Professora Dra. Angela Wyse, pelas oportunidades concedidas, pelos conselhos fornecidos e pelos ensinamentos proferidos. Obrigada não somente pelo profissionalismo e dedicação com que tem me orientado todos esses anos, mas por ser um exemplo nos âmbitos acadêmico, social e poético.

A todos os colegas e amigos do laboratório 36 do Departamento de Bioquímica, aos que já saíram, aos que permanecem e aos que ingressam. Um agradecimento especial para os amigos André, Felipe, Fernanda e Paula pela amizade, apoio e parceria na realização dos trabalhos. Apesar da distância sempre nos relacionamos com muita fluidez.

Agradeço aos professores: Clovis Wannmacher e Vanusa Manfredini, bem como seus alunos pelas colaborações na realização desse trabalho. Muito obrigada!

Aos amigos da graduação. Muito obrigada por tudo e principalmente pelos momentos de descontração e amizade que, com certeza, serão para sempre!

Ao meu amado marido Rafael, meu grande companheiro de todos os momentos, obrigada por compartilhar um sonho comigo e sempre me incentivar e apoiar.

À minha família, pelo incentivo constante aos meus estudos, pelo apoio incondicional e carinho de sempre. Apesar da distância, em pensamento, estão sempre comigo.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica pela oportunidade de realizar o curso de mestrado. Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

**Madre Teresa de Calcutá**

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Erros inatos do metabolismo.....	1
1.2. Metabolismo de purinas.....	2
1.3. Doença de Lesch-Nyhan .....	5
1.4. Modelos experimentais da doença de Lesch-Nyhan.....	8
1.5. Neuroinflamação.....	9
1.6. Radicais livres e estresse oxidativo.....	11
1.7. Metabolismo energético.....	13
1.8. Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
<b>3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
3.1 Capítulo I.....	22
3.2 Capítulo II .....	34
3.3 Capítulo III .....	65
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>100</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>113</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>114</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>115</b>

## RESUMO

A hipoxantina, principal oxipurina envolvida na via de salvação das purinas no cérebro, acumula-se na doença de Lesch-Nyhan, um erro inato do metabolismo das purinas. Os sintomas clínicos manifestam-se precocemente na vida dos pacientes, incluindo alterações motoras e cognitivas, retardo mental e automutilação. Embora os mecanismos subjacentes da disfunção cerebral na doença de Lesch-Nyhan sejam pouco compreendidos, o acúmulo de hipoxantina parece contribuir para os danos neurológicos. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da administração intraestriatal de hipoxantina em ratos infantis e adultos jovens submetidos à cirurgia estereotáxica. Neste estudo, analisamos primeiramente o efeito da hipoxantina sobre os parâmetros neuroinflamatórios e oxidativos em estriados de ratos infantis e adultos jovens. Foram avaliados também alguns parâmetros neuroenergéticos. Ratos Wistar de 21 e 60 dias de vida foram submetidos à cirurgia estereotáxica e foram divididos em dois grupos: controle (infusão de solução salina 0,9%) e hipoxantina (10  $\mu$ M). A administração intraestriatal de hipoxantina aumentou os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  e o imunoconteúdo da subunidade NF- $\kappa$ B / p65 nuclear em estriado de ambas as idades de ratos. A ativação microglial e astrocitária foram observadas pelo aumento do imunoconteúdo de Iba1 e GFAP, respectivamente, no estriado de ratos de 21 dias. Todos os parâmetros oxidativos foram alterados, sugerindo uma forte relação neurotóxica de hipoxantina e estresse oxidativo. Em ratos de 60 dias de vida, a hipoxantina aumentou a atividade da succinato desidrogenase e do complexo II e diminuiu a atividade da citocromo c oxidase e seu imunoconteúdo. A injeção de hipoxantina diminuiu a porcentagem marcação de membrana mitocondrial e aumentou marcação de potencial mitocondrial. A hipoxantina também diminuiu o número de células vivas e aumentou o número de células apoptóticas. Em ratos de 21 dias de vida, a hipoxantina alterou alguns parâmetros do metabolismo energético e diminuiu a atividade de Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, provavelmente por danos às proteínas, visto pela redução de conteúdo de sulfidrilas. Nossos achados mostram que a administração de hipoxantina alterou parâmetros neuroinflamatórios e neuroenergéticos, possivelmente por meio de desequilíbrio oxidativo, sugerindo que esses processos podem estar envolvidos, pelo menos em parte, com os distúrbios neurológicos encontrados em pacientes com doença de Lesch-Nyhan.

**Palavras-chave:** hipoxantina; neuroinflamação; estresse oxidativo; neuroenergética; apoptose; Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase



## ABSTRACT

Hypoxanthine, the major oxypurine metabolite involved in purine's salvage pathway in the brain, is accumulated in Lesch-Nyhan disease, an inborn error of metabolism of purine. The clinical symptoms manifest early in the patients' lives, including motor and cognitive alterations, mental retardation and self-mutilation. Although the underlying mechanisms of brain dysfunction in Lesch-Nyhan disease are poorly understood, the accumulation of hypoxanthine appears to contribute to neurological damage. The purpose of this study was to investigate the effects of hypoxanthine intrastriatal administration in infant and young adult rats submitted to stereotactic surgery. We firstly analyzed the effect of hypoxanthine on neuroinflammatory and oxidative parameters in striatum of infant and young adult rats. We also evaluated some neuroenergetic parameters. Wistar rats of 21 and 60 days of life underwent stereotactic surgery and were divided into two groups: control (infusion of saline 0.9%) and hypoxanthine (10  $\mu$ M). Intrastriatal administration of hypoxanthine increased IL-6 and TNF- $\alpha$  levels and nuclear immunocontent of NF- $\kappa$ B/p65 subunit in striatum of rats of both ages. Microglial and astrocyte activation was seen by the increase in Iba1 and GFAP immunocontent, respectively, in striatum of infant rats. All oxidative parameters were altered, suggesting a strong neurotoxic hypoxanthine role on oxidative stress. In 60-day-old rats hypoxanthine increased succinate dehydrogenase and complex II activities and diminished cytochrome c oxidase activity and immunocontent. Hypoxanthine injection decreased the percentage of cells with mitochondrial membrane label and increased mitochondrial mass potential labeling. Hypoxanthine also diminished the number of live cells and increased the number of apoptotic cells. In 21-days-old rats hypoxanthine altered some energy metabolism parameters and decreased Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity probably by protein damage, seen in the reduction of sulfhydryl content. Our findings show that the administration of hypoxanthine altered neuroinflammatory and neuroenergetic parameters, possibly through oxidative imbalance, suggesting that these processes may be involved, at least in part, with the neurological disorders found in patients with Lesch-Nyhan disease.

**Keywords:** hypoxanthine; neuroinflammation; oxidative stress; neuroenergetic; apoptosis; Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ATP: Adenosina trifosfato  
BHE: Barreira hemato-encefálica  
CII: Complexo II  
CAT: Catalase  
CK: Creatina quinase  
COX: Citocromo c oxidase  
DCFDA: Diacetato de 2'7'- diclorofluoresceína  
DCFH: 2'7'- diclorofluoresceína  
EIM: Erros inatos do metabolismo  
ERO: Espécies reativas de oxigênio  
GFAP: Proteína glial fibrilar ácida  
GSH: Glutathiona reduzida  
GPx: Glutathiona peroxidase  
HPRT: Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase  
Iba1: Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1  
IL-6: Interleucina 6  
iNOS : Óxido nítrico sintase induzível  
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NF-κB: Fator nuclear kappa B  
NO: Óxido nítrico  
PI: Iodeto de propídeo  
PK: Piruvato quinase  
SDH: Succinato desidrogenase  
SNC: Sistema nervoso central  
SOD: Superóxido dismutase  
TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TCA: Ácido tricarbóxico  
TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Metabolismo da hipoxantina na doença de Lesch-Nyhan.....	5
<b>Figura 2.</b> Participação da ativação microglial na morte neuronal.....	11
<b>Figura 3.</b> Fosforilação oxidativa .....	15
<b>Figura 4.</b> Estrutura da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase.....	17

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Erros inatos do metabolismo

Erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças hereditárias, multifatoriais, caracterizadas por defeitos genéticos que promovem a síntese anômala de uma proteína, geralmente uma enzima, com atividade parcial ou totalmente reduzida, resultando na alteração da via metabólica com consequente acúmulo de substrato e diminuição da síntese de produto. Outras substâncias tóxicas podem ser originadas por esse bloqueio metabólico através de rotas metabólicas alternativas (Scriver, 2008).

Correspondendo a cerca de 10% de todas as doenças genéticas, os EIM somam aproximadamente 1000 doenças diferentes identificadas até o momento (Mak et al., 2013). As doenças decorrentes dos EIM são consideradas raras, quando analisadas individualmente. Porém, em conjunto, apresentam alta frequência, acometendo aproximadamente 1:1000 recém-nascidos vivos (Scriver, 2008). Outro aspecto importante a ressaltar é a prevalência de EIM em grupos étnicos, podendo qualquer um ser acometido (Mak et al., 2013), contudo a frequência de determinado EIM pode variar em populações específicas, especialmente devido ao número de casamentos dentro da família, uma vez que um quinto dos casais da população mundial é formado por matrimônios consanguíneos (Hamamy, 2012).

As manifestações clínicas dessas doenças são diversas e geralmente inespecíficas, como por exemplo, vômitos, odores peculiares, letargia, atraso no desenvolvimento psicomotor, acidose metabólica, convulsões e coma,

sendo que esses sintomas podem aparecer desde as primeiras horas de vida até alguns meses após o nascimento (Kasper et al., 2010). No entanto, alguns EIM podem ser absolutamente assintomáticos (Raghuveer et al., 2006). Essa diversidade sintomatológica deve-se principalmente às diferenças no espectro da deficiência enzimática, área do metabolismo e/ou tecido afetados.

A classificação dos EIM é determinada pela área do metabolismo afetada, que podem ser: de aminoácidos, de ácidos orgânicos, de glicídios, de lipídios, de glicosaminoglicanos, de glicoproteínas, de enzimas eritrocitárias, de metais, de lipoproteínas, de hormônios, de proteínas plasmáticas e de purinas e pirimidinas. Dentre os EIM das purinas, destaca-se a doença de Lesch-Nyhan, caracterizada pelo acúmulo tecidual de hipoxantina, xantina e ácido úrico (Lesch and Nyhan, 1964).

## **1.2. Metabolismo de purinas**

As purinas são moléculas heterocíclicas nitrogenadas que ocorre mais amplamente na natureza. Além do papel essencial na estrutura do DNA e do RNA, os numerosos derivados purínicos são importantes a diversos processos metabólicos. Por exemplo, Adenosina 5'-trifosfato (ATP) é a principal molécula energética celular, Adenosina 3',5'-ciclofosfato (cAMP) é um segundo mensageiro capaz de controlar a ativação de proteínas quinases na célula; nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH<sub>2</sub>) são coenzimas que participam nos processos de redução-oxidação celular e geração de energia. Adenina e guanina são principais bases púricas encontradas nas células, as quais podem formar nucleosídeos através da incorporação de ribose ou 2-desoxirribose ao anel purínico. Nucleotídeos

purínicos, os quais desempenham importantes papéis no metabolismo celular, resultam da adição de ésteres de fosfato nos nucleosídeos (Rosemeyer, 2004).

Paralelamente, outra classe de derivados purínicos, as oxipurinas, tais como hipoxantina e xantina, apresentam um importante papel no metabolismo celular. O fornecimento de purinas para o reservatório celular depende das vias de síntese *de novo*, recuperação ou através da degradação de nucleosídeos exógenos. A via de síntese *de novo* das purinas consiste em diversos passos metabólicos, utilizando grande quantidade de ATP celular para fornecimento de energia (Nelson and Cox, 2013).

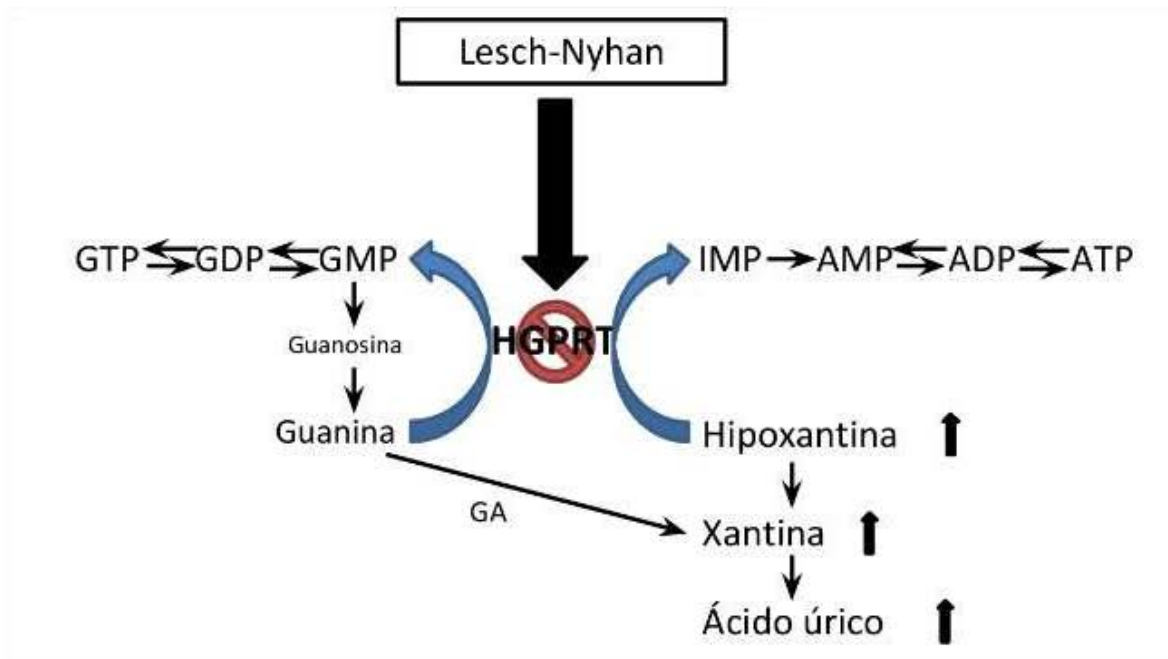
A síntese *de novo* das purinas é composta por uma série de reações enzimáticas as quais requerem a hidrólise de ATP, resultando na formação de inosina monofosfato (IMP) (Henderson et al., 2008). Por outro lado, a via de recuperação utiliza hipoxantina, guanina e adenina como substrato para a ação de enzimas fosforribosiltransferases. Essas enzimas transferem a ribose fosfato do fosforribosilpirofosfato para a base purínica na presença de magnésio. Adenina fosforribosiltransferase converte adenina em adenina monofosfato (AMP), enquanto a enzima Hipoxantina–guanina fosforribosiltransferase (HPRT) age sobre hipoxantina e guanina para formar IMP e guanosina monofosfato (GMP), respectivamente. Essa rota de recuperação conserva energia e permite que as células formem nucleotídeos a partir de bases pré-existentes, tendo em vista que 90% das purinas livres geradas durante o metabolismo intracelular provêm da rota de salvação (Kelley and Andersson, 2014).

A manutenção dos níveis intracelulares de purinas também pode ser realizada através da incorporação de purinas livres e nucleosídeos produzidos

no meio extracelular. A incorporação desses compostos depende da atividade das enzimas envolvidas na rota de regeneração das purinas. A via de degradação das purinas envolve as enzimas 5'-nucleotidase, purina nucleosídeo fosforilase, xantina oxidase, guanase e adenosina desaminase, sendo ácido úrico o produto final, o qual pode ser facilmente excretado (Jinnah and Friedmann, 2001; Visser et al., 2000).

A hipoxantina é uma das maiores fontes de purinas passíveis de reutilização nos tecidos de mamíferos, ela atua como um intermediário ativo nas células, podendo ser degradada pela enzima xantina oxidase, formando xantina, ou IMP pela ação da enzima HPRT (figura 1). Esta reação é responsável pela manutenção da quantidade de hipoxantina intracelular, o qual será utilizado na conversão de produtos úteis para as células (Visser et al., 2000).

A HPRT apresenta-se amplamente distribuída nos tecidos, especialmente no sistema nervoso central (SNC), sendo que os gânglios da base, particularmente, são dependentes da atividade dessa enzima para manutenção dos níveis de purinas teciduais através da via de reutilização (Visser et al., 2000). Tendo em vista a vital importância dos compostos purínicos e da atividade da enzima HPRT para o metabolismo das purinas, defeitos nessa enzima (perda parcial ou total da atividade), reduzem a afinidade da enzima pela hipoxantina, guanina e PP-ribose-P, com conseqüente acúmulo desses compostos, caracterizando a doença de Lesch-Nyhan, apresentando acúmulo tecidual de oxipurinas, especialmente a hipoxantina, e pronunciadas alterações no SNC (Nyhan, 2008).



**Figura 1.** Metabolismo da hipoxantina na doença de Lesch-Nyhan. Abreviações utilizadas: ADP, adenosina difosfato; AMP, adenosina monofosfato; ATP, adenosina trifosfato; GDP, guanosina difosfato; GMP, guanosina monofosfato; GTP, guanosina trifosfato; GA, guanase; HGPRT, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase; IMP, Inosina monofosfato.

### 1.3. Doença de Lesch-Nyhan

A doença de Lesch-Nyhan é um EIM associado à herança autossômica recessiva ligada ao sexo. Caracteriza-se pela deficiência na atividade da enzima HPRT a qual catalisa a conversão de hipoxantina e guanina em seus respectivos nucleotídeos IMP e GMP (Jlannah et al., 2013; Nyhan, 1978). Além disso, ocorre um aumento da via de síntese de novo das purinas decorrente da ineficiência na rota de regeneração (Torres and Puig, 2007). Essas alterações acarretam o acúmulo tecidual de xantina, ácido úrico e, principalmente, hipoxantina. O primeiro caso da doença foi publicado por Lesch e Nyhan (Lesch and Nyhan, 1964). Atualmente, essa doença apresenta prevalência a



nível mundial aproximada de 1/ 380.000 nascidos vivos, sendo 1/ 235.000 nascidos vivos na Espanha (Torres and Puig, 2007).

Pacientes portadores da doença de Lesch-Nyhan geralmente apresentam atividade da HPRT inferior a 1,5%. Diversos estudos apontam para as marcantes características genéticas (Torres and Puig, 2015), metabólicas (Jinnah et al., 2013), cognitivas (Schretlen et al., 2015) e comportamentais (Cauwels and Martens, 2005) associadas a esta doença. Pacientes afetados apresentam proeminentes alterações motoras e cognitivas, aliado à hiperuricemia, gota e automutilação, a qual é caracterizada por mordeduras de lábios, língua e dedos, com aparente perda tecidual (Cauwels and Martens, 2005; Jinnah et al., 1990). Indivíduos com a doença tipicamente têm um curso normal pré-natal e perinatal. A característica mais comum é o atraso no desenvolvimento durante o primeiro ano de vida, com hipotonia e atraso de habilidades motoras normalmente evidentes nos três a seis meses de idade. Nos primeiros anos de vida, os pacientes apresentam movimentos involuntários anormais indicativos de envolvimento extrapiramidal (Schretlen et al., 2005). Com a manutenção do controle dos sintomas de forma eficaz, a maioria de indivíduos sobrevive até a segunda ou terceira década de vida (Nyhan et al., 2014).

Estudos histopatológicos demonstraram que os pacientes com a doença de Lesch-Nyhan apresentam diminuição do volume cerebral da substância branca mais pronunciado do que da substância cinzenta, provavelmente causada por uma deficiência no desenvolvimento e não por uma alteração neurodegenerativa (Schretlen et al., 2015). Estudos neuroquímicos demonstraram uma redução do conteúdo dopaminérgico no estriado, similares

àqueles encontrados em pacientes portadores da doença de Parkinson (Göttle et al., 2014; Visser et al., 2002). Segundo alguns autores o estresse oxidativo poderia estar envolvido no processo de deterioração estriatal (Blesa et al., 2015; Göttle et al., 2014). Além disso, a dependência estriatal da atividade da HPRT para a manutenção dos níveis de purinas, aliada à diminuição dos prolongamentos dos neurônios dopaminérgicos poderiam contribuir para o aparecimento de disfunção dopaminérgica (Göttle et al., 2014).

A análise dos níveis séricos de hipoxantina também contribui para a determinação do diagnóstico definitivo (Harkness et al., 1988; Puig et al., 1989). Os valores obtidos para esta oxipurina em plasma de indivíduos normais correspondem a 1,7  $\mu\text{M}$  para hipoxantina, entretanto, em pacientes com a doença de Lesch-Nyhan estas concentrações podem atingir valores de 10  $\mu\text{M}$ . As concentrações de hipoxantina também se encontram elevadas similarmente no líquido cefalorraquidiano dos indivíduos portadores da doença (Puig et al., 1989).

O tratamento para controlar a superprodução de ácido úrico em pacientes com doença de Lesch-Nyhan é feito pela administração de alopurinol, que inibe a conversão de hipoxantina e guanina em ácido úrico pela enzima xantina oxidase. Uma vez que o alopurinol aumenta simultaneamente os metabólitos relacionados da oxipurina, é necessária uma hidratação generosa para manter um fluxo de urina ativo, eliminando continuamente todos os metabólitos de purina. Infelizmente, controlar a superprodução de ácido úrico não melhora os outros sintomas clínicos, que têm uma patogênese independente (Jinnah, 2009).

Estudos realizados em nosso grupo demonstram que a hipoxantina inibe significativamente a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e altera alguns parâmetros de estresse oxidativo em estriado de ratos de 60 dias de vida (Bavaresco et al., 2007a; Caren Serra Bavaresco et al., 2008). Entretanto, os mecanismos pelos quais a hipoxantina atua no SNC e o exato papel desta oxipurina no dano neurológico presente na doença de Lesch-Nyhan ainda permanecem desconhecidos.

#### **1.4. Modelos experimentais da doença de Lesch-Nyhan**

Os modelos experimentais são essenciais para o melhor entendimento da doença de Lesch-Nyhan uma vez que essa doença é rara, o que torna os estudos com pacientes muito desafiadores, pois mesmo se um número suficiente de pacientes fosse examinado, os tipos de estudos necessários para elucidar a base biológica para a disfunção comportamental não poderiam ser realizados com seres humanos (Jinnah and Friedmann, 2001).

O uso de camundongos geneticamente modificados é uma importante ferramenta, na obtenção de informações para a compreensão de doenças metabólicas. Porém em alguns modelos o fenótipo desenvolvido pelos animais não mimetizam plenamente a patologia humana (Elsea and Lucas, 2002). Na tentativa de estudar a causa subjacente do complexo fenótipo observado em pessoas com a doença de Lesch-Nyhan, foram criados pelo menos dois modelos com camundongos que exibem deficiência no gene *Hprt* que codifica a enzima HPRT, no entanto, os camundongos apresentam comportamento normal, sem fenótipo aparente (Hooper et al., 1987; Kuehn et al., 1987).

Outro modelo animal desenvolvido para abordar o significado funcional da perda de dopamina na doença de Lesch-Nyhan implica em administração da neurotoxina 6-hidroxi-dopamina, uma vez que pacientes afetados apresentam uma grave perda dopaminérgica e uma redução na mobilidade que se assemelha à doença de Parkinson. A principal limitação desse modelo é que não é possível explorar os mecanismos pelos quais a deficiência de HPRT pode desencadear o defeito dopaminérgico (Jinnah, 2009).

Modelos celulares de células neurais e não-neurais também foram desenvolvidos para explorar aspectos específicos do metabolismo e da biologia celular em um ambiente experimental muito controlado. Contudo, os modelos celulares também têm suas limitações. Uma limitação é que os resultados obtidos em condições artificiais *in vitro* podem não se aplicar *in vivo*. Uma solução para este problema seria tentar replicar as principais conclusões de modelos celulares usando modelos *in vivo* mais complexos ou pacientes. Outra limitação dos modelos celulares é que os resultados obtidos com um tipo de célula podem não se aplicar a outros tipos celulares (Jinnah, 2009).

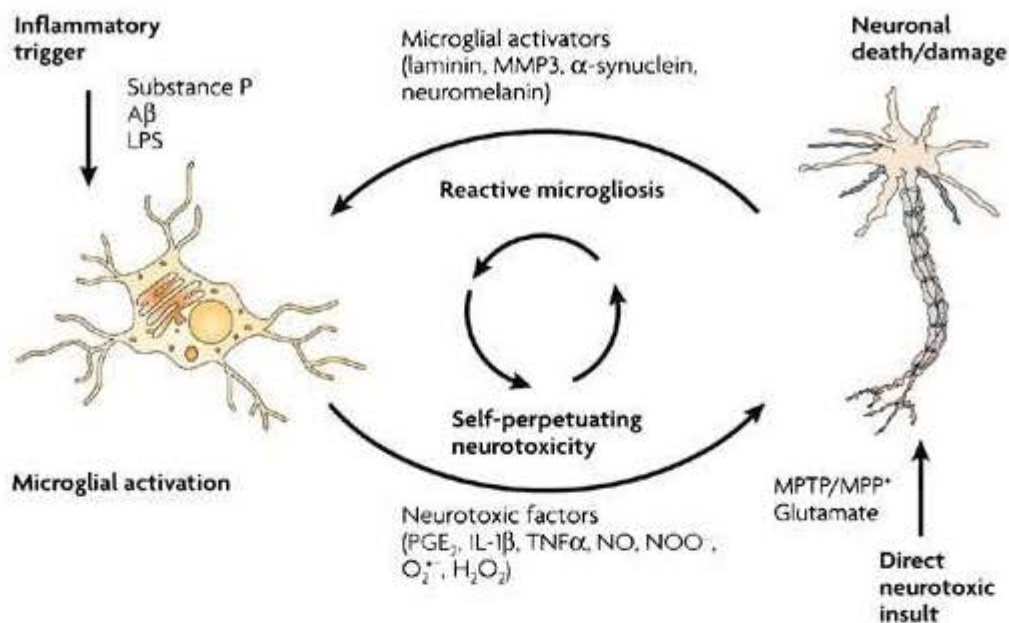
### **1.5. Neuroinflamação**

A inflamação é, essencialmente, uma resposta protetora cujo propósito final é eliminar o agente indutor de injúria. O agente danoso é primeiramente reconhecido pelo sistema imune do organismo, seguido da liberação de mediadores químicos e ativação de diversos tipos celulares que se acumulam no sítio inflamatório. Dentre os mediadores podemos citar histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação plaquetário, espécies reativas de oxigênio (ERO), óxido nítrico (NO), citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda, fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) e o

sistema complemento. Embora a inflamação tenha uma função protetora no controle de infecções e promova a reparação tecidual, também pode causar danos nos tecidos e doenças (Abbas et al., 2010).

Neuroinflamação é inflamação associada ao tecido nervoso, incluindo cérebro e medula espinhal. Pode ter início em resposta a diversos sinais, incluindo infecção, lesão cerebral traumática, metabólitos tóxicos ou autoimunidade. No cérebro, diferentemente dos outros tecidos, a inflamação é caracterizada pela ativação de microglia e astrócitos, principalmente a primeira (Xanthos and Sandkühler, 2014).

O SNC é tipicamente um local imunologicamente privilegiado, uma vez que as células imunes periféricas são geralmente bloqueadas pela barreira hemato-encefálica (BHE) (Das Sarma, 2014). No entanto, como pode ser visto na figura 2, a ativação microglial e astrócitária promove a liberação de uma série de fatores que modulam mediadores pró- e anti-inflamatórios (citocinas, quimiocinas, NO, fatores de crescimento e ERO), que, por sua vez, regulam positivamente moléculas de adesão, aumentando a permeabilidade da barreira hematoencefálica, facilitando a invasão de células imunes periféricas, que induzem a liberação de moléculas potencialmente tóxicas, podendo comprometer células cerebrais (Lucas et al., 2006). Assim, o SNC pode ser influenciado não só por mediadores pró- e anti-inflamatórios produzidos dentro do cérebro, mas também através das ações de mediadores oriundos da periferia (Xanthos and Sandkühler, 2014). Além disso, embora a inflamação seja uma resposta iniciada para proteger o sistema nervoso central de agentes infecciosos, o resultado pode ser uma inflamação tóxica e generalizada, bem como migração adicional de leucócitos através da BHE (Gendelman, 2002).



Nature Reviews | Neuroscience

**Figura 2. Participação da ativação microglial na morte neuronal (Fonte Nature Reviews).**

### 1.6. Radicais livres e estresse oxidativo

O radical livre define-se por ser qualquer espécie química que contém um ou mais elétron(s) desemparelhado(s) no seu orbital mais externo, levando a uma elevada reatividade e instabilidade da molécula. Eles são gerados fisiologicamente nos sistemas vivos quando aproximadamente 5% do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) é incompletamente reduzido à formação de água na cadeia transportadora de elétrons. Existem diversas espécies reativas, dentre as principais estão o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) e peróxido nítrico (ONOO<sup>-</sup>), o qual é formado a partir da reação do NO<sup>•</sup> com o O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Halliwell, 2012).

As espécies reativas também estão associada a muitos processos fisiológicos, executando funções biológicas importantes. Evidências apontam para a participação destas espécies reativas em processos de sinalização celular (Schieber and Chandel, 2014), síntese e regulação proteica (Dasuri et al., 2013), nos processos inflamatórios (El Assar et al., 2013) e em eventos mitogênicos (Valko et al., 2007). Contudo, em altas concentrações, as espécies reativas apresentam um papel tóxico para as células. Neste contexto, são amplamente discutidas na literatura as alterações nocivas provocadas por espécies reativas em lipídios, proteínas e também no DNA e que podem levar à perda da função celular. Além disso, enzimas, proteínas transportadoras e receptores podem ter sua estrutura alterada quando oxidadas por espécies reativas com consequente prejuízo das suas funções (Halliwell, 2012; Valko et al., 2007).

Fisiologicamente as espécies reativas são mantidas em equilíbrio devido, em grande parte, à capacidade de neutralização do sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. Dentre as defesas antioxidantes enzimáticas estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Dentre os antioxidantes não enzimáticos podemos citar ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutathione, carotenóides, flavonóides, entre outros (Halliwell, 2011). A SOD é uma metaloenzima responsável pela dismutação do ânion superóxido gerando peróxido de hidrogênio e oxigênio. Nesta perspectiva, o peróxido de hidrogênio, formado pela ação da SOD, é removido pela ação das enzimas CAT e GPX, resultando em  $H_2O$  e  $O_2$  (Abreu and Cabelli, 2010). A CAT é mais comumente encontrada nos peroxissomos da maioria dos tecidos em humanos, mas

também é encontrada na mitocôndria. A catalase mitocondrial tem um papel preventivo principalmente contra as alterações lipídicas da membrana, inativação de componentes da cadeia respiratória, mutações e rupturas do DNA mitocondrial e abertura de poros de transição de permeabilidade pelo peróxido de hidrogênio (Zamocky et al., 2008). A GPx, localizada nas membranas celulares, converte o peróxido de hidrogênio através do acoplamento de sua redução a água com concomitante oxidação da glutathione ao dissulfeto de glutathione (Margis et al., 2008).

O processo denominado como estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes, e pode estar associado a diversas patologias. O cérebro, por sua vez, é particularmente suscetível ao estresse oxidativo. Alguns fatores que tornam o SNC altamente vulnerável às espécies reativas incluem: alto consumo de oxigênio; presença de neurotransmissores que sofrem auto-oxidação como dopamina, serotonina e noradrenalina; alta concentração de ferro; lipídios de membrana ricos em ácidos graxos insaturados. Além disso, o cérebro apresenta baixos níveis de defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (Halliwell, 2012). Evidências têm sugerido o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese de doenças neurodegenerativas como Huntington, Alzheimer e Parkinson (Blesa et al., 2015; Gil-Mohapel et al., 2014; Wang et al., 2014) e erros inatos do metabolismo (Olsen et al., 2015).

### **1.7. Metabolismo energético**

Comparada à sua elevada atividade metabólica, o cérebro possui pouca reserva energética, necessitando de um suprimento contínuo energético,



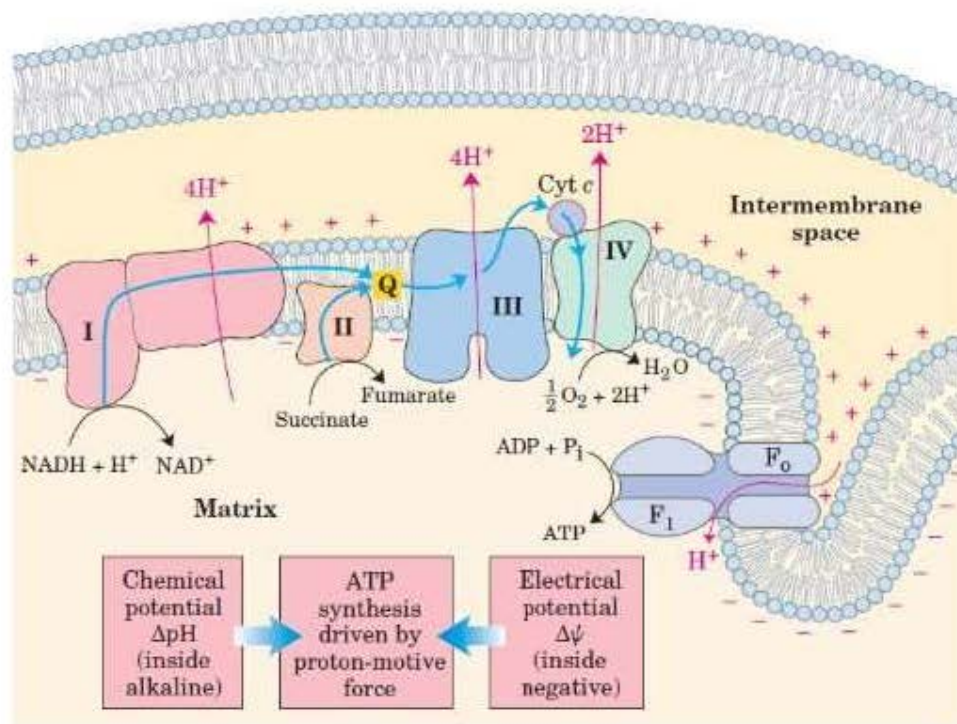
principalmente glicose. A glicólise em conjunto com o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa são as rotas essenciais para a produção de energia cerebral (Vaishnavi et al., 2010).

A glicólise é composta por uma série de reações que ocorrem no citosol, tendo como produto final o piruvato. O ciclo do ácido cítrico ocorre na matriz mitocondrial e consiste em uma sequência de reações em que, cada volta do ciclo, são formadas três moléculas de NADH, uma de FADH<sub>2</sub>, duas de CO<sub>2</sub> e uma de guanosina trifosfato (GTP). O NADH e FADH<sub>2</sub> produzidos no ciclo são carreadores de elétrons e são utilizados na cadeia transportadora de elétrons para a produção de ATP na fosforilação oxidativa (Vuoristo et al., 2016).

A cadeia transportadora de elétrons é composta por quatro complexos enzimáticos e dois transportadores móveis de elétrons (coenzima Q e citocromo c) os quais realizam a transferência dos elétrons desde as coenzimas reduzidas até o aceptor final, o oxigênio. Os elétrons provenientes do NADH são entregues ao complexo I (NADH desidrogenase ou NADH: ubiquinona oxirredutase) que transfere esses elétrons para a ubiquinona, formando ubiquinol. O complexo II (ou succinato:ubiquinona oxirredutase, CII) é formado pela enzima succinato desidrogenase (SDH) e três subunidades hidrofóbicas. Esse complexo reduz a ubiquinona a ubiquinol com elétrons do FADH<sub>2</sub>, proveniente da oxidação do succinato a fumarato no ciclo do ácido cítrico. O complexo III (ubiquinona-citocromo c oxirredutase) transfere elétrons do ubiquinol para o citocromo c. O complexo IV, também denominado citocromo c oxidase (COX), catalisa a transferência dos elétrons do citocromo c reduzido para o O<sub>2</sub>, reduzindo-o a H<sub>2</sub>O. O fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória é acompanhado pelo bombeamento de

prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, pelos complexos I, III e IV (Figura 4). Com isso, cria-se um gradiente eletroquímico transmembrana que é utilizado como força próton-motriz pelo complexo V (ATP sintase) para síntese de ATP partir de ADP e Pi, processo denominado fosforilação oxidativa (Navarro and Boveris, 2007).

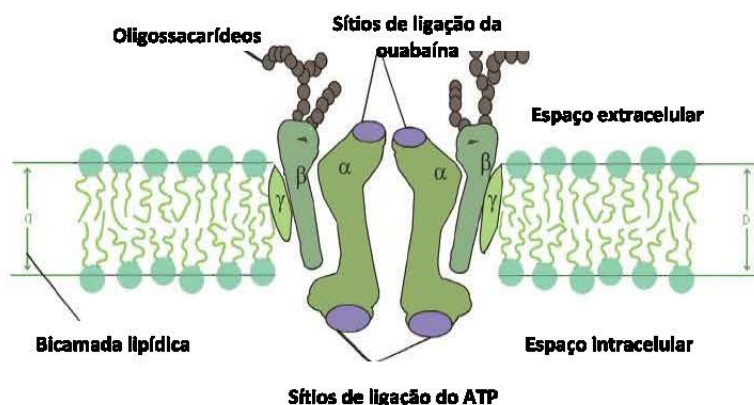
Alterações no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam à diminuição da síntese de ATP. Nesse contexto, dados da literatura sugerem que uma diminuição do metabolismo energético pode estar implicada na fisiopatologia de alguns distúrbios neurológicos, como demência, isquemia cerebral e as doenças de Alzheimer e Parkinson (Beal, 2008; Gibson et al., 2010; Kowaltowski et al., 2009; Schurr, 2002).



**Figura 3. Fosforilação oxidativa (Nelson and Cox, 2008).**

### **1.8. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase**

A Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase é uma proteína integral de membrana que utiliza energia da hidrólise da molécula de ATP para translocar, simultaneamente, 3 íons Na<sup>+</sup> para o compartimento extracelular em troca do transporte de 2 íons K<sup>+</sup> para dentro da célula, gerando um gradiente eletroquímico através da membrana. Diversas funções celulares estão acopladas à manutenção das concentrações intracelulares e extracelulares de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, tais como controle do volume celular, excitabilidade neuronal, atividade de enzimas citosólicas, contração muscular, além de auxiliar no movimento de outros íons e compostos através da membrana, como, por exemplo, neurotransmissores (Kaplan, 2002; Ogawa et al., 2009). Essa enzima funcional é composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades menores  $\beta$ , sendo que a subunidade  $\alpha$  é responsável pela atividade catalítica da enzima e sofre fosforilação e mudança conformacional acoplada à hidrólise de ATP e ao transporte dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>. Essa subunidade também contém o sítio de ligação da ouabaína (glicosídeo cardíaco e inibidor específico da enzima). A subunidade  $\beta$  é uma proteína glicosilada de adesão intercelular necessária para direcionar a subunidade  $\alpha$  para a membrana plasmática. Outra subunidade ainda menor ( $\gamma$ ) tem sido implicada na regulação da atividade dessa enzima (Geering, 2008) (Figura 3).



**Figura 4.** Estrutura da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Modificado de Suhail, 2010).

Foram identificados em mamíferos genes que codificam quatro isoformas da subunidade catalítica  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$ ), sendo que as isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  encontram-se em diferentes tipos celulares do SNC. A isoforma  $\alpha_1$  caracteriza-se por ser ubiquamente expressa enquanto a  $\alpha_2$  é expressa em pequenos subconjuntos de neurônios, porém em muitos astrócitos. A isoforma  $\alpha_3$  é exclusivamente expressa em neurônios de várias estruturas cerebrais (Bøttger et al., 2011). Em mamíferos existem três isoformas da subunidade  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ), sendo que a isoforma  $\beta_1$  é expressa em neurônios enquanto a  $\beta_2$  é encontrada em astrócitos (Benarroch, 2011; Geering, 2008).

A atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é regulada por diversos fatores como disponibilidade de substrato, componentes da membrana celular, hormônios e fosforilação (Hatou, 2011; Poulsen et al., 2010). Além disso, essa enzima é sensível ao ataque de radicais livres (Liu et al., 2012), podendo ser inibida por metabólitos formados durante a peroxidação lipídica e por alterações na membrana plasmática (Banerjee et al., 2012).

A inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase está relacionada a diversas patologias do SNC tais como depressão (Goldstein et al., 2006), epilepsia (Marquezan et al., 2013), doença de Parkinson e doença de Alzheimer (Arnaiz and Ordieres, 2014; Vitvitsky et al., 2012). Estudos mostram também que a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase também está alterada em EIM (Bavaresco et al., 2007a; Ferreira et al., 2011; Kolling et al., 2016; Wyse et al., 2002). No entanto, mais estudos são necessários para compreender os efeitos da hipoxantina sobre a função da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, especialmente durante o desenvolvimento cerebral.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

A fim de investigar e compreender as alterações cerebrais promovidas pela hipoxantina, o objetivo **geral** do presente trabalho foi avaliar o efeito dessa purina sobre o perfil neuroinflamatório e estado redox em estriado de ratos submetidos ao modelo de injeção intraestriatal de hipoxantina. Além disso, investigamos os possíveis efeitos da administração de hipoxantina sobre a bioenergética cerebral, bem como possíveis mecanismos de morte celular em diferentes idades de ratos.

### **2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos encontram-se subdivididos, os quais serão apresentados na forma de artigos científicos, como segue:

#### **Capítulo I**

- Avaliar o efeito da hipoxantina sobre o perfil inflamatório, determinando o imunoconteúdo de NF- $\kappa$ B, níveis de citocinas (interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )), bem como o imunoconteúdo de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e níveis de nitritos em estriado de ratos infantis e adultos jovens submetidos ao modelo de administração intraestriatal de hipoxantina;

- Analisar uma possível neuroinflamação, avaliando a ativação microglial e astrócitária através do imunoconteúdo de Iba1 (molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1) e GFAP (proteína glial fibrilar ácida), respectivamente, em

estriado de ratos infantis e adultos jovens submetidos à administração intraestriatal de hipoxantina;

- Avaliar alguns parâmetros de estresse oxidativo, a saber: os níveis de espécies reativas, a atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx), bem como dano ao DNA em estriado de ratos infantis e adultos jovens submetidos ao modelo de administração intraestriatal de hipoxantina;

## **Capítulo II**

- Investigar o efeito da hipoxantina sobre a bioenergética, avaliando a atividade da piruvato quinase, enzimas da fosforilação oxidativa, níveis de ATP, bem como a regulação de creatina quinase (CK) citosólica e mitocondrial em estriado de ratos de 60 dias submetidos ao modelo de administração intraestriatal de hipoxantina;

- Analisar a funcionalidade da mitocôndria pelo método de MitoTracker, determinando a massa e o potencial mitocondrial, além de investigar morte celular por Anexina-PI em estriado de ratos de 60 dias submetidos ao modelo de administração intraestriatal de hipoxantina;

## **Capítulo III**

- Determinar a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e o imunoconteúdo das subunidades catalíticas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ ) em estriado de ratos de 21 dias tratados com hipoxantina;

- Investigar o efeito da hipoxantina sobre a bioenergética, avaliando a atividade da piruvato quinase, enzimas da fosforilação oxidativa, níveis de ATP e regulação de creatina quinase citosólica e mitocondrial em estriado de ratos de 21 dias submetidos ao modelo.

### **3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS**

Os procedimentos experimentais e resultados serão apresentados na forma de artigos científicos. Todas as informações referentes ao desenho experimental estão contidas nos capítulos I, II e III.



### **3.1 Capítulo I**

## **Hypoxanthine Intrastriatal Administration Alters Neuroinflammatory Profile and Redox Status in Striatum of Infant and Young Adult Rats**

Helena Biasibetti, Paula Pierozan, André Felipe Rodrigues,  
Vanusa Manfredini, Angela T. S. Wyse

**Periódico:** Molecular Neurobiology

**Status:** Publicado em março de 2016

**DOI:** 10.1007/s12035-016-9866-6

## **3.2 Capítulo II**

### **Hypoxanthine Induces Neuroenergetic Impairment and Cell Death in Striatum of Young Adult Wistar Rats**

Helena Biasibetti Brendler, Felipe Schmitz, Paula Pierozan, Bruna S. Zanotto,  
Rodrigo B. de Andrade, Clovis M.D. Wannmacher, Angela T.S Wyse

**Status:** a ser submetido

### **3.3 Capítulo III**

#### **Intrastriatal Hypoxanthine Administration Alters Energy Metabolism, Creatine Kinase and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in Striatum of Infant Rats**

Helena Biasibetti Brendler, Felipe Schmitz, Paula Pierozan, Fernanda S. Ferreira, Ana Paula Tagliari, Caroline Acauan Prezzi, Rodrigo Binkowski de Andrade, Clovis M.D. Wannmacher, Angela T.S Wyse

**Status:** a ser submetido

## 4. DISCUSSÃO

A hipoxantina, principal metabólito de purina envolvido na via de salvação de purinas no cérebro, encontra-se aumentada no plasma de pacientes com doença de Lesch-Nyhan cinco vezes mais do que em indivíduos normais. Essa desordem e suas variantes menos severas são causadas por mutações no gene HPRT1, que codifica a enzima de reciclagem de purinas HPRT (Jinnah et al., 2013, 2004). Os pacientes com essa doença apresentam vários sinais e sintomas, incluindo retardo mental, comportamento de automutilação além de disfunção do sistema dopaminérgico nos gânglios da base (Göttle et al., 2014; Jinnah, 2009). Considerando que o acúmulo de hipoxantina está relacionado com a fisiopatologia do dano cerebral encontrado nos pacientes com a doença de Lesch-Nyhan, no presente estudo investigamos o efeito da injeção intraestriatal de hipoxantina sobre o perfil inflamatório, parâmetros energéticos e atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, analisando um possível envolvimento oxidativo para melhor compreender os mecanismos envolvidos na neurotoxicidade dessa purina.

No capítulo I dessa dissertação analisamos primeiramente o efeito da hipoxantina sobre o perfil neuroinflamatório. Durante muito tempo, o SNC foi considerado imunologicamente privilegiado. Acreditava-se que não havia relação entre o SNC e processos inflamatórios. Atualmente, sabe-se que o SNC tem um papel na inflamação e na resposta a lesões, infecções ou doenças. Células do SNC, principalmente a microglia, geram mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas, óxido nítrico, prostaglandinas, fatores de crescimento e as espécies reativas de oxigênio) modulando entre pró- e anti-inflamatórios (Heneka et al., 2015). Estes mediadores agregam as moléculas

de adesão, aumentam a permeabilidade da barreira hemato-encefálica, facilitando a invasão de células de resposta imune e induzindo a liberação de moléculas potencialmente tóxicas que podem comprometer as células cerebrais (Lucas et al., 2006). Estudos sugerem uma relação entre neuroinflamação, estresse oxidativo, e erros inatos do metabolismo (Donida et al., 2017; Olsen et al., 2015; Ribeiro et al., 2013; Schweinberger and Wyse, 2016). Visto isso, o objetivo do primeiro capítulo foi avaliar o imunocontéudo da subunidade p65 de NF- $\kappa$ B, os níveis de citocinas pró-inflamatórias, os níveis de nitritos, o imunocontéudo de iNOS, bem como avaliar o imunocontéudo de Iba1 e GFAP em estriado de ratos de 21 e 60 dias de vida submetidos à administração intraestriatal de hipoxantina. Alguns parâmetros oxidativos, como geração de espécies reativas, atividades de enzimas antioxidantes e análise de dano ao DNA também foram avaliados.

Sabe-se que o NF- $\kappa$ B é ativado em consequência de sinalização inflamatória. O NF- $\kappa$ B situa-se no citoplasma ligado a proteínas inibidoras (I $\kappa$ B), dessa forma permanecendo inativado. A ativação induz a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B, seguida pela ativação transcricional de genes alvo específicos (Hoesel and Schmid, 2013). Esse fator de transcrição tem sido associado a vários mediadores inflamatórios tais como IL-6 (Son et al., 2008), TNF- $\alpha$  (Zhao et al., 2015) e iNOS (Arias-Salvatierra et al., 2011). Em nosso estudo, a administração de hipoxantina aumentou o imunocontéudo nuclear de NF- $\kappa$ B em estriado de ratos de 21 e 60 dias de vida.

As citocinas são moléculas envolvidas na transmissão de sinais entre as células durante o início de respostas imunes (Zhang and An, 2007). Nossos resultados mostram que a administração intraestriatal de hipoxantina provocou

um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 e TNF- $\alpha$ , em estriado de ratos de 21 dias de idade. Nos animais de 60 dias de vida há um aumento apenas de IL-6. Em acordo com nossos resultados, Gudbjörnsson e colaboradores demonstraram que a hipoxantina está relacionada à inflamação presente na artrite reumatoide, em que há maior metabolismo e difusão de purinas (Gudbjörnsson et al., 1991). Embora o mecanismo pelo qual a hipoxantina atua sobre a resposta inflamatória não está totalmente elucidado, nossos achados sugerem que o aumento nos níveis de citocinas pode estar estreitamente relacionado com a ativação do NF- $\kappa$ B.

O óxido nítrico (NO) é outro mediador importante para a resposta inflamatória. Os produtos da oxidação, nitritos e nitratos, são os principais metabólitos utilizados como indicadores da produção de NO (Lo Faro et al., 2014). O NO é produzido por conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). A óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é uma isoforma que é expressa através de citocinas, endotoxinas e outras vias inflamatórias (Habib and Ali, 2011). Para entender a influência da hipoxantina sobre a inflamação, também avaliamos os níveis de nitritos em ratos submetidos à administração de hipoxantina. Observamos que a hipoxantina diminui os níveis de nitritos no estriado de ratos de 21 dias de idade. Estudos mostram uma relação entre a formação de NO e a síntese de espécies reativas, como o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. O ânion superóxido também pode reagir com NO gerando peroxinitrito, uma substância citotóxica, sugerindo uma diminuição da biodisponibilidade de NO (Brown and Neher, 2010; El Assar et al., 2013).

Uma vez que a enzima iNOS é responsável por catalisar a formação de NO através de estímulos inflamatórios e a mesma está intimamente relacionada com a ativação de NF- $\kappa$ B, também analisamos seu imunoconteúdo. Os resultados revelam um aumento no imunoconteúdo de iNOS em estriado de ratos de 21 e 60 dias de vida submetidos à administração de hipoxantina. Estudos mostram que o aumento na expressão proteica de iNOS é um indicativo de neuroinflamação e neurodegeneração, e que parece estar relacionado também com a ativação microglial (Brown and Neher, 2010; Ribeiro et al., 2013).

Além disso, analisamos a ativação microglial e astrocitária através da medida do imunoconteúdo de Iba1 e GFAP, respectivamente. Sabe-se que a ativação microglial excessiva corrobora a doenças do SNC pela liberação de fatores citotóxicos que conduzem aos danos celulares (Magni et al., 2012; Xu et al., 2016). Nossos resultados mostram que a administração de hipoxantina aumentou o imunoconteúdo de Iba1 somente em ratos de 21 dias de idade. Não houve alteração de Iba1 em estriado de ratos de 60 dias de idade, isso pode ser explicado pela estreita relação entre TNF- $\alpha$  e a ativação microglial (Takeuchi et al., 2006).

Juntamente com a microglia, o astrócito contribui para a regulação da neuroinflamação, sendo também responsável pelo papel imune do SNC (Guizzetti et al., 2014). Perda de funções fisiológicas são consequências da ativação astrocitária, uma característica de diversos processos patológicos (Sofroniew, 2009). O aumento de proteínas de filamentos intermediários, particularmente a GFAP, caracteriza a ativação astrocitária, também conhecida como astrogliose (Pekny et al., 2014). No presente estudo, vimos que a

hipoxantina foi capaz de aumentar a imunorreatividade de GFAP em estriado de ratos de 21 dias, sugerindo uma astrogliose. Nenhuma alteração foi observada em ratos adultos jovens, talvez por diferença na fase de desenvolvimento neurológico, o que significa que os ratos de 21 dias de vida são mais suscetíveis a sofrer pela administração de hipoxantina e seus efeitos neuroinflamatórios.

Visto que um dos possíveis mecanismos de ativação de NF- $\kappa$ B é através de estresse oxidativo (Morgan and Liu, 2011) e que a hipoxantina pode ter um efeito oxidativo (Bavaresco et al., 2008), decidimos analisar alguns parâmetros oxidativos em ambas as idades de ratos. Nossos resultados mostraram um aumento na produção de espécies reativas observada pela oxidação de H<sub>2</sub>DCF e desregulação de enzimas antioxidante em estriado de ratos de 21 dias de idade, já visto no modelo de 60 dias (Bavaresco et al., 2008). Sabendo que espécies reativas de oxigênio podem atacar diretamente biomoléculas como o DNA (Kryston et al., 2011); em nosso estudo, observamos dano ao DNA, o que pode relacionar fortemente a hipoxantina com a geração de estresse oxidativo. Esse mecanismo poderia explicar, em parte, a alteração do perfil inflamatório causado pela hipoxantina.

No capítulo II, a fim de analisar o possível envolvimento neurenergético em alterações causadas pela hipoxantina, avaliamos algumas enzimas do metabolismo energético em estriado de ratos de 60 dias. Inicialmente, investigamos o efeito da administração de hipoxantina sobre a atividade de piruvato quinase (PK). PK é uma enzima glicolítica que catalisa a conversão irreversível de fosfoenolpiruvato em piruvato, sintetizando uma molécula de ATP (Liu and Vander Heiden, 2015). Vimos que a administração de hipoxantina



não alterou a atividade de PK em estriado de ratos de 60 dias. Ampliando nossa investigação para o ciclo de ácido tricarboxílico (TCA), avaliamos a atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH), uma enzima localizada na membrana mitocondrial interna, onde transfere elétrons diretamente para a cadeia transportadora de elétrons. Observamos um aumento significativo na atividade de SDH em estriado de ratos de 60 dias submetidos à administração de hipoxantina. Essa condição também foi observada em outros distúrbios como hiperprolinemia, sarcosinemia, doença de Huntington e doença de Alzheimer (Bubber et al., 2005; de Andrade et al., 2016; Ferreira et al., 2010; Naseri et al., 2016).

Em seguida investigamos o efeito da administração de hipoxantina sobre a atividade do complexo II mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons, que é um componente essencial da fosforilação oxidativa e é acoplado à síntese de ATP de ADP e Pi (Hoekstra and Bayley, 2013). Observamos que a administração intraestriatal de hipoxantina aumentou a atividade do complexo II. A regulação da atividade do complexo II não está totalmente compreendida, apesar do envolvimento desta enzima a diversas condições, emergindo recentemente como ponto de investigação importante na sinalização celular, biologia do câncer, imunologia, doenças cardiovasculares e neurodegeneração (Hoekstra and Bayley, 2013; Stepanova et al., 2016). Uma possível explicação para o aumento da atividade de SDH e complexo II poderia ser por vias anapleróticas, uma vez que a enzima PK não está alterada.

Considerando que a cadeia respiratória mitocondrial e a fosforilação oxidativa são cruciais para o metabolismo e função energética cerebral, analisamos ainda a atividade e o imunoconteúdo da enzima citocromo c

oxidase, uma enzima limitante da cadeia respiratória mitocondrial. A administração de hipoxantina diminuiu significativamente ambos parâmetros avaliados. Nossos achados são semelhantes aos encontrados em estudos pré-clínicos e clínicos que mostram um aumento na atividade da SDH, e diminuição da atividade da citocromo c oxidase em córtex cerebral de ratos expostos à hipóxia crônica (Caceda et al., 2001) e no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer (Bubber et al., 2005). Ademais, o aumento das atividades de SDH e complexo II e a inibição da atividade da citocromo c oxidase podem, potencialmente, levar à redução incompleta do oxigênio e conseqüentemente aumentar a formação de radicais livres, além de reduzir a síntese de ATP (Li et al., 2006; Stowe and Camara, 2009). Visto isso, no presente estudo, avaliamos os níveis de ATP e pudemos observar que a administração de hipoxantina foi capaz de diminuir os níveis de ATP intracelular.

A regulação da relação espacial intracelular entre ATP produzido e ATP consumido é um processo fundamental para a função celular. A enzima creatina quinase (CK) faz parte de um importante sistema de fosfotransferência em células com alta demanda energética. A CK é responsável pela realocização do grupo ATP fosforil de onde é produzido (principalmente nas mitocôndrias) até onde é consumido (principalmente no citosol) (Wallimann et al., 2011). No nosso trabalho, a administração de hipoxantina diminuiu as atividades das isoformas citosólica e mitocondrial da CK. Nossos achados são um indicativo da ação oxidativa da hipoxantina, possivelmente agindo através da diminuição grupos tióis presentes nas enzimas, necessários para o funcionamento normal das mesmas.

A disfunção mitocondrial pode afetar o metabolismo através do aumento da formação de radicais livres, dessa maneira contribuindo para o estresse oxidativo e indução de apoptose (Olsen et al., 2015). Estudos sugerem que anormalidades mitocondriais estão envolvidas não só com o envelhecimento, doenças neurodegenerativas e câncer (Jain et al., 2016; Reddy and Reddy, 2011), mas também com erros inatos do metabolismo (Ferreira et al., 2010; Kolling et al., 2012; Seminotti et al., 2016). Para melhor compreender o efeito da hipoxantina sobre a função mitocondrial analisamos massa mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ), vistos pela marcação com MitoTracker Green e MitoTracker Red respectivamente. A administração de hipoxantina diminuiu a porcentagem de células marcadas com MitoTracker Green (MTG) e aumentou a marcação com MitoTracker Red (MTR) quando comparada com os grupos controles. O potencial da membrana mitocondrial é considerado um indicador da função mitocondrial (Distelmaier et al., 2008), e o aumento visto pela administração de hipoxantina está de acordo com o aumento das atividades de SDH e complexo II visto no mesmo modelo. Contudo modificações nesses parâmetros indicam uma disfunção mitocondrial (Iijima et al., 2006).

Considerando que disfunções mitocondriais podem iniciar vias de sinalização de apoptose intrínseca/extrínseca e necrose (Gottlieb and Carreira, 2010), analisamos o efeito da hipoxantina sobre células estriatais através da marcação com anexina V e iodeto de propídeo (PI). A administração de hipoxantina diminuiu o número de células vivas, consequentemente aumentando os eventos apoptóticos no estriado. O número de células necróticas não foi alterado em estriado de ratos de 60 dias de idade. A possível

alteração no estado redox celular, causada pela hipoxantina, pode colaborar para a apoptose, uma vez que as espécies reativas produzidas pelas mitocôndrias estão envolvidas no dano celular (Delmas et al., 2011),

No capítulo III, analisamos alterações energéticas, bem como a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em estriado de ratos de 21 dias submetidos à administração intraestriatal de hipoxantina. Em condições normais, a necessidade energética cerebral é atingida quase que exclusivamente pela metabolização da glicose. O piruvato, sintetizado pela piruvato quinase, é o produto final da glicólise, que é convertido em acetil CoA entrando no ciclo do TCA quando há oxigênio suficiente disponível (Liu and Vander Heiden, 2015). A administração de hipoxantina diminuiu a atividade da piruvato quinase em estriado de ratos de 21 dias de vida. A deficiência na utilização de glicose no SNC tem sido proposta como uma possível base patofisiológica de desordens cerebrais (Mergenthaler et al., 2013).

Quanto ao ciclo de TCA, medimos a atividade da succinato desidrogenase. Os resultados mostram um aumento significativo na atividade da succinato desidrogenase em estriado de ratos de 21 dias sujeitos à administração de hipoxantina. Essa condição pode ocorrer como resposta compensatória, através de reações anapleróticas (Owen et al., 2002). O aumento da atividade da succinato desidrogenase está também presente em outras patologias, como a doença de Huntington, a doença de Alzheimer, e também em erros inatos do metabolismo como hiperprolinemia e sarcosinemia (de Andrade et al., 2016; Ferreira et al., 2010; Naseri et al., 2016).

Observamos também que a administração de hipoxantina provocou um aumento na atividade do complexo II em estriado de ratos de 21 dias de vida.

Essa enzima mitocondrial da cadeia respiratória está diretamente envolvida no ciclo TCA. O complexo II fornece elétrons para o complexo III catalisando a oxidação do succinato a fumarato (Hoekstra and Bayley, 2013). Em seguida analisamos a atividade e imunoconteúdo da enzima citocromo c oxidase, uma vez que a rede enzimática de transferência de elétrons é vital para o metabolismo e função da energia cerebral (Srinivasan and Avadhani, 2012). Os resultados mostram que a administração de hipoxantina não alterou significativamente a atividade e o imunoconteúdo da enzima citocromo c oxidase. Contudo, o aumento das atividades da succinato desidrogenase e do complexo II e a inalteração da atividade da citocromo c oxidase podem levar a uma redução incompleta de oxigênio aumentando, dessa forma, a geração de radicais livres como discutido anteriormente (Stowe and Camara, 2009). Embora os radicais livres possam ter origem em várias fontes nas células, mais de 90% das espécies reativas de oxigênio são produzidas dentro da mitocôndria. Essas espécies podem ser originadas pela redução incompleta de oxigênio ou por vazamento de elétrons da cadeia transportadora de elétrons (Halliwell, 2012; Olsen et al., 2015). Além disso, estudos prévios de nosso grupo já associaram a administração de hipoxantina à produção de espécies reativas e estresse oxidativo (Bavaresco et al., 2008; Biasibetti et al., 2016).

Uma vez que os níveis de ATP são essenciais para a atividade neuronal fisiológica, avaliamos o produto energético final da fosforilação oxidativa (Owen and Sunram-Lea, 2011), determinando os níveis intracelulares de ATP. A administração de hipoxantina não alterou os níveis de ATP em estriado de ratos de 21 dias, quando comparados com o grupo controle. Avaliando o efeito da administração de hipoxantina sobre a atividade da enzima creatina quinase,

observamos uma diminuição na atividade de ambas isoformas, citosólica e mitocondrial em estriado de ratos de 21 dias de idade.

A fim de analisar o impacto da alteração de algumas enzimas do metabolismo energético causado pela ação da hipoxantina, investigamos também a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Essa enzima é crucial para a excitabilidade neuronal, uma vez que é responsável pela geração do potencial de membrana, consumindo nesse processo aproximadamente 50% do ATP gerado no SNC (Kaplan, 2002; Mobasher et al., 2000). No presente trabalho observamos que a administração de hipoxantina reduziu a atividade dessa enzima. Os resultados confirmam o mesmo efeito de estudos anteriores que mostram que a injeção intraestriatal de hipoxantina reduz a atividade  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em estriado de ratos de 60 dias de vida (Bavaresco et al., 2007b).  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é uma enzima de membrana altamente suscetível ao insulto por espécies reativas e a diminuição de sua atividade tem sido associada à excitotoxicidade e dano neuronal (Arnaiz and Ordieres, 2014; Srikanthan et al., 2016). Avaliamos também o imunoconteúdo das subunidades catalíticas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase para melhor compreender os mecanismos envolvidos na diminuição da atividade enzimática em estriado de ratos de 21 dias de idade. Contudo, a administração de hipoxantina não alterou o imunoconteúdo das subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase quando comparado ao grupo controle.

Visto que a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é uma enzima transmembrana e vulnerável ao estresse oxidativo, também avaliamos a peroxidação lipídica pela técnica de TBARS e o dano proteico pelo teor de tióis para melhor elucidar o efeito da hipoxantina sobre a diminuição da atividade de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Devido ao alto

conteúdo lipídico e maior taxa de utilização de oxigênio o cérebro possui grande susceptibilidade à peroxidação lipídica e formação de radicais livres. A peroxidação lipídica pode causar alterações significativas na permeabilidade, fluidez e integridade das biomembranas, resultando em alteração na sinalização celular (Halliwell, 2011). Além disso, esse processo parece estar relacionado a vários distúrbios neuropsiquiátricos, por exemplo, transtorno bipolar e esquizofrenia (Romano et al., 2017). No entanto, observamos que a administração intraestriatal de hipoxantina não teve alteração sobre a peroxidação lipídica, o que pode sugerir que modificações na membrana lipídica não estão envolvidas na inibição da atividade  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pela hipoxantina.

Considerando que algumas enzimas envolvidas no metabolismo energético apresentam grupos tióis em suas estruturas e que a perda desses grupos é um dos principais alvos do dano oxidativo (Rahal et al., 2014), também analisamos o conteúdo de grupos tióis em estrado de ratos de 21 dias de vida. Neste estudo, a injeção intraestriatal de hipoxantina diminuiu o conteúdo de grupamentos tióis de proteínas. Portanto, o estresse oxidativo provocado pela hipoxantina pode induzir diminuição desses grupos, possivelmente pela formação de pontes dissulfeto, modificando a estrutura secundária da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, responsável pela inibição enzimática.

Em resumo, os presentes resultados esclarecem alguns mecanismos de neurotoxicidade induzida pela hipoxantina em estriado de ratos de 21 e 60 dias de idade. A administração intraestriatal de hipoxantina aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias, o imunocconteúdo de NF- $\kappa$ B nuclear e iNOS, diminuiu os níveis de nitrito, bem como ativou microglia e astrócitos. Além

disso, a administração intraestriatal de hipoxantina causou comprometimento neuroenergético resultando em depleção de ATP, disfunção mitocondrial e apoptose em estriado de ratos de 60 dias. Em ratos de 21 dias, a administração intraestriatal de hipoxantina também provocou desequilíbrio neuroenergético além de reduzir a atividade de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, via dano a proteínas por influência do estresse oxidativo causado pela hipoxantina. Estes estudos sugerem alguns mecanismos de toxicidade da hipoxantina sobre parâmetros inflamatórios, neuroenergéticos e oxidativos, sugerindo que esses processos podem estar envolvidos, pelo menos em parte, com distúrbios encontrados em pacientes com a doença de Lesch-Nyhan.



## 5. CONCLUSÕES

A administração intraestriatal de hipoxantina em ratos:

- Modificou o perfil inflamatório, visto pela alteração no imunocontéudo de NF- $\kappa$ B, níveis de citocinas (IL-6 e TNF- $\alpha$ ), bem como o imunocontéudo de iNOS e níveis de nitritos;

- Provocou ativação microglial e astrocitária através do imunocontéudo de Iba1 e GFAP, respectivamente;

- Alterou parâmetros de estresse oxidativo, como: níveis de espécies reativas e atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) causando dano ao DNA;

- Modificou a bioenergética estriatal visto pela alteração na atividade de enzimas da fosforilação oxidativa, níveis de ATP, bem como a regulação de creatina quinase citosólica e mitocondrial em estriado de ratos de 60 dias;

- Alterou a funcionalidade mitocondrial visto pela massa e o potencial mitocondrial, além de causar morte celular em estriado de ratos de 60 dias;

- Modificou a bioenergética estriatal visto pela alteração na atividade da piruvato quinase e enzimas da fosforilação oxidativa, bem como na regulação de creatina quinase citosólica e mitocondrial em estriado de ratos de 21 dias;

- Diminuiu a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e o conteúdo de grupos tióis em estriado de ratos de 21 dias;

## **6. PERSPECTIVAS**

A fim de melhor compreender os mecanismos pelos quais a hipoxantina pode estar relacionada com alterações patológicas e melhor mimetizar com as condições apresentadas pela doença, temos como perspectivas:

- Desenvolver um modelo de administração crônica de hipoxantina em ratos Wistar;

- Investigar os efeitos do modelo sobre parâmetros comportamentais cognitivos e motores através das tarefas de campo aberto, reconhecimento de objetos, teste da trave, teste da escada e teste do cilindro;

- Verificar o efeito da administração crônica intraestriatal de hipoxantina sobre a histologia estriatal, analisando GFAP, NeuN e Tirosina hidroxilase, bem como o imunoconteúdo dos mesmos;

- Investigar parâmetros de viabilidade celular por citometria de fluxo através de marcação com Anexina-PI e cascatas de sinalização de sobrevivência e morte celular em estriado de ratos submetidos ao modelo;

- Avaliar o efeito da administração crônica intraestriatal de hipoxantina sobre a função mitocondrial, como: massa mitocondrial e potencial de membrana, MitoTracker Green e MitoTracker Red, respectivamente, bem como a atividade dos complexos da cadeia respiratória e os níveis de ATP intracelular em estriado de ratos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., Baker, D.L., 2010. CYTOKINES, in: Cellular and Molecular Immunology. Elsevier, pp. 267–301. doi:10.1016/B978-1-4160-3123-9.50020-6
- Abreu, I.A., Cabelli, D.E., 2010. Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804, 263–274. doi:10.1016/j.bbapap.2009.11.005
- Arias-Salvatierra, D., Silbergeld, E.K., Acosta-Saavedra, L.C., Calderon-Aranda, E.S., 2011. Role of nitric oxide produced by iNOS through NF- $\kappa$ B pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by Lipopolysaccharide. *Cell. Signal.* 23, 425–435. doi:10.1016/j.cellsig.2010.10.017
- Arnaiz, G.R. de L., Ordieres, M.G.L., 2014. Brain Na(+), K(+)-ATPase Activity In Aging and Disease. *Int. J. Biomed. Sci.* 10, 85–102.
- Banerjee, U., Dasgupta, A., Rout, J.K., Singh, O.P., 2012. Effects of lithium therapy on Na+–K+–ATPase activity and lipid peroxidation in bipolar disorder. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 37, 56–61. doi:10.1016/j.pnpbp.2011.12.006
- Bavaresco, C.S., Chiarani, F., Kolling, J., Netto, C.A., de Souza Wyse, A.T., 2008. Biochemical effects of pretreatment with vitamins E and C in rats submitted to intrastriatal hypoxanthine administration. *Neurochem. Int.* 52, 1276–1283. doi:10.1016/j.neuint.2008.01.008
- Bavaresco, C.S., Chiarani, F., Kolling, J., Ramos, D.B., Cognato, G.P., Bonan, C.D., Bogo, M.R., Sarkis, J.J.F., Netto, C.A., Wyse, A.T.S., 2008. Intrastriatal injection of hypoxanthine alters striatal ectonucleotidase activities: A time-dependent effect. *Brain Res.* 1239, 198–206. doi:10.1016/j.brainres.2008.08.015
- Bavaresco, C.S., Chiarani, F., Wannmacher, C.M.D., Netto, C.A., Wyse, A.T. de S., 2007a. Intrastriatal Hypoxanthine Reduces Na+,K+-ATPase Activity and Induces Oxidative Stress in the Rats. *Metab. Brain Dis.* 22, 1–11. doi:10.1007/s11011-006-9037-y
- Bavaresco, C.S., Chiarani, F., Wannmacher, C.M.D., Netto, C.A., Wyse, A.T.S. De, 2007b. Intrastriatal hypoxanthine reduces Na+,K+-ATPase activity and induces oxidative stress in the rats. *Metab. Brain Dis.* 22, 1–11. doi:10.1007/s11011-006-9037-y
- Beal, M.F., 2008. Mitochondria and Neurodegeneration, in: *Mitochondrial Biology: New Perspectives.* pp. 183–192. doi:10.1002/9780470725207.ch13
- Benarroch, E.E., 2011. Na+, K+-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology* 76, 287–93. doi:10.1212/WNL.0b013e3182074c2f
- Biasibetti, H., Pierozan, P., Rodrigues, A.F., Manfredini, V., Wyse, A.T.S., 2016. Hypoxanthine Intrastriatal Administration Alters Neuroinflammatory Profile and Redox Status in Striatum of Infant and Young Adult Rats. *Mol. Neurobiol.* 1–11. doi:10.1007/s12035-016-9866-6
- Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., Jackson-Lewis, V.R., 2015.

- Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front. Neuroanat.* 9, 1–16. doi:10.3389/fnana.2015.00091
- Bøttger, P., Tracz, Z., Heuck, A., Nissen, P., Romero-Ramos, M., Lykke-Hartmann, K., 2011. Distribution of Na/K-ATPase alpha 3 isoform, a sodium-potassium P-type pump associated with rapid-onset of dystonia parkinsonism (RDP) in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 519, 376–404. doi:10.1002/cne.22524
- Brown, G.C., Neher, J.J., 2010. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol. Neurobiol.* 41, 242–247. doi:10.1007/s12035-010-8105-9
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J.P., Gibson, G.E., 2005. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: Mechanistic implications. *Ann. Neurol.* 57, 695–703. doi:10.1002/ana.20474
- Caceda, R., Gamboa, J.L., Boero, J.A., Monge, C.C., Arregui, A., 2001. Energetic metabolism in mouse cerebral cortex during chronic hypoxia. *Neurosci Lett* 301, 171–174. doi:S0304394001016305 [pii]
- Cauwels, R.G.E.C., Martens, L.C., 2005. Self-mutilation behaviour in Lesch-Nyhan syndrome. *J. Oral Pathol. Med.* 34, 573–575. doi:10.1111/j.1600-0714.2005.00330.x
- Das Sarma, J., 2014. Microglia-mediated neuroinflammation is an amplifier of virus-induced neuropathology. *J. Neurovirol.* 20, 122–136. doi:10.1007/s13365-013-0188-4
- Dasuri, K., Zhang, L., Keller, J.N., 2013. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 170–185. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.016
- de Andrade, R.B., Gemelli, T., Rojas, D.B., Kim, T.D.H., Zanatta, Â., Schmitz, F., Rodrigues, A.F., Wyse, A.T.S., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., Wannmacher, C.M.D., 2016. Evaluation of Oxidative Stress Parameters and Energy Metabolism in Cerebral Cortex of Rats Subjected to Sarcosine Administration. *Mol. Neurobiol.* 1–11. doi:10.1007/s12035-016-9984-1
- Delmas, D., Solary, E., Latruffe, N., 2011. Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Curr. Med. Chem.* 18, 1100–1121. doi:BSP/CMC/E-Pub/2011/066 [pii]
- Distelmaier, F., Koopman, W.J.H., Testa, E.R., de Jong, A.S., Swarts, H.G., Mayatepek, E., Smeitink, J.A.M., Willems, P.H.G.M., 2008. Life cell quantification of mitochondrial membrane potential at the single organelle level. *Cytom. Part A* 73A, 129–138. doi:10.1002/cyto.a.20503
- Donida, B., Jacques, C.E.D., Mescka, C.P., Rodrigues, D.G.B., Marchetti, D.P., Ribas, G., Giugliani, R., Vargas, C.R., 2017. Oxidative damage and redox in Lysosomal Storage Disorders: Biochemical markers. *Clin. Chim. Acta* 466, 46–53. doi:10.1016/j.cca.2017.01.007
- El Assar, M., Angulo, J., Rodríguez-Mañas, L., 2013. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 380–401. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.003
- Elease, S.H., Lucas, R.E., 2002. The Mousetrap: What We Can Learn When the Mouse Model Does Not Mimic the Human Disease. *ILAR J.* 43, 66–79. doi:10.1093/ilar.43.2.66
- Ferreira, A.G.K., Lima, D.D., Delwing, D., MacKedanz, V., Tagliari, B., Kolling, J., Schuck, P.F., Wajner, M., Wyse, A.T.S., 2010. Proline impairs energy

- metabolism in cerebral cortex of young rats. *Metab. Brain Dis.* 25, 161–168. doi:10.1007/s11011-010-9193-y
- Ferreira, A.G.K., Stefanello, F.M., Cunha, A. a, da Cunha, M.J., Pereira, T.C.B., Bonan, C.D., Bogo, M.R., Netto, C. a, Wyse, A.T.S., 2011. Role of antioxidants on Na(+),K (+)-ATPase activity and gene expression in cerebral cortex of hyperprolinemic rats. *Metab. Brain Dis.* 26, 141–7. doi:10.1007/s11011-011-9243-0
- Geering, K., 2008. Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 17, 526–532. doi:10.1097/MNH.0b013e3283036cbf
- Gendelman, H.E., 2002. Neural immunity: Friend or foe? *J Neurovirol* 8, 474–479. doi:10.1080/13550280290168631
- Gibson, G.E., Starkov, A., Blass, J.P., Ratan, R.R., Beal, M.F., 2010. Cause and consequence: Mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1802, 122–134. doi:10.1016/j.bbadis.2009.08.010
- Gil-Mohapel, J., Brocardo, P., Christie, B., 2014. The Role of Oxidative Stress in Huntington's Disease: Are Antioxidants Good Therapeutic Candidates? *Curr. Drug Targets* 15, 454–468. doi:10.2174/1389450115666140115113734
- Goldstein, I., Levy, T., Galili, D., Ovadia, H., Yirmiya, R., Rosen, H., Lichtstein, D., 2006. Involvement of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and Endogenous Digitalis-Like Compounds in Depressive Disorders. *Biol. Psychiatry* 60, 491–499. doi:10.1016/j.biopsych.2005.12.021
- Göttle, M., Prudente, C.N., Fu, R., Sutcliffe, D., Pang, H., Cooper, D., Veledar, E., Glass, J.D., Gearing, M., Visser, J.E., Jinnah, H.A., 2014. Loss of dopamine phenotype among midbrain neurons in Lesch-Nyhan disease. *Ann. Neurol.* 76, 95–107. doi:10.1002/ana.24191
- Gottlieb, R.A., Carreira, R.S., 2010. Autophagy in health and disease. 5. Mitophagy as a way of life. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 299, 203–210. doi:10.1152/ajpcell.00097.2010
- Gudbjörnsson, B., Zak, A., Niklasson, F., Hällgren, R., 1991. Hypoxanthine, xanthine, and urate in synovial fluid from patients with inflammatory arthritides. *Ann. Rheum. Dis.* 50, 669–672.
- Guizzetti, M., Zhang, X., Goeke, C., Gavin, D.P., 2014. Glia and neurodevelopment: focus on fetal alcohol spectrum disorders. *Front. Pediatr.* 2, 123–135. doi:10.3389/fped.2014.00123
- Habib, S., Ali, A., 2011. Biochemistry of Nitric Oxide. *Indian J. Clin. Biochem.* 26, 3–17. doi:10.1007/s12291-011-0108-4
- Halliwell, B., 2012. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr. Rev.* 70, 257–265. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x
- Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 125–130. doi:10.1016/j.tips.2010.12.002
- Hamamy, H., 2012. Consanguineous marriages. *J. Community Genet.* 3, 185–192. doi:10.1007/s12687-011-0072-y
- Harkness, R. a., McCreanor, G.M., Watts, R.W.E., 1988. Lesch-Nyhan syndrome and its pathogenesis: Purine concentrations in plasma and urine with metabolite profiles in CSF. *J. Inherit. Metab. Dis.* 11, 239–252. doi:10.1007/BF01800365
- Hatou, S., 2011. Hormonal Regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Dependent ATPase Activity

- and Pump Function in Corneal Endothelial Cells. *Cornea* 30, S60–S66. doi:10.1097/ICO.0b013e318227faab
- Henderson, J.F., Lowe, J.K., Barankiewicz, J., 2008. Purine and Pyrimidine Metabolism: Pathways, Pitfalls and Perturbations, in: *Purine and Pyrimidine Metabolism*. pp. 3–21. doi:10.1002/9780470720301.ch2
- Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J. El, Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., Herrup, K., Frautschy, S.A., Finsen, B., Brown, G.C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G.C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M.L., Perry, V.H., Holmes, C., Bazan, N.G., Brooks, D.J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C.A., Breitner, J.C., Cole, G.M., Golenbock, D.T., Kummer, M.P., 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 14, 388–405. doi:10.1016/S1474-4422(15)70016-5
- Hoekstra, A.S., Bayley, J.P., 2013. The role of complex II in disease. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1827, 543–551. doi:10.1016/j.bbabi.2012.11.005
- Hoesel, B., Schmid, J. a, 2013. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* 12, 1–15. doi:10.1186/1476-4598-12-86
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, a, Hunter, S., Monk, M., 1987. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326, 292–295. doi:10.1038/326292a0
- Iijima, T., Mishima, T., Akagawa, K., Iwao, Y., 2006. Neuroprotective effect of propofol on necrosis and apoptosis following oxygen-glucose deprivation-relationship between mitochondrial membrane potential and mode of death. *Brain Res.* 1099, 25–32. doi:10.1016/j.brainres.2006.04.117
- Jain, I.H., Zazzeron, L., Goli, R., Alexa, K., Schatzman-Bone, S., Dhillon, H., Goldberger, O., Peng, J., Shalem, O., Sanjana, N.E., Zhang, F., Goessling, W., Zapol, W.M., Mootha, V.K., 2016. Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science* (80-. ). 352, 54–61. doi:doi:10.1126/science.aad9642
- Jinnah, H.A., 2009. Lesch-Nyhan disease: from mechanism to model and back again. *Dis. Model. Mech.* 2, 116–21. doi:10.1242/dmm.002543
- Jinnah, H.A., Gage, F.H., Friedmann, T., 1990. Animal models of Lesch-Nyhan syndrome. *Brain Res. Bull.* 25, 467–75.
- Jinnah, H.A., Harris, J.C., Nyhan, W.L., O'Neill, J.P., 2004. The Spectrum of Mutations Causing HPRT Deficiency: An Update. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 23, 1153–1160. doi:10.1081/NCN-200027400
- Jinnah, H.A., Sabina, R.L., Van Den Berghe, G., 2013. Metabolic disorders of purine metabolism affecting the nervous system. *Handb. Clin. Neurol.* 113, 1827–1836. doi:10.1016/B978-0-444-59565-2.00052-6
- Jinnah, H., Friedmann, T., 2001. Lesch-Nyhan Disease and Its Variants, in: *Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W., Valle, D. (Eds.), The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Mc Graw-Hill, New York, pp. 2537–2569. doi:10.1036/ommbid.135
- Kaplan, J.H., 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 511–535. doi:10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218
- Kasper, D.C., Ratschmann, R., Metz, T.F., Mechtler, T.P., Möslinger, D., Konstantopoulou, V., Item, C.B., Pollak, A., Herkner, K.R., 2010. The

- National Austrian Newborn Screening Program - Eight years experience with mass spectrometry. Past, present, and future goals. *Wien. Klin. Wochenschr.* 122, 607–613. doi:10.1007/s00508-010-1457-3
- Kelley, R.E., Andersson, H.C., 2014. Disorders of purines and pyrimidines. *Handb. Clin. Neurol.* 120, 827–38. doi:10.1016/B978-0-7020-4087-0.00055-3
- Kolling, J., Scherer, E.B.S., Siebert, C., Hansen, F., Torres, F. V., Scaini, G., Ferreira, G., de Andrade, R.B., Gonçalves, C.A.S., Streck, E.L., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S., 2012. Homocysteine induces energy imbalance in rat skeletal muscle: Is creatine a protector? *Cell Biochem. Funct.* 31, 575–584. doi:10.1002/cbf.2938
- Kolling, J., Scherer, E.B.S., Siebert, C., Longoni, A., Loureiro, S., Weis, S., Petenuzzo, L., Wyse, A.T.S., 2016. Severe Hyperhomocysteinemia Decreases Respiratory Enzyme and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase Activities, and Leads to Mitochondrial Alterations in Rat Amygdala. *Neurotox. Res.* 29, 408–418. doi:10.1007/s12640-015-9587-z
- Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 333–343. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G., 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* 711, 193–201. doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.12.016
- Kuehn, M.R., Bradley, a, Robertson, E.J., Evans, M.J., 1987. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* 326, 295–298. doi:10.1038/326295a0
- Lesch, M., Nyhan, W.L., 1964. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am. J. Med.* 36, 561–570.
- Li, Y., Park, J.-S., Deng, J.-H., Bai, Y., 2006. Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* 38, 283–91. doi:10.1007/s10863-006-9052-z
- Liu, C.-C., Garcia, A., Mahmmoud, Y.A., Hamilton, E.J., Galougahi, K.K., Fry, N.A.S., Figtree, G.A., Cornelius, F., Clarke, R.J., Rasmussen, H.H., 2012. Susceptibility of 1 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> Pump Subunit to Glutathionylation and Oxidative Inhibition Depends on Conformational State of Pump. *J. Biol. Chem.* 287, 12353–12364. doi:10.1074/jbc.M112.340893
- Liu, V.M., Vander Heiden, M.G., 2015. The Role of Pyruvate Kinase M2 in Cancer Metabolism. *Brain Pathol.* 25, 781–783. doi:10.1111/bpa.12311
- Lo Faro, M.L., Fox, B., Whatmore, J.L., Winyard, P.G., Whiteman, M., 2014. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide* 41, 38–47. doi:10.1016/j.niox.2014.05.014
- Lucas, S.-M., Rothwell, N.J., Gibson, R.M., 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl, S232-240. doi:10.1038/sj.bjp.0706400
- Magni, P., Ruscica, M., Dozio, E., Rizzi, E., Beretta, G., Maffei Facino, R., 2012. Parthenolide inhibits the LPS-induced secretion of IL-6 and TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B nuclear translocation in BV-2 microglia. *Phytother. Res.* 26, 1405–1409. doi:10.1002/ptr.3732
- Mak, C.M., Lee, H.-C.H., Chan, A.Y.-W., Lam, C.-W., 2013. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 50, 142–162. doi:10.3109/10408363.2013.847896

- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F.K., Margis-Pinheiro, M., 2008. Glutathione peroxidase family - An evolutionary overview. *FEBS J.* 275, 3959–3970. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x
- Marquezan, B.P., Funck, V.R., Oliveira, C. V., Pereira, L.M., Araújo, S.M., Zarzecki, M.S., Royes, L.F.F., Furian, A.F., Oliveira, M.S., 2013. Pentylentetrazol-induced seizures are associated with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity decrease and alpha subunit phosphorylation state in the mice cerebral cortex. *Epilepsy Res.* 105, 396–400. doi:10.1016/j.eplepsyres.2013.03.007
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., Meisel, A., 2013. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 36, 587–597. doi:10.1016/j.tins.2013.07.001
- Mobasher, A., Avila, J., Cózar-Castellano, I., Brownleader, M.D., Trevan, M., Francis, M.J.O., Lamb, J.F., Martín-Vasallo, P., 2000. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase isozyme diversity; Comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci. Rep.* 20, 51–91. doi:10.1023/A:1005580332144
- Morgan, M.J., Liu, Z., 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res.* 21, 103–115. doi:10.1038/cr.2010.178
- Naseri, N.N., Bonica, J., Xu, H., Park, L.C., Arjomand, J., Chen, Z., Gibson, G.E., 2016. Novel Metabolic Abnormalities in the Tricarboxylic Acid Cycle in Peripheral Cells From Huntington's Disease Patients. *PLoS One* 11, 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0160384
- Navarro, A., Boveris, A., 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, 670–686. doi:10.1152/ajpcell.00213.2006
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry* 6th ed., Book. doi:10.1016/j.jse.2011.03.016
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2008. *LEHNINGER PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY*, W. H. Freeman and Company. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Nyhan, W.L., 2008. Lesch-Nyhan disease. *Nucleosides Nucleic Acids* 27, 559–63. doi:10.1080/15257770802135745
- Nyhan, W.L., 1978. Ataxia and disorders of purine metabolism: defects in hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase and clinical ataxia. *Adv. Neurol.* 21, 279–287.
- Nyhan, W.L., O'Neill, J.P., Jinnah, H.A., Harris, J.C., 2014. Lesch-Nyhan Syndrome, GeneReviews(®). University of Washington, Seattle.
- Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F., Toyoshima, C., 2009. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13742–13747. doi:10.1073/pnas.0907054106
- Olsen, R.K.J., Cornelius, N., Gregersen, N., 2015. Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38, 703–719. doi:10.1007/s10545-015-9861-5
- Owen, L., Sunram-Lea, S.I., 2011. Metabolic agents that enhance ATP can improve cognitive functioning: A review of the evidence for glucose, oxygen, pyruvate, creatine, and L-carnitine. *Nutrients* 3, 735–755. doi:10.3390/nu3080735
- Owen, O.E., Kalhan, S.C., Hanson, R.W., 2002. The key role of anaplerosis and



- cataplerosis for citric acid cycle function. *J. Biol. Chem.* 277, 30409–30412. doi:10.1074/jbc.R200006200
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., Pekna, M., 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci. Lett.* 565, 30–38. doi:10.1016/j.neulet.2013.12.071
- Poulsen, H., Morth, P., Egebjerg, J., Nissen, P., 2010. Phosphorylation of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and the H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *FEBS Lett.* 584, 2589–2595. doi:10.1016/j.febslet.2010.04.035
- Puig, J.G., Jimenez, M.L., Mateos, F.A., Fox, I.H., 1989. Adenine nucleotide turnover in hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase deficiency: evidence for an increased contribution of purine biosynthesis de novo. *Metabolism.* 38, 410–418.
- Raghuveer, T.S., Garg, U., Graf, W.D., 2006. Inborn errors of metabolism in infancy and early childhood: An update. *Am. Fam. Physician* 73, 1981–1990.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–19. doi:10.1155/2014/761264
- Reddy, P.H., Reddy, T.P., 2011. Mitochondria as a therapeutic target for aging and neurodegenerative diseases. *Curr. Alzheimer Res.* 8, 393–409. doi:10.2174/156720511795745401
- Ribeiro, B.M.M., do Carmo, M.R.S., Freire, R.S., Rocha, N.F.M., Borella, V.C.M., de Menezes, A.T., Monte, A.S., Gomes, P.X.L., de Sousa, F.C.F., Vale, M.L., de Lucena, D.F., Gama, C.S., Macêdo, D., 2013. Evidences for a progressive microglial activation and increase in iNOS expression in rats submitted to a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine. *Schizophr. Res.* 151, 12–19. doi:10.1016/j.schres.2013.10.040
- Ribeiro, L.R., Della-Pace, I.D., de Oliveira Ferreira, A.P., Funck, V.R., Pinton, S., Bobinski, F., de Oliveira, C.V., da Silva Fiorin, F., Duarte, M.M.M.F., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Nogueira, C.W., dos Santos, A.R.S., Royes, L.F.F., Figuera, M.R., 2013. Chronic administration of methylmalonate on young rats alters neuroinflammatory markers and spatial memory. *Immunobiology* 218, 1175–1183. doi:10.1016/j.imbio.2013.04.008
- Romano, A., Serviddio, G., Calcagnini, S., Villani, R., Giudetti, A.M., Cassano, T., Gaetani, S., 2017. Linking lipid peroxidation and neuropsychiatric disorders: focus on 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic. Biol. Med.* [Epub ahead of print]. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.046
- Rosemeyer, H., 2004. The chemodiversity of purine as a constituent of natural products. *Chem. Biodivers.* 1, 361–401. doi:10.1002/cbdv.200490033
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* 24, 453–462. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034
- Schretlen, D.J., Varvaris, M., Vannorsdall, T.D., Gordon, B., Harris, J.C., Jinnah, H.A., 2015. Brain white matter volume abnormalities in Lesch-Nyhan disease and its variants. *Neurology* 84, 190–196. doi:10.1212/WNL.0000000000001128
- Schretlen, D.J., Ward, J., Meyer, S.M., Yun, J., Puig, J.G., Nyhan, W.L., Jinnah, H. a, Harris, J.C., 2005. Behavioral aspects of Lesch-Nyhan disease and its variants. *Dev. Med. Child Neurol.* 47, 673–677. doi:10.1017/S0012162205001374
- Schurr, A., 2002. Energy metabolism, stress hormones and neural recovery

- from cerebral ischemia/hypoxia. *Neurochem. Int.* 41, 1–8. doi:10.1016/S0197-0186(01)00142-5
- Schweinberger, B.M., Wyse, A.T.S., 2016. Mechanistic basis of hypermethioninemia. *Amino Acids* 1–11. doi:10.1007/s00726-016-2302-4
- Scriver, C.R., 2008. Garrod's croonian lectures (1908) and the charter "inborn errors of metabolism": Albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008. *J. Inherit. Metab. Dis.* doi:10.1007/s10545-008-0984-9
- Seminotti, B., Amaral, A.U., Ribeiro, R.T., Rodrigues, M.D.N., Colín-González, A.L., Leipnitz, G., Santamaría, A., Wajner, M., 2016. Oxidative Stress, Disrupted Energy Metabolism, and Altered Signaling Pathways in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Knockout Mice: Potential Implications of Quinolinic Acid Toxicity in the Neuropathology of Glutaric Acidemia Type I. *Mol. Neurobiol.* 53, 6459–6475. doi:10.1007/s12035-015-9548-9
- Sofroniew, M. V., 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647. doi:10.1016/j.tins.2009.08.002
- Son, Y.-H., Jeong, Y.-T., Lee, K.-A., Choi, K.-H., Kim, S.-M., Rhim, B.-Y., Kim, K., 2008. Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 51, 71–77. doi:10.1097/FJC.0b013e31815bd23d
- Srikanthan, K., Shapiro, J., Sodhi, K., 2016. The Role of Na/K-ATPase Signaling in Oxidative Stress Related to Obesity and Cardiovascular Disease. *Molecules* 21, 1–13. doi:10.3390/molecules21091172
- Srinivasan, S., Avadhani, N.G., 2012. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1252–1263. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.021
- Stepanova, A., Shurubor, Y., Valsecchi, F., Manfredi, G., Galkin, A., 2016. Differential susceptibility of mitochondrial complex II to inhibition by oxaloacetate in brain and heart. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1857, 1561–1568. doi:10.1016/j.bbabi.2016.06.002
- Stowe, D.F., Camara, A.K.S., 2009. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1373–1414. doi:10.1089/ars.2008.2331
- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T., Suzumura, A., 2006. Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J. Biol. Chem.* 281, 21362–21368. doi:10.1074/jbc.M600504200
- Torres, R.J., Puig, J.G., 2015. Hypoxanthine deregulates genes involved in early neuronal development. Implications in Lesch-Nyhan disease pathogenesis. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38, 1109–1118. doi:10.1007/s10545-015-9854-4
- Torres, R.J., Puig, J.G., 2007. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* 2, 48. doi:10.1186/1750-1172-2-48
- Vaishnavi, S.N., Vlassenko, a. G., Rundle, M.M., Snyder, a. Z., Mintun, M. a., Raichle, M.E., 2010. Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 17757–17762. doi:10.1073/pnas.1010459107
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human

- disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Visser, J., Bär, P., Jinnah, H., 2000. Lesch–Nyhan disease and the basal ganglia. *Brain Res. Rev.* 32, 449–475. doi:10.1016/S0165-0173(99)00094-6
- Visser, J.E., Smith, D.W., Moy, S.S., Breese, G.R., Friedmann, T., Rothstein, J.D., Jinnah, H. a., 2002. Oxidative stress and dopamine deficiency in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *Dev. Brain Res.* 133, 127–139. doi:10.1016/S0165-3806(02)00280-8
- Vitvitsky, V.M., Garg, S.K., Keep, R.F., Albin, R.L., Banerjee, R., 2012. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ion imbalances in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822, 1671–1681. doi:10.1016/j.bbadis.2012.07.004
- Vuoristo, K.S., Mars, A.E., Sanders, J.P.M., Eggink, G., Weusthuis, R.A., 2016. Metabolic Engineering of TCA Cycle for Production of Chemicals. *Trends Biotechnol.* 34, 191–197. doi:10.1016/j.tibtech.2015.11.002
- Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., Schlattner, U., 2011. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids* 40, 1271–1296. doi:10.1007/s00726-011-0877-3
- Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H., Zhu, X., 2014. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1240–1247. doi:10.1016/j.bbadis.2013.10.015
- Wyse, A.T.S., Zugno, A.I., Streck, E.L., Matté, C., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., 2002. Inhibition of Na(+),K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem. Res.* 27, 1685–9.
- Xanthos, D.N., Sandkühler, J., 2014. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 43–53. doi:10.1038/nrn3617
- Xu, L., He, D., Bai, Y., 2016. Microglia-Mediated Inflammation and Neurodegenerative Disease. *Mol. Neurobiol.* 53, 6709–6715. doi:10.1007/s12035-015-9593-4
- Zamocky, M., Furtmüller, P.G., Obinger, C., 2008. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1527–48. doi:10.1089/ars.2008.2046
- Zhang, J.-M., An, J., 2007. Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* 45, 27–37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e
- Zhao, Q., Yang, S.T., Wang, J.J., Zhou, J., Xing, S.S., Shen, C.C., Wang, X.X., Yue, Y.X., Song, J., Chen, M., Wei, Y.Y., Zhou, Q.P., Dai, T., Song, Y.H., 2015. TNF alpha inhibits myogenic differentiation of C2C12 cells through NF-κB activation and impairment of IGF-1 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458, 790–795. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.026