

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

Avaliação do efeito protetor da L-carnitina sobre o dano ao DNA *in vitro* nas acidemias D e L-2-hidroxiglutárica e avaliação de estresse oxidativo e nitrativo na urina de pacientes com acidemia L-2-hidroxiglutárica

Daiane Grigolo Bardemaker Rodrigues

Porto Alegre, 2017

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

Avaliação do efeito protetor da L-carnitina sobre o dano ao DNA *in vitro* nas acidemias D e L-2-hidroxiglutárica e avaliação de estresse oxidativo e nitrativo na urina de pacientes com acidemia L-2-hidroxiglutárica

Dissertação apresentada por **Daiane Grigolo Bardemaker Rodrigues** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Profa. Dra. Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 24.03.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Adriana Simon Coitinho

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Cristiane Matté

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Maria Elisa Calcagnotto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Grigolo Bardemaker Rodrigues, Daiane

Avaliação do efeito protetor da L-carnitina sobre o dano ao DNA in vitro nas acidemias D e L-2-hidroxi-glutárica e avaliação de estresse oxidativo e nitrativo na urina de pacientes com acidemia L-2-hidroxi-glutárica / Daiane Grigolo Bardemaker Rodrigues. -- 2017.

119 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmen Regla Vargas.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Estresse oxidativo. 2. L-carnitina. 3. Acidemia D-2-hidroxi-glutárica. 4. Acidemia L-2-hidroxi-glutárica. 5. Dano ao DNA. I. Regla Vargas, Prof^a. Dr^a. Carmen, orient. II. Título.

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

Agradeço a CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e ao laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que disponibilizou equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

“Dedico esta dissertação à minha família, e
em especial ao meu amado filho Lucas”

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Carmen Regla Vargas, querida orientadora, pela oportunidade de estar aqui, por ser um exemplo de pessoa e profissional, pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

Ao professor Dr. Moacir Wajner, excelente pesquisador, pelas sugestões e ensinamentos.

Aos meus pais, Adilson e Marisa, meu exemplo de caráter e honestidade. Em especial, a minha mãe que sempre me incentivou a não desistir, mesmo nos momentos mais difíceis da minha vida.

Às minhas irmãs Cassiane e Cristiane e sobrinhos amados, Lauren e Enzo, pelo carinho sempre.

À família Rodrigues, pela torcida.

Ao meu marido Fernando, pelo incentivo e apoio nessa jornada.

Ao meu filho Lucas que alegra meus dias e torna a vida mais leve.

Ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial ao Laboratório de Análise de Metabólitos (Daniella e Ângela) que forneceram apoio para realização dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Biomarcadores em Doenças Metabólicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Aline, Bruna, Caroline, Carlos Eduardo, Desirrèe, Gilian, Graziela, Jéssica, Marion, Tatiane Hauschild e Tatiane Hammerschmidt), pelo apoio, sugestões e amizade. E um agradecimento especial ao colega Carlos Eduardo, pelos ensinamentos, amizade e apoio técnico.

À CAPES pela bolsa concedida.

E acima de tudo, agradeço a DEUS pela proteção e por iluminar meu caminho.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez” (George Bernard Shaw).

RESUMO

As acidemias D-2-hidroxi glutárica e L-2-hidroxi glutárica são duas distintas desordens neurometabólicas bioquimicamente caracterizadas por níveis aumentados dos ácidos D-2-hidroxi glutárico e L-2-hidroxi glutárico em tecidos e fluidos biológicos, respectivamente. Pacientes acometidos pela acidemia D-2-hidroxi glutárica são classificados em duas variantes, a D-2-hidroxi glutárica do tipo I ou a D-2-hidroxi glutárica do tipo II. A acidemia D-2-hidroxi glutárica do tipo I é causada por uma mutação no gene da D-2-hidroxi glutarato desidrogenase enquanto que a acidemia D-2-hidroxi glutárica do tipo II é causada por uma mutação de ganho de função no gene da isocitrato desidrogenase II. A acidemia L-2-hidroxi glutárica é causada por uma mutação no gene da L-2-hidroxi glutarato desidrogenase. Considerando que a fisiopatologia destas doenças não está totalmente elucidada e que muitos estudos têm demonstrado o envolvimento do estresse oxidativo em erros inatos do metabolismo, este trabalho tem por objetivo principal investigar parâmetros de estresse oxidativo e nitrativo na urina de pacientes com acidemia L-2-hidroxi glutárica e o dano ao DNA *in vitro* causado pelos ácidos acumulados em ambas as patologias, as acidemias D-2-hidroxi glutárica e L-2-hidroxi glutárica, bem como o efeito protetor da L-carnitina sobre o dano. Dessa forma, verificou-se que as concentrações de 50 μM do ácido D-2-hidroxi glutárico e 30 μM do ácido L-2-hidroxi glutárico induzem dano ao DNA e que concentrações de 30 μM e 150 μM de L-carnitina reduzem significativamente *in vitro* o dano ao DNA, comparado aos controles. Além disso, foram analisadas amostras de urina dos pacientes com acidemia L-2-hidroxi glutárica. Observou-se aumento significativo de espécies de guanina oxidadas, um marcador bioquímico de dano oxidativo ao DNA, bem como um aumento significativo da excreção de di-tirosina, indicando que os pacientes tem dano a proteínas. Entretanto, não houve diferença significativa nos níveis de isoprostanos urinários e nos níveis de espécies reativas do nitrogênio. Esses resultados sugerem, pelo menos em parte, dano oxidativo a proteínas e ao DNA e ressaltam o potencial antioxidante da L-carnitina como um promissor adjuvante no tratamento de pacientes afetados pelas acidemias L-2-hidroxi glutárica ou D-2-hidroxi glutárica.

Palavras-chave: acidemia D-2-hidroxiglutárica, acidemia L-2-hidroxiglutárica, estresse oxidativo, L-carnitina, dano ao DNA

ABSTRACT

D-2-hydroxyglutaric and L-2-hydroxyglutaric acidurias are two distinct neurometabolic disorders biochemically characterized by increased levels of D-2-hydroxyglutaric and L-2-hydroxyglutaric acids in biological fluids and tissues, respectively. Patients affected by D-2-hydroxyglutaric aciduria are classified into two variants, D-2-hydroxyglutaric aciduria type I or D-2-hydroxyglutaric aciduria type II. D-2-hydroxyglutaric aciduria type I is caused by mutation of D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene while D-2-hydroxyglutaric aciduria type II is caused by a gain of function mutation in isocitrate dehydrogenase 2 gene. L-2-hydroxyglutaric aciduria is caused by mutation in the L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene. Considering that the pathophysiology of these diseases is not fully understood and that many studies have been shown the involvement of oxidative stress in inborn errors of metabolism, the main objective of this work was investigate oxidative and nitrative stress parameters in the urine of L-2-hydroxyglutaric aciduria patients and to investigate the *in vitro* DNA damage caused by the accumulated acids of D-2-hydroxyglutaric and L-2-hydroxyglutaric acidurias as well as the protective effect of L-carnitine on this damage. It has been found that concentrations of 50 μM of D-2-hydroxyglutaric acid and 30 μM of L-2-hydroxyglutaric acid induce DNA damage and concentrations of 30 μM and 150 μM of L-carnitine significantly reduced the *in vitro* DNA damage compared to controls. In addition, urine samples from L-2-hydroxyglutaric aciduria patients were analyzed. It was observed a significant increase of oxidized guanine species, an oxidative DNA damage biomarker as well as a significant increase of urinary di-tyrosine level, indicating protein oxidative damage in the patients. However, there was no significant difference in the levels of urinary isoprostanes and reactive nitrogen species. These results suggest, at least in part, proteins and DNA oxidative damage and highlight the L-carnitine antioxidant potential as a promising adjuvant in the treatment of patients affected by L-2-hydroxyglutaric or D-2-hydroxyglutaric aciduria.

Keywords: D-2-hydroxyglutaric acidemia, L-2-hydroxyglutaric acidemia, oxidative stress, L-carnitine, DNA damage

LISTA DE ABREVIATURAS

CG/MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

CAT – Catalase

2-KG – 2 - cetoglutarato

DCFH – 2',7' - diclorofluoresceína

Di-tyr – di - tirosina

D-2-HGA – Acidemia D-2-hidroxiglutárica

D-2-HG – Ácido D-2-hidroxiglutárico

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

EIM – Erros inatos do metabolismo

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GSH-Px – Glutathiona-peroxidase

GSH – Glutathiona reduzida

HOT – Hidroxiácido-oxoácido-transidrogenase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IDH2 – Isocitrato-desidrogenase-2

IRM – Imagem por ressonância magnética

L-2-HGA – Acidemia L-2-hidroxiglutárica

L-2-HG – Ácido L-2-hidroxiglutárico

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

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

LC – L - carnitina

L-malDH – L- malato-desidrogenase

L-NAME – N - nitro - L - arginina - metil - éster

MDA – Malondialdeído

NO[•] – Radical óxido nítrico

MSUD – Doença da Urina do Xarope do Bordo

O₂^{•-} - Radical superóxido

OH[•] - Radical hidroxila

ONOO⁻ - Peroxinitrito

8-OHdG – 8 - hidroxí - 2'- deoxiguanosina

Phe – Fenilalanina

PKU – Fenilcetonúria

RL - Radicais livres

SOD – Superóxido-dismutase

SNC – Sistema nervoso central

TBA-RS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	23
1.2 ACIDEMIAS ORGÂNICAS	26
1.2.1 ACIDEMIA D-2-HIDROXIGLUTÁRICA E L-2- HIDROXIGLUTÁTICA.....	27
1.2.1.1 ACIDEMIA D-2-HIDROXIGLUTÁRICA	28
1.2.1.2 ACIDEMIA L-2-HIDROXIGLUTÁRICA	30
1.3 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO	32
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	36
1.5 L-CARNITINA	37
2. OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVOS GERAIS	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3. RESULTADOS	45
3.1 CAPÍTULO 1- ARTIGO 1: <i>Experimental evidence that L-carnitine attenuates DNA damage induced by D-2-hydroxyglutaric and L-2-hydroxyglutaric acids and oxidative stress in patients with L-2-hydroxyglutaric aciduria</i>	47
4. DISCUSSÃO GERAL	83
5. CONCLUSÕES	93
6. PERSPECTIVAS	97
7. REFERÊNCIAS	101
8. ANEXOS	111

8.1 ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES COM ACIDEMIA D-2-HIDROXIGLUTÁRICA OU ACIDEMIA L-2-HIDROXIGLUTÁRICA	113
8.2 ANEXO 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES CONTROLE	116
8.3 ANEXO 3- COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	119

1. INTRODUÇÃO

1.1 Erros inatos do metabolismo

Archibald Garrod, em 1908, propôs pela primeira vez o termo erros inatos do metabolismo (EIM) a partir de estudos em pacientes com alcaptonúria. Foi observado que esses pacientes excretavam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina e compartilhavam essa característica com outros membros da família (Scriver et al., 2001). Dessa forma, com base nas leis de Mendel, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para essa doença. Além disso, sabendo que o ácido homogentísico é um metabólito normal proveniente da degradação proteica, Garrod relacionou a doença como consequência do bloqueio na rota metabólica da tirosina (Scriver et al., 2001). Algumas décadas mais tarde, Beadle estabeleceu a base para o entendimento de EIM, demonstrando que a síntese proteica está relacionada a genes específicos (Mueller e Young, 1995). Desde então, foram descritos mais de 500 EIM (Scriver et al., 2001).

EIM são doenças hereditárias (em sua grande maioria de herança autossômica recessiva) que ocorrem devido a mutações em genes que codificam proteínas, que geralmente são enzimas, e resultam na síntese parcial ou totalmente reduzida da mesma. Dessa forma, com a diminuição da atividade enzimática ocorre um bloqueio total ou parcial de uma rota metabólica e que tem como consequência o acúmulo do substrato da enzima e a falta do produto (Figura 1). Os indivíduos afetados por essas doenças apresentam sintomatologia variada, a qual depende da rota metabólica afetada, do metabólito acumulado e do produto deficiente. Em sua grande maioria, são doenças graves que podem levar o paciente a óbito se não tratadas corretamente (Scriver et al., 2001). Os EIM são raros quando considerados individualmente, mas quando em conjunto somam aproximadamente 1: 1000 nascidos vivos (Scriver et al., 2001; Giugliani et al., 2016).

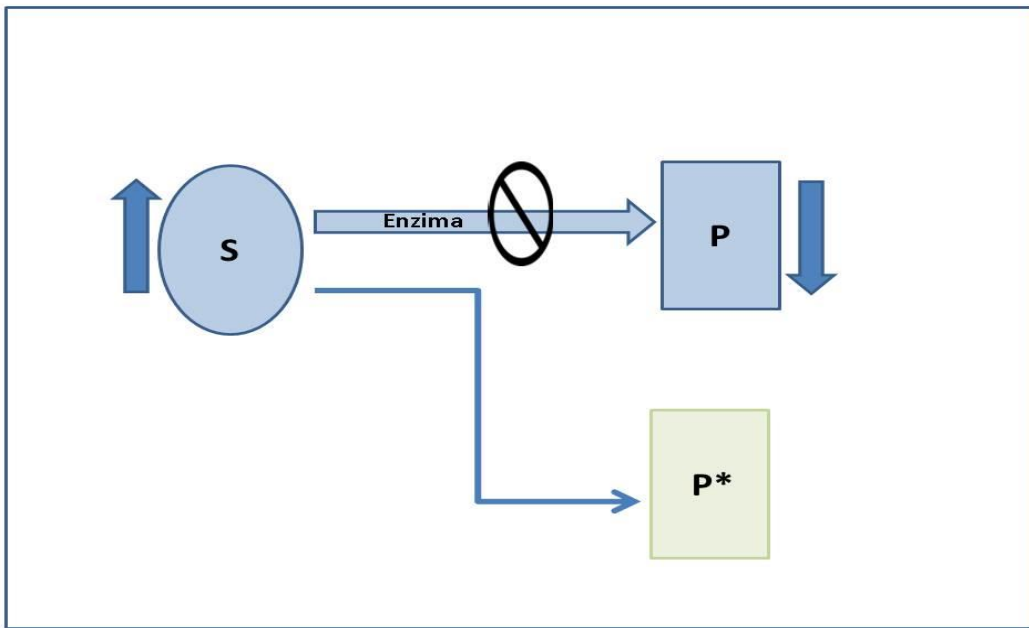


Figura 1: Bloqueio da rota metabólica pela enzima deficiente gerando acúmulo do substrato (S), diminuição do produto (P) e desvio do substrato para rota metabólica alternativa, o que geralmente acarreta em um produto tóxico (P*).

Os EIM podem ser classificados de diferentes maneiras na literatura. Neste trabalho, optamos pela classificação feita em 2001 por Saudubray e Charpentier (Tabela 1):

- a) defeitos na síntese ou catabolismo de moléculas complexas: em geral são caracterizadas pela deficiência em proteínas relacionadas ao complexo de Golgi ou lisossomos, culminando no acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos e em geral com manifestação crônica e progressiva.
- b) defeitos no metabolismo intermediário: são caracterizados por defeitos no metabolismo intermediário de moléculas pequenas, levando ao acúmulo de metabólitos tóxicos próximos ao bloqueio da rota. Os indivíduos afetados por esses distúrbios podem apresentar sinais clínicos agudos ou crônicos de intoxicação. Dentre os sinais agudos incluem: vômitos, coma, insuficiência hepática e complicações tromboembólicas. Como sinais crônicos, os pacientes podem apresentar atraso no desenvolvimento, retardo mental e cardiomiopatia.

- c) defeitos na produção e utilização de energia que ocorre no fígado, miocárdio, músculos, encéfalo e em outros tecidos. Esse grupo é subdividido em defeitos do metabolismo mitocondrial ou citoplasmático.

Tabela 1: Classificação dos EIM

Grupos	Característica	Doenças
Defeitos na síntese/catabolismo de moléculas complexas.	Acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos Forma crônica e progressiva	Doenças lisossômicas de depósito, doenças peroxissomais, erros congênitos da síntese do colesterol.
Defeitos no metabolismo intermediário.	Intoxicação aguda e crônica	Aminoacidopatias, acidemias orgânicas, defeitos do ciclo da uréia, porfirias etc.
Defeitos na produção e utilização de energia	Defeitos do metabolismo mitocondrial	Acidemias lácticas congênitas, defeitos na oxidação de ácidos graxos e metabolismo respiratório mitocondrial.
	Defeitos do metabolismo citoplasmático	Defeitos na glicólise, metabolismo do glicogênio, metabolismo da creatinina.

Fonte: Saudubray e Charpentier, 2001

Ainda, de acordo com Saudubray e Charpentier (2001), as manifestações clínicas dos EIM podem ser divididas em 4 grupos:

- sintomas agudos no período neonatal (Ex. Doença da urina do xarope do bordo).
- sintomas agudos, em geral intermitentes. A apresentação varia de 1 mês a idade adulta (Ex. Acidemias orgânicas).
- quadro específico: envolve deterioração progressiva de órgão ou sistema (Ex. doenças degenerativas cerebrais, doenças lisossômicas de depósito).
- quadro crônico geral e inespecífico: retardo mental (acúmulo de substâncias tóxicas) e retardo de crescimento (recusa alimentar).

Dentro dos grupos dos EIM, destacam-se as aminoacidopatias e acidemias orgânicas como sendo as mais frequentes em crianças gravemente enfermas. (Chalmers et al., 1980; Wajner et al., 2009).

1.2 Acidemias orgânicas

Acidemias orgânicas constituem um grupo dentro dos EIM caracterizadas bioquimicamente por acúmulo tecidual e excreção urinária de grandes quantidades de ácidos orgânicos. Essas acidemias são causadas pela deficiência da atividade enzimática do catabolismo de aminoácidos, carboidratos ou lipídios (Wajner e Goodman, 2011). No quadro I, estão listadas as principais manifestações clínicas nas acidemias orgânicas.

Quadro I: Manifestações clínicas nas acidemias orgânicas

Encefalopatia tóxica
Convulsões
Hipotonia
Letargia
Vômitos
Dificuldade respiratória
Recusa alimentar no período neonatal
Coma

Fonte: Wajner e Goodman, 2011

As características clínicas como deterioração neurológica, perda da função intelectual, ataxia, cetoacidose recorrente ou sintomas psiquiátricos podem ocorrer em crianças mais velhas ou na adolescência. Além disso, anormalidades no gânglio basal, alterações da substância branca e macrocefalia são comuns nos pacientes. No entanto, há um grupo de doenças dentro das acidemias orgânicas em que os sintomas são exclusivamente neurológicos. Neste grupo incluem-se as acidemias D-2-hidroxi-glutárica (D-2-HGA) e L-2-hidroxi-glutárica (L-2-HGA) e são, dessa maneira, conhecidas por acidemias orgânicas cerebrais (Wajner e Goodman, 2011).

Esse trabalho abordará estas duas acidemias orgânicas cerebrais: acidemia D-2-hidroxi-glutárica e L-2-hidroxi-glutárica.

1.2.1 Acidemias D-2-hidroxi glutárica e L-2-hidroxi glutárica

Os ácidos enantioméricos D-2-hidroxi glutárico (D-2-HG) e L-2-hidroxi glutárico (L-2-HG) foram identificados pela primeira vez em 1977, por Gregersen e colaboradores. No ano de 1980, o *Journal of Inherited Metabolic Disease* publicou, simultaneamente, o relato Chalmers et al que identificaram um paciente com D-2-HGA e o relato de Duran et al que identificaram um paciente com L-2-HGA (Kranendijk et al., 2012). Desde então, constam na literatura 80 pacientes portadores de D-2-HGA e 300 pacientes portadores de L-2-HGA no mundo (Wajner e Goodman, 2011; Patay et al., 2015). A prevalência e incidência exatas destas doenças, até o momento, são desconhecidas.

A suspeita dessas duas acidemias ocorre através da avaliação clínica, pois os pacientes apresentam atraso de desenvolvimento e outras disfunções neurológicas de etiologia desconhecida. Entretanto, essas características clínicas são geralmente homogêneas, sem sinais clínicos peculiares e o diagnóstico pode ocorrer de forma tardia devido ao curso lento e progressivo da doença (Patay et al., 2012). A confirmação do diagnóstico se dá através de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/MS) para a detecção dos níveis elevados do ácido 2-hidroxi glutárico na urina. No entanto, para classificar se é D ou L é necessário fazer a diferenciação quiral, realizada em laboratórios especializados, e/ou análise molecular para a detecção da mutação para posterior aconselhamento genético (Struys et al., 2004a; Rzem et al., 2004). Atualmente, não há tratamento para pacientes com D-2-HGA ou L-2-HGA, apenas medidas para o controle de sintomas e convulsões (Struys et al., 2006).

1.2.1.1 Acidemia D-2-hidroxi glutárica

A D-2-HGA é uma doença neurometabólica hereditária rara, bioquimicamente caracterizada por níveis aumentados do ácido D-2-HG nos fluidos biológicos, tais como plasma ($61 \pm 14 \mu\text{mol/L}$, controles = $0,7 \pm 0,2 \mu\text{mol/L}$), fluido cérebro-espinhal ($15-25 \mu\text{mol/L}$, controles = $0,1 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$) e urina ($1565 \pm 847 \text{ mmol/mol creatinina}$, controles = $6,0 \pm 3,6 \text{ mmol/mol creatinina}$) (Gibson et al., 1993; Kranendijk et al., 2012). Além disso, a D-2-HGA apresenta-se sob duas formas distintas: D-2-HGA do tipo I (aproximadamente 50% dos pacientes com D-2-HGA), com apresentação mais lenta e sintomas mais brandos e D-2-HGA do tipo II, com fenótipo mais severo (Van der Knaap et al., 1999 a,b; Kranendijk et al., 2012).

A D-2-HGA do tipo I é causada por uma mutação, de herança autossômica recessiva, no gene *D2HGDH* (MIM#600721) que codifica a enzima mitocondrial D-2-hidroxi glutarato-desidrogenase (D-2-HGDH) fazendo com que ocorra perda ou prejuízo da função. O ácido D-2-HG é produzido a partir do 2-cetoglutarato (2-KG) através da enzima hidroxil ácido-oxoácido-transidrogenase (HOT). A enzima D-2-HGDH, por sua vez, catalisa a conversão do ácido gerado em 2-KG (Kranendijk et al., 2010a) (Figura 2).

A D-2-HGA do tipo II é causada por uma mutação, autossômica dominante *de novo*, no gene *IDH2* (MIM#613657) que codifica a enzima mitocondrial isocitrato-desidrogenase-2 (IDH2) fazendo com que a enzima tenha um “ganho de função”. A função normal da IDH2 é a conversão de isocitrato a 2-KG, no entanto, a enzima mutante passa a produzir D-2-HG a partir do 2-KG. Essa produção adicional ocorre concomitantemente à produção do ácido D-2-HG pela HOT e, pressupõe-se que a D-2-HGDH não é capaz de metabolizar todo o D-2-HG formado. O resultado em ambas variantes é o acúmulo do ácido D-2-HG na urina, plasma e fluido cérebro-espinhal (Kranendijk et al., 2010a,b) (Figura 2).

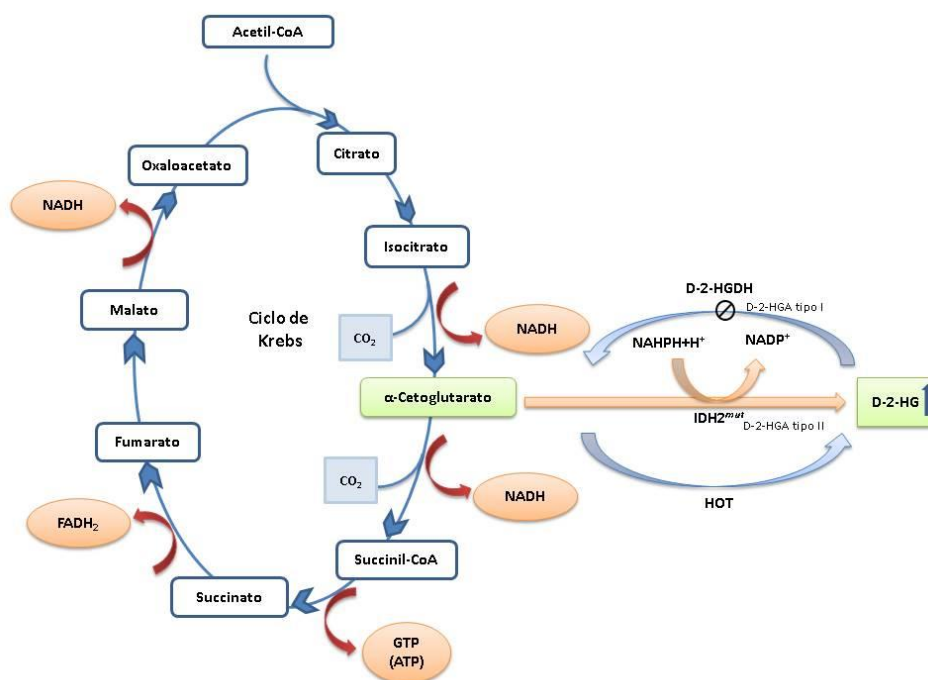


Figura 2: O ácido D-2-HG é formado a partir do 2-KG via HOTA. A D-2-HGDH catalisa a conversão do ácido D-2-HG para 2-KG (na D-2-HGA tipo I ocorre deficiência na D-2-HGDH, bloqueando a via). A enzima mutante IDH2 com ganho de função (IDH2^{mut}), somente na D-2-HG do tipo II, produz D-2-HG a partir de 2-KG adicionalmente à produção de D-2-HG via HOTA. Hipoteticamente, a D-2-HGDH não é capaz de metabolizar todo o D-2-HG gerado, resultando no acúmulo de D-2-HG (Figura adaptada de Kranendjik et al., 2012).

Em relação à clínica, esses pacientes apresentam sintomas extremamente variáveis. O fenótipo severo (tipo II) é caracterizado por encefalopatia epilética no período neonatal ou infantil de início precoce cursando com hipotonia, falha visual cerebral, atraso visual cerebral e atraso sério no desenvolvimento. Em exames de imagem por ressonância magnética (IRM) mostram atraso de maturação cerebral, anormalidades de massa branca ventricular e a presença de cistos subependimais nos primeiros anos de vida. Além disso, os pacientes podem apresentar cardiomiopatia (primariamente dilatada) e dismorfias faciais características (face plana com ponte nasal larga e anormalidades do ouvido externo) (Struys et al., 2006). No segundo fenótipo da doença (tipo I), que é mais brando e tem maior variabilidade, os pacientes apresentam hipotonia, convulsões (menor frequência que no grupo II) e atraso de desenvolvimento psico-motor. IRM mostram neste grupo os mesmos achados cerebrais do que no grupo severo, embora essas alterações sejam mais leves e variáveis

(Struys et al., 2006). Quanto à expectativa de vida para os pacientes do tipo I é indefinido, enquanto que para os pacientes do tipo II, varia de meses ao início da idade adulta (Kranendijk et al., 2012).

1.2.1.2 Acidemia L-2-hidroxi-glutárica

A L-2-HGA é uma doença neurometabólica hereditária rara, aparentemente mais frequente que a D-2-HGA, com um padrão de herança autossômico recessivo. Bioquimicamente, é caracterizada por níveis aumentados do ácido L-2-HG na urina (1283 ± 676 mmol/mol creatinina, controles = $6,0 \pm 5,4$ mmol/mol creatinina) e em outros fluidos biológicos, tais como plasma (47 ± 13 μ mol/L, controles = $0,6 \pm 0,2$ μ mol/L) e fluido cérebro-espinhal (62 ± 30 μ mol/L, controles = $0,7 \pm 0,6$ μ mol/L) (Gibson et al., 1993).

A doença é causada por uma mutação no gene *L2HGDH*, localizado no cromossomo 14q22.1, que é responsável por codificar a enzima mitocondrial L-2-hidroxi-glutarato-desidrogenase (L-2-HGDH) que atua ligada ao FAD. Com ausência da atividade dessa enzima, ocorre o bloqueio metabólico culminando no acúmulo do ácido L-2-HG nos fluidos biológicos (Rzem et al., 2004; Steenweg et al., 2010). O ácido L-2-HG é formado a partir do 2-KG através da reação catalisada pela enzima L-malato-desidrogenase (L-malDH), que emprega NADPH como doador de hidretos. Essa reação é hipoteticamente chamada de “indesejada”, pois normalmente a L-malDH catalisa a conversão de L-malato em oxaloacetato no ciclo de Krebs. A L-2-HGDH catalisa a interconversão rápida do ácido L-2-HG em 2-KG utilizando FAD como cofator. A enzima L-2-HGDH é considerada, por alguns autores, como enzima de reparo, pois tem o objetivo de proteger contra potenciais efeitos tóxicos e prevenir a perda de carbonos no ciclo de Krebs (Van Schaftingen et al., 2008) (Figura 3).

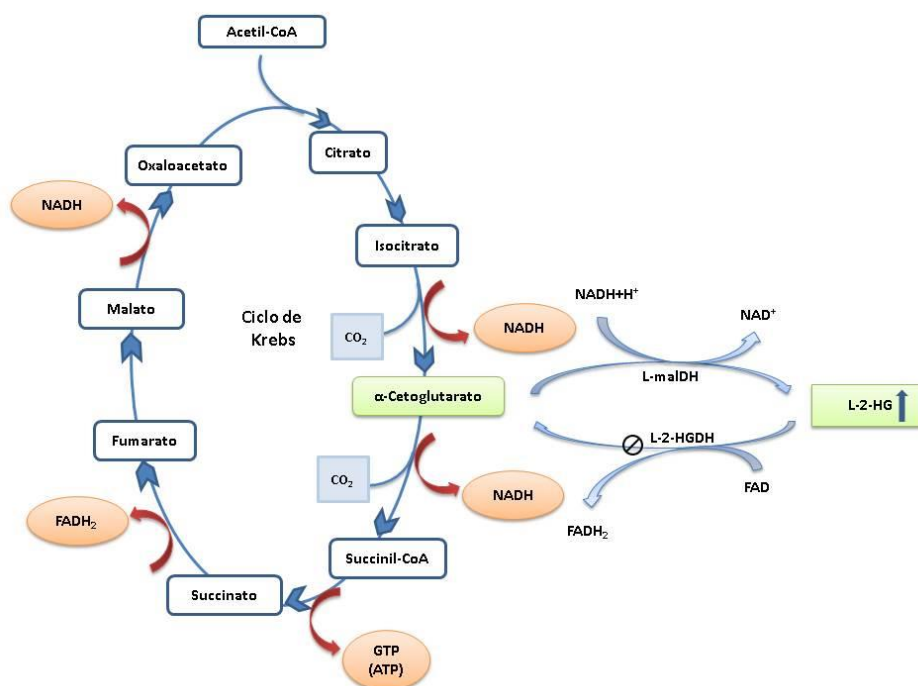


Figura 3. O ácido L-2-HG é formado através da interação “não-específica” da enzima L-malDH com 2-KG usando NADH. A L-2-HGDH catalisa a interconversão de L-2-HG a 2-KG utilizando FAD como cofator. Com a atividade prejudicada da L-2-HGDH, ocorre o acúmulo do L-2-HG (Figura adaptada de Kranendijk et al., 2012).

Clinicamente, a L-2-HGA é caracterizada por atraso psicomotor moderado nos primeiros anos de vida, seguido por ataxia cerebelar progressiva, epilepsia, disartria e deterioração mental de moderada a severa. Aproximadamente 50% dos pacientes apresentam macrocefalia, sinais piramidais e extrapiramidais (Steenweg et al., 2010). Achados em IRM incluem o envolvimento de massa branca periférica com atrofia cerebelar e sinais anormais no núcleo dentado e globo pálido (Topçu et al., 2005).

L-2-HGA tem início insidioso na infância e sua progressão é lenta, o que frequentemente acarreta um diagnóstico tardio na adolescência ou idade adulta. Além disso, é também conhecida como acidemia orgânica silenciosa, pois diferentemente de outras acidemias orgânicas, não ocorre descompensação metabólica (Van der Knaap et al., 2005; Kranendijk et al., 2012). Outra característica peculiar dessa doença é a associação frequente com tumores malignos cerebrais. Embora tenham muitos relatos de casos na literatura, a associação entre o metabólito L-2-HG e o câncer cerebral desenvolvido por alguns pacientes com L-2-HGA não está elucidada (Moroni et al., 2004; Vilarinho et al., 2005).

1.3 Radicais livres e estresse oxidativo

Radicaís livres (RL) são estruturas químicas com um elétron desemparelhado, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Isto os torna moléculas ou átomos instáveis e altamente reativos e com capacidade de combinar-se inespecificamente com várias moléculas integrantes da estrutura celular (Halliwell and Gutteridge, 2007). Diversas são as fontes geradoras de RL nos sistemas biológicos, eles podem ser formados endogenamente, como subprodutos do metabolismo aeróbico, ou por fontes exógenas, tais como: consumo de álcool, tabaco e outras drogas, exposição à radiação ionizante e eletromagnética e poluição atmosférica (Halliwell and Gutteridge, 2007; Dröge, 2002). Os RL podem ser divididos em espécies reativas do oxigênio (ERO) e espécies reativas do nitrogênio (ERN).

O termo ERO é usado para incluir radicaís formados pela redução do O_2 , como por exemplo, ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila (OH^{\bullet}) e substâncias reativas não-radicaís derivados do O_2 , como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell e Gutteridge, 2007). ERN incluem o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$).

O $O_2^{\bullet-}$ é formado principalmente através da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou por ação de fagócitos. NO^{\bullet} tem importância biológica fundamental, atuando na vasoregulação e neurotransmissão, no entanto, em excesso pode ser citotóxico. OH^{\bullet} , o mais reativo dos RL, reage rapidamente e inespecificamente com biomoléculas levando a danos. Além disso, a reação entre NO^{\bullet} e $O_2^{\bullet-}$ leva a formação de $ONOO^-$, que exibe alta capacidade de reatividade e, conseqüentemente, de dano (Halliwell, 1996; Halliwell, 2001).

ERO e ERN ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto em patológicos no organismo. Em baixos níveis, são essenciais para muitas vias biológicas; no entanto, quando há uma superprodução dessas espécies ou incapacidade de removê-las, um estado pró-oxidante pode ser gerado. Dessa forma, espécies reativas têm o potencial de oxidar moléculas do organismo, podendo assim promover oxidação lipídica, oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, reagir com proteínas, levando à sua inativação e conseqüente alteração de sua função, além de reagir com o DNA e RNA, levando a

mutações somáticas e a alterações na transcrição gênica (Halliwell, 1996; Halliwell e Whiteman, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Nesse contexto, as células aeróbicas desenvolveram um sistema de defesa antioxidante com o objetivo de controlar o fluxo e a ação de RL e espécies reativas. Esse sistema envolve mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Ahmed, 2005). Dentre as enzimas que removem e protegem as células contra os RL estão incluídas: catalase (CAT), a superóxido-dismutase (SOD) e a glutaciona-peroxidase (GSH-Px) (Tabela 2) e as defesas antioxidantes não enzimáticas. Nesse grupo fazem parte algumas vitaminas, como por exemplo, vitamina E e ácido ascórbico, glutaciona reduzida (GSH), L-carnitina, cofatores, flavonoides, e proteínas quelantes de metais. O mecanismo de ação dos compostos não enzimáticos é bastante diverso, podendo envolver a remoção do oxigênio presente no meio, o sequestro de ERO, a prevenção de reações formadoras de RL, o reparo de DNA entre outros (Halliwell, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Tabela 2: Reações das defesas antioxidantes enzimáticas: a) Reação de dismutação do íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$); b) Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a oxigênio no estado fundamental (O_2); c) Reação de redução de peróxidos (LOOH) e álcoois (LOH), catalisada pela GPx.

Defesas antioxidantes enzimáticas		
Superóxido-dismutase (SOD)	SOD catalisa a dismutação de dois radicais $O_2^{\bullet-}$ (atua como <i>scavenger</i> de íons $O_2^{\bullet-}$).	a) $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightleftharpoons{SOD} H_2O_2 + O_2$
Catalase (CAT)	CAT catalisa diretamente a decomposição do H_2O_2	b) $2 H_2O_2 \xrightleftharpoons{CAT} 2 H_2O + O_2$
Glutaciona-peroxidase (GPx)	GPx remove o H_2O_2 e peróxidos orgânicos (LOOH) para seus álcoois correspondentes (LOH) pelo acoplamento de sua redução a H_2O com a oxidação da glutaciona reduzida (GSH).	c) $LOOH + 2GSH \xrightleftharpoons{GPx} GSSG + H_2O + LOH$

Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2007

Em condições não patológicas, as ERO produzidas reagem com as defesas antioxidantes enzimáticas e/ou não enzimáticas. No entanto, quando há um desequilíbrio nesse sistema entre a formação de compostos oxidantes e defesas antioxidantes, instala-se uma condição chamada de estresse oxidativo (Figura 5). Dessa forma, a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade de defesa e isso pode resultar em adaptação das células por *up regulation*, injúria celular e morte por apoptose ou necrose (Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007). O desequilíbrio do sistema pró-oxidante/antioxidante em favor do pró-oxidante pode levar a uma série de consequências potencialmente danosas a todos os tipos de moléculas, como por exemplo, lipídios, proteínas e DNA (Halliwell e Gutteridge, 2007).

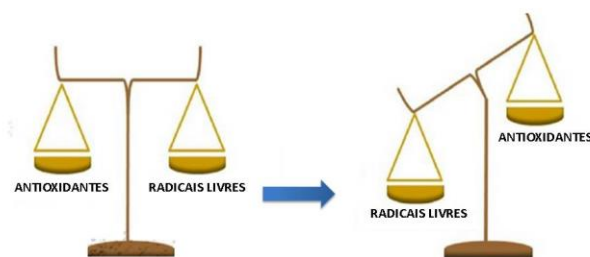


Figura 5: Estresse oxidativo: desequilíbrio do sistema antioxidante/pró-oxidante.

A lipoperoxidação pode ser descrita como um processo no qual ERO e/ou ERN atacam lipídios, especialmente ácidos graxos poli-insaturados, gerando uma variedade complexa de produtos reativos, entre eles, malondialdeído, 4-hydroxynonenal e isoprostanos, que são produtos derivados da peroxidação não enzimática do ácido araquidônico sendo considerados biomarcadores confiáveis de estresse oxidativo (Yin et al., 2011; Halliwell e Gutteridge, 2007). Dentre os efeitos da lipoperoxidação, destacam-se principalmente os que ocorrem nas membranas biológicas, tais como: alteração do microambiente lipídico, alteração de permeabilidade e fluidez e inativação irreversível de proteínas e lipídios por formação de ligações cruzadas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

As cadeias laterais de resíduos de aminoácidos das proteínas são sensíveis à oxidação por ERO. A oxidação proteica pode ser medida utilizando-se alguns biomarcadores, como por exemplo, a medida de grupos sulfidrilas, determinação de proteínas carboniladas e medida de di-tirosina (di-tyr). Esse último, é formado pela oxidação de resíduos de tirosina adjacentes levando a formação de ligações interfenólicas altamente estáveis e que não são metabolizadas (Mc Guire et al., 2009).

O dano ao DNA pode ocorrer em consequência do ataque de ERO e/ou ERN. O $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 podem iniciar dano ao DNA por interação com metais de transição (ferro e cobre) produzindo o OH^{\bullet} , que é frequentemente o mais danoso. O OH^{\bullet} , pode reagir com todos os componentes da molécula do DNA, danificando bases pirimídicas, bases purínicas e o esqueleto de desoxirribose. Dessa forma, o DNA pode sofrer quebras em sua estrutura, danos álcali-lábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão. As células possuem diversos mecanismos para proteção contra o dano ao DNA, no entanto, se esses mecanismos falham, consequências deletérias podem ocorrer, como mutações, microssatélites instáveis, aberrações cromossômicas, citotoxicidade e crescimento neoplásico (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O dano ao DNA pode ser medido através de uma técnica conhecida por ensaio cometa alcalino a qual foi descrita por Singh et al (1988). Essa técnica consiste em medir o dano resultante da fragmentação do DNA, e estes fragmentos migram para fora do núcleo formando uma espécie de “cauda de cometa”, que é proporcional ao dano (Figura 6). Recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado dano oxidativo a lipídeos, proteínas e ao DNA em EIM (Ribas et al., 2010, Mescka et al., 2014; Deon et al., 2015).

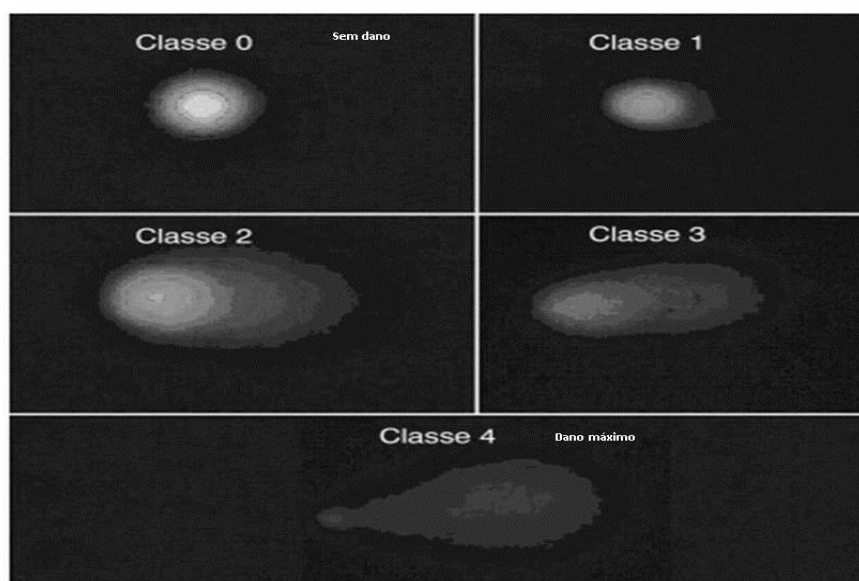


Figura 6: Ensaio cometa alcalino em leucócitos. A intensidade de fluorescência na cauda do cometa é classificada de 0 a 4 (Fonte: Aycicek et al., 2008).

1.4 Estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas

Sabe-se que o sistema nervoso central (SNC) é mais suscetível ao dano oxidativo do que outros tecidos, devido ao grande consumo de O_2 necessário a alta demanda energética, a alta concentração de lipídios poli-insaturados em sua composição e ao grande conteúdo de ferro aliado ao deficiente mecanismo de proteção contra ERO, favorecendo a lipoperoxidação em algumas áreas cerebrais (Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007). Outros fatores como a presença de altos níveis de neurotransmissores auto-oxidáveis, tais como dopamina, serotonina e epinefrina e alta quantidade de micróglia e macrófagos que podem produzir $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 contribuem para o aumento dessa suscetibilidade (Halliwell, 2006).

Inúmeros estudos sugerem que RL e o estresse oxidativo possam estar envolvidos na fisiopatogenia de algumas importantes doenças que afetam o SNC, como doença de Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e alguns EIM. Nesse contexto, diversos estudos têm demonstrado que os metabolitos acumulados em EIM, incluindo fenilcetonúria (Sitta et al., 2006), doença da urina do xarope do bordo

(Barschak et al., 2006), adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (Deon et al., 2007) e desordens do propionato (Ribas et al., 2010) induzem estresse oxidativo, evidenciando em algum grau o envolvimento no dano neurológico observado nos pacientes acometidos por essas doenças. Com relação às acidemias D e L-2-hidroxiglutárica, há muito poucos estudos na literatura a respeito do envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatogenia da doença. Recentemente, foi demonstrado em modelo animal que o ácido acumulado nessas duas doenças provoca injúria cerebral e alterações na homeostase redox (da Rosa et al., 2014; da Rosa et al., 2015) e um estudo realizado em pacientes com L-2-HGA mostrou alterações de parâmetros de estresse oxidativo no plasma (Jellouli et al., 2014).

1.5 L-carnitina

L-carnitina (LC) é um composto de amônio, solúvel em água (figura 4) importante no metabolismo dos mamíferos, e é encontrada no organismo na forma de LC livre, acetil-L-carnitina e outros ésteres de LC. A LC é obtida tanto pela biossíntese endógena (aproximadamente 25%) como exogenamente, oriunda da dieta (carne vermelha, ovos e leite) (Walter, 1996). Além disso, a LC não é metabolizada, sendo assim excretada na urina na forma de LC livre ou acilcarnitina (Stanley, 2004).

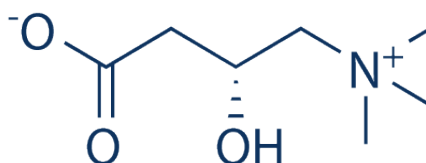


Figura 4: Estrutura química da LC, (ácido β -hidroxi- γ -4-n trimetil aminobutírico).

A LC desempenha um importante papel na função celular do metabolismo atuando como facilitadora do transporte mitocondrial de ácidos graxos de cadeia longa

para a β -oxidação e produção de ATP (Agarwal e Said, 2004; Walter, 1996). Além disso, a LC está envolvida na transesterificação e excreção de ésteres de acil-CoA; remoção de ácidos orgânicos e xenobióticos na mitocôndria, atuando na proteção das células contra efeitos tóxicos causados pelo acúmulo desses ácidos (Chapela et al., 2009).

Diversos estudos na literatura têm demonstrando o efeito protetor da LC contra ERO, devido principalmente ao sequestro de radicais hidroxila (efeito “*scavenger*”) e da inibição da formação destes radicais na reação de Fenton, na qual o Fe^{2+} reage com o H_2O_2 , produzindo o radical hidroxila (Gulcin, 2006; Lee et al, 2014). Nesse contexto, a LC tem sido estudada em alguns EIM, como por exemplo, na fenilcetonúria (PKU) em que alguns autores verificaram que os níveis desse composto estão diminuídos no plasma dos pacientes, com adesão ao tratamento de restrição proteica, a lipoperoxidação aumentada e as defesas antioxidantes diminuídas, sendo que esses dois últimos parâmetros tiveram uma correlação significativa com os baixos níveis de LC (Sitta et al., 2009). Ainda, foi observado que a LC teve um efeito protetor sobre o dano ao DNA *in vitro* induzido pela fenilalanina (Phe), que é o principal metabólito acumulado na PKU (Deon et al., 2015).

Nesse contexto, Meska et al (2011) mostraram, em modelo animal, de Doença da Urina do Xarope do Bordo (MSUD), uma desordem neurometabólica hereditária causada pela deficiência da atividade do complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada que a LC é capaz de reduzir a oxidação proteica e a lipoperoxidação. Além disso, os autores verificaram que a suplementação de LC é capaz de reduzir os níveis plasmáticos de malondialdeído em pacientes com MSUD durante tratamento com dieta de restrição proteica (Meska et al., 2013). Corroborando com esses resultados, foi observado que a LC é capaz de prevenir dano ao DNA induzido por metabólitos acumulados na MSUD *in vitro* (Meska et al., 2014) e *in vivo* (Meska et al., 2015).

Outro resultado interessante na literatura foi proposto por Ribas et al (2010a) no qual pacientes com desordem do metabolismo do propionato durante dieta de restrição proteica e suplementação com LC apresentaram baixos níveis de dano oxidativo a proteínas e a lipídios em relação a pacientes não tratados. Além disso, a LC foi capaz

de prevenir dano ao DNA induzido pelos ácidos propiônico e metilmalônico *in vitro* (Ribas et al., 2010b).

Com base nesses estudos, acredita-se que a LC têm potencial para uso como adjuvante em terapias de doenças com o envolvimento do estresse oxidativo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Considerando o crescente número de evidências na literatura acerca do envolvimento do estresse oxidativo em EIM, especialmente aqueles com neurodegeneração, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* dos ácidos D-2-HG e L-2-HG sobre o dano ao DNA e o efeito protetor da LC sobre este dano, assim como avaliar parâmetros de estresse oxidativo e nitrativo na urina de pacientes L-2-HGA.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Avaliar *in vitro* o dano ao DNA por efeito dos ácidos D e L-2-HG através de ensaio cometa em leucócitos.
- 2.2.2 Avaliar *in vitro* o efeito da LC em diferentes concentrações sobre o dano ao DNA, através de ensaio cometa.
- 2.2.3 Avaliar o dano oxidativo a proteínas e a lipídeos, em amostras de urina de pacientes com L-2-HGA, através dos parâmetros:
 - a) Conteúdo de di-tirosina (dano a proteínas)
 - b) Conteúdo de isoprostanos (dano a lipídeos)
- 2.2.4 Avaliar a presença de dano nitrativo em amostras de urina de pacientes com L-2-HGA através da medida dos níveis de espécies reativas do nitrogênio.
- 2.2.5 Avaliar o dano oxidativo ao DNA em amostras de urina de pacientes com L-2-HGA através da medida dos níveis de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina.

3. RESULTADOS

Os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de capítulo/artigo científico.

3.1 CAPÍTULO 1- ARTIGO 1: *Experimental evidence that L-carnitine attenuates DNA damage induced by D-2-hydroxyglutaric and L-2-hydroxyglutaric acids and oxidative stress in patients with L-2-hydroxyglutaric aciduria*

Artigo científico submetido no periódico Toxicology in vitro.

Experimental evidence that L-carnitine attenuates DNA damage induced by D-2-hydroxyglutaric and L-2-hydroxyglutaric acids and oxidative stress in patients with L-2-hydroxyglutaric aciduria

Daiane Grigolo Bardemaker Rodrigues^{a,c,*}, Daniella de Moura Coelho^c, Ângela Sitta^c, Carlos Eduardo Diaz Jacques^{b,c}, Tatiane Hauschild^{a,c}, Vanusa Manfredini^d, Abdellatif Bakkali^e, Eduard A. Struys^e, Cornelis Jakobs^e, Moacir Wajner^{b,c}, Carmen Regla Vargas^{a,b,c,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, R. Ramiro Barcelos, 2600, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Serviço de Genética Médica, HCPA, R. Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, BR 472, Km 585, 118, Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

^e Metabolic Unit, Clinical Chemistry, VUmc Medical Center, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands

***Corresponding authors at:** Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone: +55 51 33598011

Telefax: +55 51 33598010

E-mail addresses: crvargas@hcpa.edu.br (C.R. Vargas),

daianegbr@hotmail.com (D.G.B. Rodrigues)

Abstract

D-2-hydroxyglutaric (D-2-HGA) and L-2-hydroxyglutaric (L-2-HGA) acidurias are distinct rare neurometabolic disorders are biochemically characterized by increased levels of D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG) and L-2-hydroxyglutaric acid (L-2-HG) in biological fluids and tissues, respectively. These diseases are caused by mutations in the specific enzymes involved in metabolic pathway. In the present work, we investigated if L-carnitine (LC) was able to prevent *in vitro* DNA damage induced by D and L-2-hydroxyglutaric acids and studied oxidative stress parameters in urine of L-2-HGA patients. It was verified that the concentrations of 50 μ M of D-2-HG and 30 μ M of L-2-HG induced DNA damage and the concentrations of 30 and 150 μ M of LC reduced significantly this damage in vitro. In L-2-HGA patients, it was measured urinary oxidized guanine species and it was demonstrated a significant increase of this oxidative DNA damage biomarker. It was also verified in these patients a significant increase of urinary di-tyrosine excretion, indicating protein oxidative damage, but no significant differences was observed in isoprostanes and reactive nitrogen species levels in urine. The data presented suggest the involvement, at least in part, of oxidative damage, especially in DNA, in these diseases and the protective effect of LC upon DNA damage as an antioxidant.

Keywords: L-2-hydroxyglutaric aciduria; D-2-hydroxyglutaric aciduria; L-carnitine; DNA damage; Oxidative stress.

1. Introduction

D-2-hydroxyglutaric (D-2-HGA) and L-2-hydroxyglutaric (L-2-HGA) acidurias are two distinct inherited neurometabolic disorders biochemically characterized, respectively, by increased levels of D-2-hydroxyglutaric acid (D-2-HG) and L-2-hydroxyglutaric acid (L-2-HG) in biological fluids and tissues (Kranendijk et al., 2012).

D-2-HGA was identified first by Chalmers et al (1980) and since then about 80 patients have been described worldwide (Wajner and Goodman, 2011). Affected patients present one of the two variants: D-2-HGA type I, which is caused by mutations in the D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene (*D2HGDH*), whereas D-2-HGA type II is due to gain-of-function mutations in the isocitrate dehydrogenase II gene (*IDH2*) (Struys et al., 2005a, 2005b; Kranendijk et al., 2010a, 2011). These disorders may have a severe and deadly form or a milder form. Patients affected by the severe form usually present a neonatal or early infantile epileptic encephalopathy, which marked hypotonia, severe development delay, seizures and cardiomyopathy, whereas patients with the mild form commonly have psychomotor retardation, macrocephaly and hypotonia. Brain magnetic resonance imaging (MRI) features include delayed cerebral maturation, ventricular dilatation and subependymal cysts (Van der Knaap et al., 1999 a, b).

L-2-HGA was first identified by Duran et al (1980) with have 300 cases reported so far in literature (Balaji et al., 2014). This disorder is caused by mutations in the L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene (*L2HGDH*) and unlike most other organic acidurias, L-2-HGA develops insidiously, without episodes of metabolic decompensation and is potentially associated with central nervous system tumors (Moroni et al., 2004; Topçu et al., 2005; Haliloglu et al., 2008; Patay et al., 2012). The main neurological manifestations include progressive mental deficiency, variable motor impairment and cerebellar ataxia. Besides, most

patients present macrocephaly, pyramidal and extrapyramidal signs, dystonia and a typical MRI profile with striking subcortical leucoencephalopathy and basal ganglia abnormalities (Wajner and Goodman, 2011; Isikay, 2014).

The mechanisms of the neurological symptoms presented by D-2-HGA and L-2-HGA patients are still poorly understood. However, considering that increased concentrations of D-2-HG and L-2-HG were associated with the appearance of neurological symptoms, these compounds may be potentially neurotoxic in these disorders (Van der Knaap et al., 1999a; Yilmaz, 2009; Patay et al., 2012; Marcel et al., 2012; Jovic et al., 2014). An *in vitro* study demonstrated that L-2-HG inhibits creatine kinase activity in cerebellum (da Silva et al., 2003). Furthermore, an animal model of L-2-HGA demonstrated that L-2-HG induces oxidative stress by decreasing the antioxidant defenses and raising reactive oxygen species in striatum and cerebellum of rats, as well as important brain histopathological alterations (da Rosa et al., 2015). In what concern to D-2-HGA, it was shown that D-2-HG similarly disrupts redox homeostasis and causes histopathological alterations in rat striatum (da Rosa et al., 2014).

Oxidative stress may play important role in the pathophysiology of some inborn errors of intermediary metabolism, since accumulation of toxic metabolites may lead to excessive production of free radicals (Barschak et al., 2006; Ribas et al., 2010). Oxidative damage, caused by reactive oxygen and nitrogen species, is an important mediator of neurodegeneration since brain has relatively low levels of antioxidant defenses, high lipid content and catecholamines, which are highly susceptible to free radical attack (Halliwell and Gutteridge, 2007). The hydroxyl radical, the most dangerous reactive oxygen species, can induce a diversity of lesions in DNA, which include single-strand breaks, double-strand breaks, alkali-labile sites, oxidized purine and pyrimidine bases, and DNA-protein cross-links (Halliwell, 2001; Wajner et al., 2004; Garcia et al., 2006). In this context, if cellular repair mechanisms fail, mutations, deletions, cancer and even cell death could occur (Marnett, 2000;

Cooke et al., 2006). Several studies have investigated DNA damage in some inborn errors of metabolism (IEM) (Filippon et al., 2011; Negretto et al., 2014; Marchetti et al., 2015) but there is no study in L-2-HGA and D-2-HGA. Besides, the mechanisms by which brain tumors develop in patients affected by L-2-HGA are not yet elucidated.

In the present study, we tested the *in vitro* effects of D-2-HG and L-2-HG on DNA damage by using the comet assay, as well as whether L-carnitine (LC), a drug commonly used to treat organic acidurias, could reduce this damage *in vitro*. Furthermore, we measured oxidative and nitrative stress parameters in urine of L-2-HGA patients.

2. Materials and Methods

2.1 *In vitro* study

2.1.1 Leukocyte preparation from blood of normal individuals

Venous blood was collected under sterile conditions in heparinized vials from six healthy volunteers. Leukocytes isolated were incubated with 50 μ M of D-2-HG or 30 μ M of L-2-HG at 37°C for 6 h (Tice et al., 2000). These concentrations were based on the plasma D-2-HG or L-2-HG levels in patients with these diseases (Gibson et al., 1993). In some experiments, LC (30 and 150 μ M) was co-incubated with 50 μ M of D-2-HG or 30 μ M of L-2-HG and DNA damage determined. The final concentrations of LC in the assays were based in previous findings obtained in patients affected by organic acidurias and treated with LC (100 mg/Kg/dia), showing that plasma levels of this compound can vary from 30 μ mol/L at diagnosis to almost 100 μ mol/L under LC supplementation (Ribas et al., 2010).

2.2 *In vivo* study

2.2.1 Urine collection from controls and patients with L-2-HGA

Eleven patients (average age at the time of urine collection was 17.7 ± 12.99 years old) with L-2-HGA diagnosed at the Medical Genetic Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil, were used in the experiments. The diagnosis was performed by urinary organic acid analysis using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS/MS) (Wajner et al., 2009) and confirmed by enantiomer separation using stable-isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Struys et al., 2004). The control group consisted of samples from ten aged-matched healthy children (the average age at the time of urine collection was 20.0 ± 8.12 years old).

2.2.1.1 Ethical considerations

This study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (15-0601). Patient's parents have signed the informed consent form before samples collection.

2.1.3 Single cell gel electrophoresis (comet assay)

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al (1988) and in accordance with the general guidelines for use of the comet assay (Tice et al., 2000; Singh et al., 1988). Aliquots of 100 μ L from whole blood were suspended in agarose and spread into a glass microscope slide pre-coated with agarose. Slides were placed in lyses buffer (2.5 NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 10% DMSO, pH 10-10.5) to remove cell proteins, leaving DNA

as “nucleioids”. After treatment with lyses buffer and alkaline buffer solution (300mM NaOH and 1mM EDTA, pH>13), the slides were submitted to a horizontal electrophoresis for 20 min at 4°C (25V; 300mA; 0.9V/cm). Slides were then neutralized, washed in bi-distilled water and stained using a silver staining protocol (Nadin et al., 2001). After drying at room temperature overnight, gels were analyzed using an optical microscope. A hundred cells were analyzed by microscopy and to each cell it was determined a damage class. The damage classes were classified as: 0 = no tail (no damage); 1 = small tail smaller than the diameter of the head; 2 = tail length between one and two times the diameter of the head; 3 = long tail greater than twice the diameter of the head; 4 = long tail and more widespread than class 3. It was made a multiplication of each damage class by the number of cells found in each damage class. The damage index (DI) was determined by the sum of these multiplications. The slides were analyzed under blind conditions at least by two different individuals.

2.2.2 Enantiomeric classification of D-2-HG or L-2-HG acids

Enantiomeric analysis was made in urine samples of each patient included in the study. Enantiomeric separation of the D-2-HG or L-2-HG was performed by LC-MS/MS after derivatization with diacetyl- L-tartaric anhydride. Results were reported in mmol/mol creatinine (Struys et al., 2004).

2.2.3 Urinary oxidized guanine species

Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (from DNA), 8- hydroxyguanosine (RNA) and 8-hydroxyguanine (DNA and RNA) levels were determined by the DNA/RNA Oxidative Damage ELISA Kit (Cayman Chemical, USA). This assay is based on the competition between oxidatively damaged guanine species and an 8-OH-dG-acetylcholinesterase

conjugate for a limited amount of DNA/RNA Oxidative Damage Monoclonal antibody. Because the amount of tracer is held constant while the concentration of oxidatively damaged guanine varies, the amount of tracer that is able to bind to the monoclonal antibody will be inversely proportional to the concentration of oxidatively damaged guanine in the well. The antibody-oxidatively damaged guanine complex binds to the goat polyclonal anti-mouse IgG that has been previously attached to the well. The product of this enzymatic reaction has a distinct yellow color and absorbs strongly at 412 nm. The sample oxidized guanine species concentrations (ng/mL) were calculated using a polynomial equation from the relative absorbance of standard curve. After creatinine correction, the results were expressed as ng/mg creatinine.

2.2.4 Urinary 15-F2t-isoprostane levels

15-F2t-isoprostane, a product of arachidonic acid metabolism and a biomarker of lipid peroxidation, was measured by *Urinary Isoprostane ELISA kit* (Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, USA) according to the kit's instructions. In this assay, the analyte present in the urine samples competes with the horseradish peroxidase-conjugated 15-F2t-isoprostane for the binding to a specific antibody fixed on the microplate. 15-F2t-isoprostane concentration was determined spectrophotometrically at 630 nm, by the intensity of color developed after the substrate was added to the wells. Results were expressed as ng of isoprostanes per mg of urinary creatinine (ng/mg creatinine).

2.2.5 Urinary di-tyrosine (di-Tyr) levels

In order to determine the levels of protein oxidation in urine, the intensity of di-Tyr fluorescence was measured according to the method described by Kirschbaum (2002). For this assay, 50 μL of thawed urine was added to 950 μL of 6 mol/L urea in 20 mmol/L sodium phosphate buffer pH 7.4. After 30 minutes, di-Tyr concentration was measured using a fluorimeter (excitation 315 nm, emission 410 nm). Results were expressed as fluorescence units per mg of urinary creatinine (FU/mg creatinine).

2.2.6 Reactive nitrogen species

Total levels of nitrate + nitrite ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) in urine were determined using the *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (LDH Method)* from Cayman Chemical® (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). This method is based on the reduction of NO_3^- to NO_2^- using nitrate reductase. The amounts of NO_2^- generated NO_3^- reduction, plus the NO_2^- already present in the sample react with sulfanilamide producing a cationic intermediate, which reacts with N-(1-naphtyl) ethylenediamine. This reaction results in an azo product whose absorption can be measured at 540 nm. Results were reported as $\mu\text{mol/mg}$ creatinine.

2.2.7 Urinary creatinine

Creatinine was determined using the Creatinine Kinetic kit of Bioclin® (Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brazil) by reaction with picric acid under alkaline conditions that produces an orange colored derivative, whose absorbance was determined in a spectrophotometer at 510 nm. Results were expressed as mg creatinine/dL.

2.3 Statistical analysis

Data were analyzed using the nonparametric Mann-Whitney test for comparisons between two groups and nonparametric Kruskal- Wallis followed by the Mann-Whitney U-test for comparisons of more than two groups. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The values were presented as medians (min; max). All analyses were performed using the GraphPad Prism[®] (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA — version 5.0) software in a PC-compatible computer.

3. Results

We first investigated the *in vitro* effect of 50 μ M of D-2-HG and 30 μ M of L-2-HG on DNA damage in leukocytes from whole blood of healthy volunteers (figures 1 and 2, respectively). We also investigated the *in vitro* effect of LC (30 μ M and 150 μ M) on DNA damage induced by these acids, as showed in figures 3 and 4, respectively. Both D-2-HG and L-2-HG tested concentrations provoked DNA damage (arbitrary units) significantly higher than in the control group ($p < 0.01$). LC at concentrations of 30 μ M and 150 μ M significantly reduced the DNA damage induced by 30 μ M of L-2-HG and 50 μ M of D-2-HG ($p < 0.05$). Furthermore, there was a significant difference between the attenuation provoked by two LC concentrations studied ($p < 0.05$), since the reduction of DNA damage induced by 150 μ M of LC was higher than that of 30 μ M of LC.

Table 1 displays L-2-HG and D-2-HG urinary levels in the patients, confirming the L-2-HGA diagnosis in all patients studied. In order to investigate if there was oxidative DNA

damage in the patients, we measured urinary oxidized guanine species. It was observed a significant increase in these species ($p < 0.05$) when compared to the control group (figure 5).

It was also analyzed lipid (isoprostanes) and protein (di-tyr) oxidative damage, as well as nitrate plus nitrite content in the urine of patients with L-2-HGA. As described in figure 6, it was observed a significant increase of di-Tyr excretion in urine of these patients when compared to controls ($p < 0.05$), evidencing some degree of protein oxidation, but there were no significant differences between the two groups regarding to isoprostanes and reactive nitrogen species levels (nitrate plus nitrite), as demonstrated in figure 7 and 8, respectively.

4. Discussion

The inherited neurometabolic disorders D-2-HGA and L-2-HGA are marked biochemically characterized by tissue accumulation of high amounts of D-2-HG and L-2-HG, respectively. Patients with these organic acidurias present during infancy and early childhood progressive neurodegeneration of vulnerable brain regions (Kranendijk et al., 2010a). Although the exact underlying mechanisms of their neuropathology are still unknown, several studies have demonstrated a neurotoxic role of the metabolites D-2-HG and L-2-HG. It was observed that D-2-HG provokes impaired energy metabolism due to inhibition of ATP synthesis in primary cultures in chick (Kölker et al., 2002) and in rat tissues (Latini et al., 2005) as well as disturbed intracellular calcium homeostasis (Kölker et al., 2002). Besides, D-2-HG promotes the generation of reactive oxygen species disturbing redox homeostasis and contributes to excitotoxicity in cerebral cortex of rats (Kölker et al., 2002; Latini et al., 2003; da Rosa et al., 2014; Preissler et al., 2016). On the other hand, L-2-HG inhibits mitochondrial creatine kinase activity (da Silva et al., 2003) and provokes oxidative stress in an *in vivo* animal model (da Rosa et al., 2015).

Oxidative stress is involved in various common neurodegenerative diseases and in some IEM (Wajner et al., 2004; Sitta et al., 2014; Preissler et al., 2016). Besides that, it is well known that free radicals may cause DNA damage. The hydroxyl radical is the harmful reactive oxygen species, which can induce a variety of lesions in DNA, including single-strand breaks (SSBs), double-strand breaks (DSBs), alkali labile sites, various species of oxidized purines and pyrimidines and formation of cross-links between DNA and proteins (Halliwell and Gutteridge, 2007), leading to deleterious consequences if the cellular repair mechanisms fail (Marnett, 2000; Cooke et al., 2006). In this scenario, in this work we aimed to investigate whether D-2-HG and L-2-HG induces *in vitro* DNA damage in blood leukocytes determined by the comet assay, as well as the role of LC upon DNA damage provoked by these metabolites. We also measured some oxidative stress parameters in urine from L-2-HGA patients.

We initially found that 50 μ M of D-2-HG and 30 μ M of L-2-HG significantly increased DNA migration in the leukocytes, indicating DNA damage, as compared to controls. It is especially relevant the effect induced by L-2-HG because increasing evidence suggests that patients with this disease have a predisposition to brain tumors (Patay et al., 2012, 2015), it is important to emphasize that permanent changes in the genetic material resulting from oxidative modifications represent the first step involved in mutagenesis, carcinogenesis and aging (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Patay et al (2012) published that various patients affected by L-2HGA develop brain tumors. In this context, among the 11 L-2-HGA patients studied, 3 of them developed neoplasms during the course of disease: one patient was diagnosed with a right hippocampal anaplastic astrocytoma, a second one was diagnosed with a right frontal oligodendroglioma and the third case was diagnosed with a left thalamic low-grade glioma. A review from a much larger number of patients (295 cases with the L-isomer variant of 2-hydroxyglutaric

including the 11 patients described above) revealed that 14 patients developed cerebral neoplasms (almost 5%). Another study that included 18 patients with this disorder showed 7 cases with cerebral neoplasms, showing that the prevalence of cerebral tumor can reach up to 40% (Moroni et al., 2004; Patay et al., 2012). These data may support an oncogenic role due to sustained exposure to L-2-HG in brain tissue. Recently, some studies have found that 80% of gliomas of WHO grade II/III and secondary glioblastomas harbor isocitrate dehydrogenase I (IDH1) mutation and induces a gain of function promoting the conversion of isocitrate to 2-hydroxyglutaric acid (2-HG). However, the oncogenic and myelinotoxic mechanism induced by accumulation of 2-HG in L-2-HGA has been not yet elucidated (Patay et al., 2015).

The comet alkaline assay is a relatively simple, rapid, low-cost, and sensitive technique for strand break detection in individual cells (Liao et al., 2009), although it is not able to discriminate among the precise mechanisms of DNA damage. In previous studies, it was observed that L-2HG and D-2HG can induce free radical production leading to protein and lipid oxidation (Latini et al., 2003; Jellouli et al., 2014; da Rosa et al., 2014, 2015). We verified in the present work a significant increase in guanine oxidized species (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-hydroxyguanosine and 8-hydroxyguanine) in urine samples from L-2-HGA patients compared to normal age matched individuals, demonstrating oxidative DNA damage in these patients.

Guanine is the base that is most prone to oxidation. In recent years it has become clear that both DNA and RNA can be damaged by oxidation in various diseases and that the repair processes that are initiated to correct this damage release multiple oxidized species into the urine (Shi et al., 2012). Oxidative DNA damage occurs as a result of the attack of reactive oxygen species to both nuclear and mitochondrial DNA generating especially an oxidized form of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ((Halliwell and Gutteridge, 2007). In this

context, serum and urinary 8-OHdG reflect the equilibrium between its production and repair of both DNA and the nucleotide pool (Cooke et al., 2006).

Oxidative damage to nucleic acid has been found with a variety of pathologies including cancer, neurodegenerative diseases and EIM (Roszkowski et al., 2011). In this scenario, it has been described high urinary concentrations of 8-OHdG in phenylketonuric patients, an inborn error of phenylalanine metabolism, associated with oxidative damage, as well as a positive significant correlation between phenylalanine that accumulates in this disease and 8-OHdG levels (Deon et al., 2015). Thus, in this study we demonstrated an increase of oxidized guanine species in the L-2-HGA patients corroborating our *in vitro* findings (by comet assay) and reinforcing the involvement of reactive oxygen species in this disease and that these species may potentially cause oxidative modifications in DNA bases. Besides that, if these findings are confirmed in cerebrospinal fluid of patients with D-2-HGA and L-2-HGA, it would explain, at least in part, the pathophysiology of the diseases.

It is of note that oxidative stress can result in cell harm, such as oxidative damage to membrane phospholipids, proteins and DNA, eventually culminating in cell death (Halliwell and Gutteridge, 2007). In order to verify whether LC could be able to reduce DNA damage induced by D-2-HG and L-2-HG, we performed *in vitro* comet assay associating 30 and 150 μ M of LC to D-2-HG and L-2-HG. Our results showed that LC was able to significantly reduce the levels of DNA migration, especially at the higher concentration, for both metabolites studied. In this sense, LC seems to have an important role in the prevention of this process.

LC is a water soluble molecule of mammalian metabolism that plays an important role in normal mitochondrial oxidation of fatty acids (Walter et al., 1996). Several studies have demonstrated its protective effect against oxidative injury, especially due to its capacity to scavenge hydrogen peroxide and superoxide radical and also chelate transition metal ions

(Gülçin, 2006). It is known that brain is highly susceptible to reactive species attack due to high oxygen consumption and low levels of antioxidant defenses. In this way, oxidative stress could contribute to the pathophysiology of many inherited neurometabolic disorders (Halliwell, 2006). Moreover, LC has been reported to exhibit protective properties reducing DNA damage and accelerating the disappearance of SSBs induced by oxygen radicals and alkylating agents, due its capacity scavenge, trigger the repair enzyme poly(ADP-ribose)polymerase and other repair mechanism, and enhance energy production by cells (Boerrigter et al., 1993; Garcia et al., 2006). LC was also able to reduce lipid peroxidation and protein oxidation in phenylketonuria (Sitta et al., 2011) and maple syrup urine disease (Meska et al., 2014, 2015 a,b) well as to decrease DNA damage induced by propionic and methylmalonic acid (Ribas et al., 2010). Besides, patients with 3-hydroxy-3-methyl- glutaric aciduria treated with LC had a reversal of lipid peroxidation (dos Santos et al., 2015). Lastly, there are several studies, including clinical trials, showing antioxidant properties of LC in several pathologies. LC supplementation has been considered safe which makes it a promising candidate for prevention and treatment of oxidative alterations in many diseases (Ribas et al., 2014).

In this study we also evaluated some oxidative and nitrate stress parameters in urine of L-2-HGA patients. We verified significantly increase of urinary di-tyr levels in L-2-HGA patients compared to control group. This marker of protein oxidative damage is formed by oxidation of tyrosine residues leading to the formation of a highly stable inter-phenolic bond that can lead to malfunction of enzymes, receptors and transport proteins, finally resulting in alterations of cellular metabolism (Kirschbaum, 2002; Halliwell and Gutteridge, 2007). Regarding to isoprostanes levels in urine, a biomarker of lipid peroxidation, it was observed a mild nonsignificant increase of this parameter in urine of L-2-HGA patients. Lastly, we also

found a mild nonsignificant increase of urinary nitrate and nitrite levels, implying no major involvement of reactive nitrogen species in these patients.

In summary, our results demonstrated, to the best of our knowledge for the first time, that D-2-HG and L-2-HG acids induce *in vitro* DNA damage and LC has an *in vitro* protective effect upon this damage. Another novel and important finding of the present study indicates that oxidative damage to DNA and proteins occurs in L-2-HGA patients. It is tempting to speculate that LC could be used in L-2-HGA patients as a potential adjuvant therapy to prevent or attenuate oxidative damage. However, further *in vivo* studies are necessary to clarify this issue since we have used urine samples only.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* and *Fundo de Incentivo à Pesquisa/ Hospital de Clínicas de Porto Alegre FIPE/HCPA - Brazil*

References

Balaji P, Viswanathan V, Chellathurai A, Panigrahi D (2014) An interesting case of metabolic dystonia: L-2-hydroxyglutaric aciduria. *Ann Indian Acad Neurol* 17:97-99

Barschak AG, Sitta A, Deon M et al (2006) Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 21:279-286

Boerrigter ME, Franceschi C, Arrigoni-Martelli E et al (1993) The effect of L-carnitine and acetyl-l-carnitine on the disappearance of DNA single-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 14:2131–2136

Chalmers RA, Lawson AM, Watts RWE et al (1980) D-2-hydroxyglutaric aciduria: case report and biochemical studies. *J Inherit Metab Dis* 3:11-15

Cooke MS, Olinski R, Evans MD (2006) Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance?. *Clin Chim Acta* 365:30-49

da Rosa MS, Seminotti B, Amaral AU et al (2014) Disruption of redox homeostasis and histopathological alterations caused by *in vivo* intrastriatal administration of D-2-hydroxyglutaric acid to young rats. *Neuroscience* 277:281-293

da Rosa MS, Ribeiro CAJ, Seminotti B et al (2015) *In vivo* intracerebral administration of L-2-hydroxyglutaric acid provokes oxidative stress and histopathological alterations in striatum and cerebellum of adolescent rats. *Free Radic Biol Med* 83:201-2013

dos Santos Mello M, Ribas GS, Wayhs CA et al (2015) Increased oxidative stress in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Mol Cell Biochem* 402:149-155

da Silva CG, Bueno ARF, Schuck PF et al (2003) L-2-hydroxyglutaric acid inhibits mitochondrial creatine kinase activity from cerebellum of developing rats. *Int J Dev Neurosci* 21:217-224

Deon M, Landgraf SS, lamberty JF et al (2015) Protective effect of L-carnitine on phenylalanine-induced DNA damage. *Metab Brain Dis* 30:925-933

Duran M, Kamerling JP, Bakker HD et al (1980) L-2-hydroxyglutaric aciduria: an inborn error of metabolism?. *J Inherit Metab Dis* 3:109-112

Filippon L, Wayhs CA, Atik DM et al (2011) DNA damage in leukocytes from pretreatment mucopolysaccharidosis type II patients; protective effect of enzyme replacement therapy. *Mutat Res* 721:206-210

Garcia CL, Filippi S, Mosesso P et al (2006) The protective effect of L-carnitine in peripheral blood human lymphocytes exposed to oxidative agents. *Mutagenesis* 21:21–27

Gibson KM, Ten Brink HJ, D.S. Schor DS et al (1993) Stable-isotope dilution analysis of D- and L-2-hydroxyglutaric acid: application to the detection and prenatal diagnosis of D- and L-2-hydroxyglutaric acidemias. *Pediatr Res* 34:277-280

Gülçin I (2006) Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci* 78:803-811

Halilolu G, Jobard F, Oguz KK et al (2008) L-2-hydroxyglutaric aciduria and brain tumors in children with mutations in the L2HGDH gene: neuroimaging findings. *Neuropediatrics* 39:119-122

Halliwell B and Gutteridge MC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed, Oxford University Press Inc, New York

Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685-716

Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *J Neurochem* 97:1634-1658

Hartmann A, Agurell E, Beevers C et al (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis* 18:45–51

Jovic NJ, Kosac A, Koprivsek K (2014) L-2-hydroxyglutaric aciduria: a case report. *Srp Arh Celok Lek* 142:337-341

Jellouli NK, Hadj Salem I, Ellouz E et al (2014) Founder effect confirmation of c.241A > G mutation in the L2HGDH gene and characterization of oxidative stress parameters in six Tunisian families with L-2-hydroxyglutaric aciduria. *J Hum Genet* 59:216-222

Kirschbaum B (2002) Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicators. Clin Nephrol 58:344-349

Kölker S, Pawlak V, Ahlemeyer B et al (2002) NMDA receptor activation and respiratory chain complex V inhibition contribute to neurodegeneration in D-2-hydroxyglutaric aciduria. Eur J Neurosci 16:21-28

Kranendijk M, Struys EA, Gibson KM et al (2010a) Evidence for genetic heterogeneity in D-2-hydroxyglutaric aciduria. Hum Mutat. 31:279-283

Kranendijk M, Salomons GS, Gibson KM et al (2011) A lymphoblast model for IDH2 gain-of-function activity in D-2-hydroxyglutaric aciduria type II: novel avenues for biochemical and therapeutic studies. Biochim Biophys Acta 1812:1380-1384

Kranendijk M, Struys EA, Salomons GS, Van der Knaap MS, Jakobs C (2012) Progress in understanding 2-hydroxyglutaric acidurias. J Inherit Metab Dis 35 (4):571-587

Latini A, Scussiato K, Rosa RB et al (2003) D-2-hydroxyglutaric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. Eur J Neurosci 17:2017-2022

Latini A, Da Silva CG, Ferreira GC et al (2005) Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. Mol Genet Metab 86:188-199

Liao W, McNut MA, Zhu WG (2009) The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. Methods 48:46-53

Marcel C, Mallaret M, Lagha-Boukbiza O et al (2012) L-2-hydroxyglutaric aciduria diagnosed in a young adult with progressive cerebellar ataxia and facial dyskinesia. *Rev Neurol (Paris)* 168: 187-191

Marchetti DP, Donida B, Da Rosa HT et al (2015) Protective effect of antioxidants on DNA damage in leukocytes from X-linked adrenoleukodystrophy patients. *Int J Dev Neurosci* 43:8-15

Marnett LJ (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21:361-370

Meska CP, Wayhs CA, Guerreiro G et al (2014) Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro. *Gene* 548:294-298

Meska CP, Guerreiro G, Hammerschmidt T et al (2015a) L- carnitine supplementation decreases DNA damage in treated MSUD patients. *Mutat Res* 775:43-47

Meska CP, Rosa AP, Schirmbeck G et al (2015b) L-carnitine prevents oxidative stress in the brains of rats subjected to a chemically induced chronic model of MSUD. *Mol Neurobiol* doi:10.1007/s12035-015-9500-z

Moroni I, Bugiani M, D'Incerti L et al (2004) L-2-hydroxyglutaric aciduria and brain malignant tumors: a predisposing condition?. *Neurology* 62:1882-1884

Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 49:1183-1186

Negretto GW, Deon M, Burin M et al (2014) In vitro effect of genistein on DNA damage in leukocytes from mucopolysaccharidosis IVA patients. *Mol Genet Metab* 111:205-208

Patay Z, Mills JC, Löbel U et al (2012) A. Lambert, A. Sablauer, D.W. Ellison, Cerebral neoplasms in L-2-hydroxyglutaric aciduria: 3 new cases and meta-analysis of literature data. *AJNR Am J Neuroradiol* 33:940-943

Patay Z, Orr BA, Shulkin BL et al (2015) Successive distinct high-grade gliomas in L-2-hydroxyglutaric aciduria. *J Inherit Metab Dis* 38:273-277

Preissler T, Bristot IJ, Costa BM et al (2016) Phenylalanine induces oxidative stress and decreases the viability of rat astrocytes: possible relevance for the pathophysiology of neurodegeneration in phenylketonuria. *Metab Brain Dis* 31:529-537

Ribas GS, Manfredini V, De Marco MG et al (2010) Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. *Mutat Res* 702:123-128

Ribas GS, Manfredini V, De Mari JF et al (2010) Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int J Dev Neurosci* 28:127-132

Ribas GS, Vargas CR, Wajner M (2014) L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene* 533: 469-476.

Roszkowski K, Jozwicki W, Blaszczyk P et al (2011) Oxidative damage DNA: 8-oxoGua and 8-oxodG as molecular markers of cancer. *Med Sci Monit* 17:CR329-333

Shi F, Nie B, Gan W et al (2012) Oxidative damage of DNA, RNA and their metabolites in leukocytes, plasma and urine of *Macaca mulatta*: 8-oxoguanosine in urine is a useful marker for aging. *Free Radic Res* 46:1093-1098

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191

Sitta A, Vanzin CS, Biancini GB et al (2011) Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol* 31:429-436

Sitta A, Ribas GS, Meska CP et al (2014) Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. *Cell Mol Neurobiol* 34:157-165

Struys EA, Jansen EE, Verhoeven NM, Jakobs C (2004) Measurement of urinary D-and L-2-hydroxyglutarate enantiomers by stable-isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry after derivatization with diacetyl-L-tartaric anhydride. *Clin Chem* 50:1391-1395

Struys EA, Korman SH, Salomons GS et al (2005a) Mutations in phenotypically mild D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Ann Neurol* 58:626-630

Struys EA, Salomons GS, Achouri Y et al (2005b) Mutations in the D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene cause D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Am J Hum Genet* 76:358-360

Tice RR, Agurell E, Anderson D et al (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–221

Topçu M, Aydın OF, Yalçinkaya C et al (2005) L-2-hydroxyglutaric aciduria: a report of 29 patients. *Turk J pediatr* 47:1-7

Van der Knaap MS, Jakobs C, Hoffmann GF et al (1999a) D-2-hydroxyglutaric aciduria: further clinical delineation. *J Inherit Metab Dis.* 22:404-413

Van der Knaap MS, Jakobs C, Hoffmann GF et al (1999b) D-2-hydroxyglutaric aciduria: biochemical marker or clinical disease entity?. *Ann Neurol* 45:111-119

Yilmaz K (2009) Riboflavin treatment in a case with L-2-hydroxyglutaric aciduria. *Eur J Paediatr Neurol* 13:57-60

Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS (2004) The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 27:427-448

Wajner M, Coelho DM, Ingrassia R et al (2009) Selective screening for organic acidemias by urine organic acid GC–MS analysis in Brazil: Fifteen-year experience. *Clin Chim Acta* 400:77-81

Wajner M, Goodman SI (2011) Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies. *J Bioenerg Biomembr* 43:31-38

Walter JH (1996) L-Carnitine. *Arch Dis Child* 74:475-478

Table 1

Urinary D-2-HG and L-2-HG levels analyzed by LC-MS/MS

Patient Sample	Creatinine mmol/L	L-2-HG μmol/L	L-2-HG mmol/mol creat	D-2-HG μmol/L	D-2-HG mmol/mol creat
1	14.4	6780	471	nd	-
2	4.3	2021	470	nd	-
3	12.3	2958	240	nd	-
4	11.2	5254	469	nd	-
5	7.4	2102	284	nd	-
6	15.5	4534	293	nd	-
7	22.2	6822	307	nd	-
8	14.2	3508	247	nd	-
9	18.4	3771	205	nd	-
10	22.2	2691	121	nd	-
11	7.0	2708	387	nd	-

nd: not detected

Figure 1: *In vitro* effect of 50 μ M of D-2-HG on DNA damage (comet assay) in leukocytes from whole blood. Data represent median (min; max) of six independent experiments $**p < 0.01$ compared to the control group (Mann-Whitney).

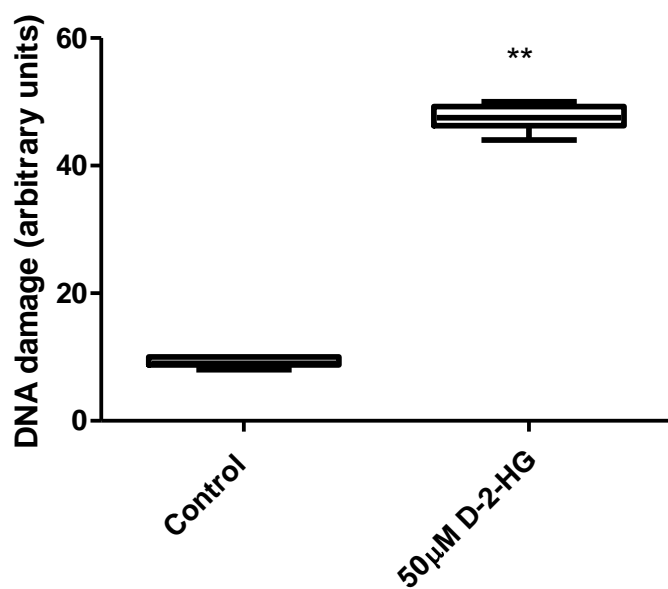


Figure 2: *In vitro* effect of 30 μ M of L-2-HG on DNA damage (comet assay) in leukocytes from whole blood. Data represent median (min; max) of six independent experiments. ** $p < 0.01$ compared to the control group (Mann-Whitney).

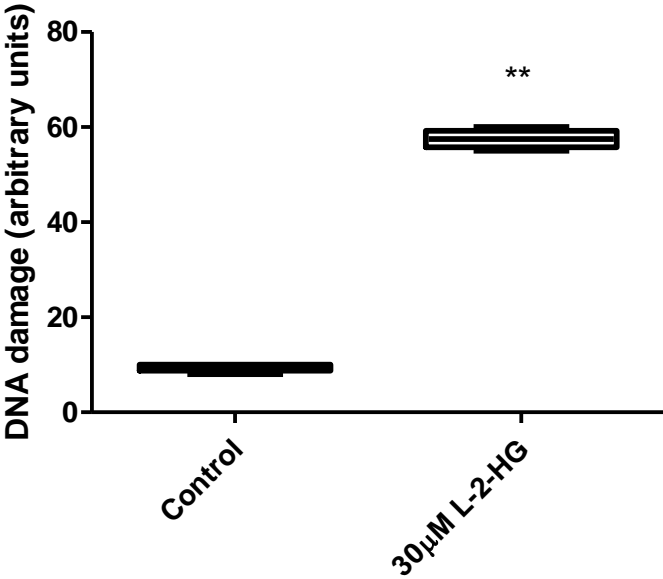


Figure 3: *In vitro* effect of 30 and 150 μM of L-carnitine (LC) on DNA damage induced by 50 μM of D-2-HG in leukocytes from whole blood. Data represent median (min; max) of six independent experiments (individuals). (a) $p < 0.01$ compared to the control group; (b) $p < 0.05$ compared to the 50 μM D-2-HG group; (c) $p < 0.05$, compared to the 50 μM D-2-HG/30 μM LC group (Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U-test).

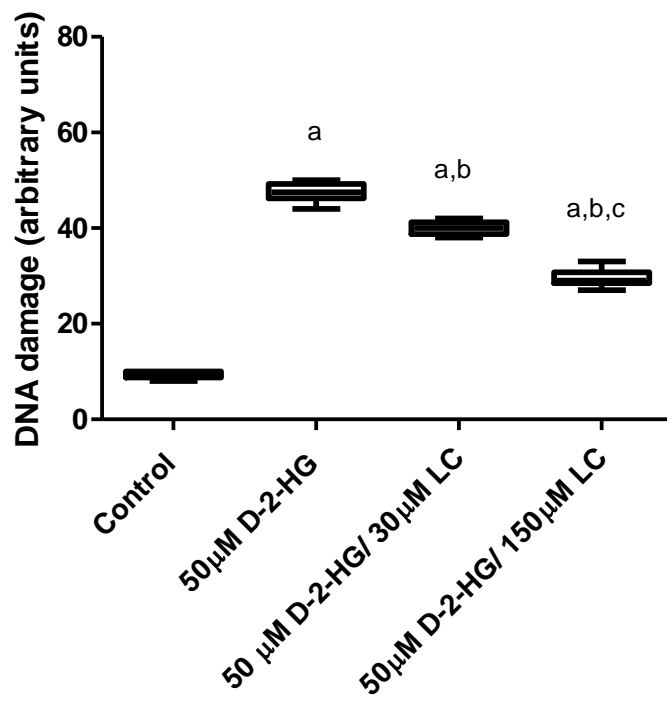


Figure 4: *In vitro* effect of 30 and 150 μM of L-carnitine (LC) on DNA damage induced by 30 μM of L-2-HG in leukocytes from whole blood. Data represent median (min; max) of six independent experiments (individuals). (a) $p < 0.01$ compared to the control group; (b) $p < 0.05$ compared to the 30 μM L-2-HG group; (c) $p < 0.05$, compared to the 30 μM L-2-HG/30 μM LC group (Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U-test).

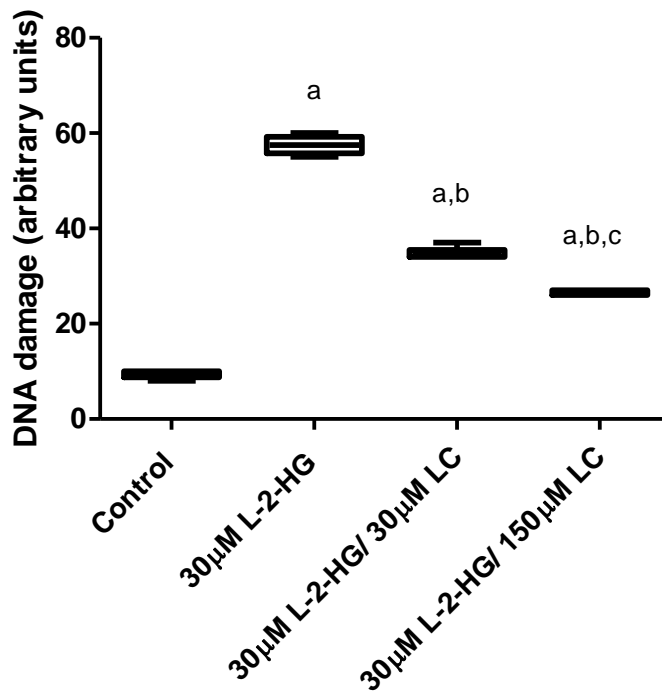


Figure 5: DNA/RNA oxidative damage (urinary oxidized guanine species) of patients with L-2-HGA (n= 11) and controls (n=10). Data represent median (min; max). * $p < 0.05$ compared to the control group (nonparametric Mann-Whitney test).

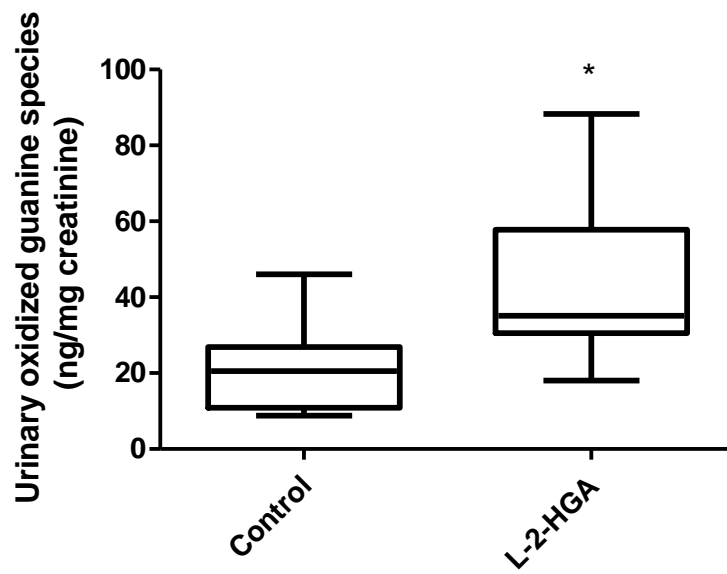


Figure 6: Protein oxidative damage (urinary di-tyrosine) in patients with L-2-HGA (n= 11) and controls (n=10). Data represent median (min; max). * $p < 0.05$ compared to the control group (nonparametric Mann-Whitney test).

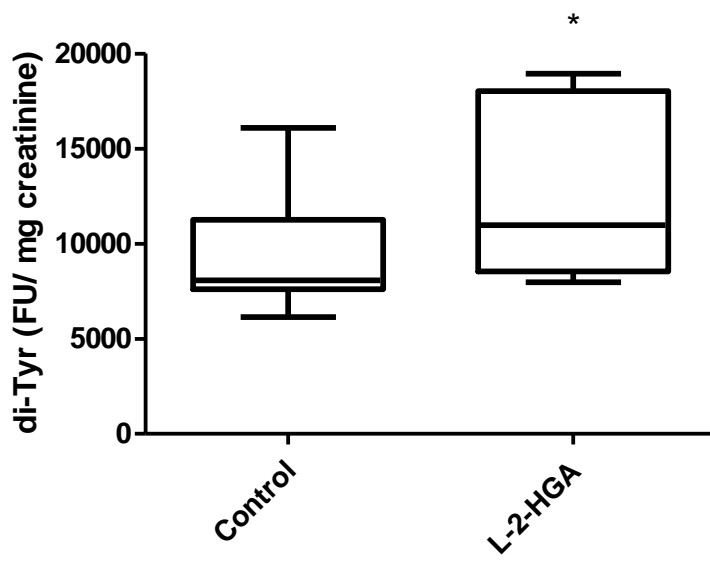


Figure 7: Lipid oxidative damage (urinary 15-F2t-isoprostane) in patients with L-2-HGA (n= 11) and controls (n=10). Data represent median (min; max), $p>0.05$ compared to the control group (nonparametric Mann-Whitney test).

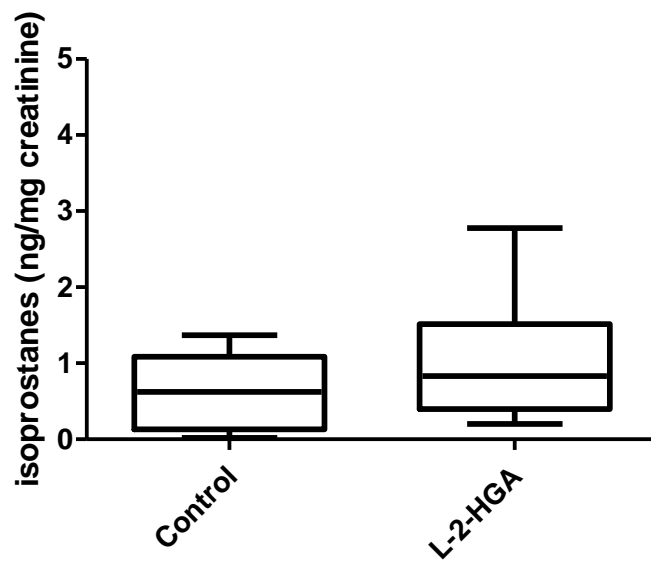
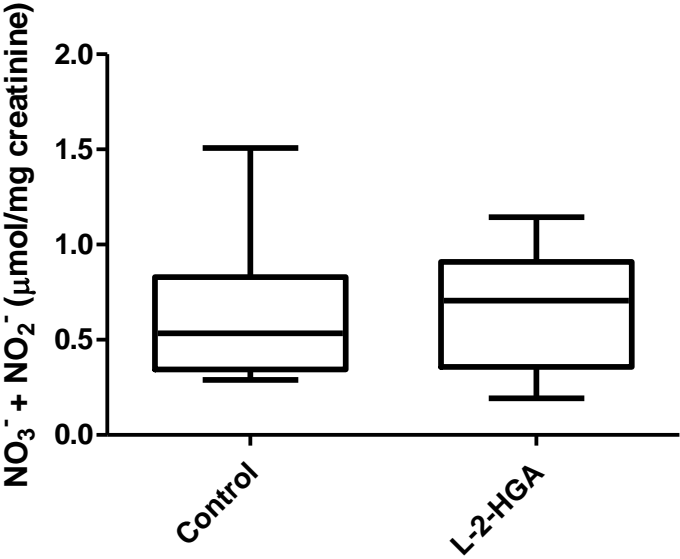


Figure 8: Reactive nitrogen species (urinary nitrate + nitrite content) in patients with L-2-HGA (n= 11) and controls (n=10). Data represent median (min; max), $p > 0.05$ compared to the control group (nonparametric Mann-Whitney test).



4. DISCUSSÃO GERAL

As doenças neurometabólicas hereditárias D-2-HGA e L-2-HGA são marcadas bioquimicamente por acúmulo tecidual e nos fluidos biológicos de altas concentrações dos ácidos D-2-HG e L-2-HG, respectivamente (Kranendijk et al., 2010). Essas acidemias, embora distintas entre si, são marcadas por comprometimento cerebral em regiões vulneráveis, entretanto na acidemia D-2-HGA ainda estão presentes sintomas cardiomusculares (Kranendijk et al., 2012). As D-2-HGA, tipo I e tipo II, compartilham algumas características clínicas, tais como: atraso no desenvolvimento, hipotonia e convulsões. Além disso, há evidências de que a severidade da doença está correlacionada aos níveis do metabólito no plasma, sugerindo, desta forma, que o metabólito D-2-HG contribui para a fisiopatologia da doença associada aos sinais clínicos (Kranendijk et al., 2012). A L-2-HGA tem início na infância manifestando-se com atraso no desenvolvimento, epilepsia e ataxia cerebelar, no entanto, ainda não foi demonstrada correlação entre os níveis do metabólito e a severidade da doença (Steenweg et al., 2010). Essa acidemia é bastante peculiar, pois se têm sugerido que o metabólito L-2-HG teria envolvimento na oncogênese, devido ao desenvolvimento de tumores cerebrais por alguns pacientes portadores da doença (Moroni et al., 2004).

Ao longo dos últimos anos, alguns trabalhos têm demonstrado o papel patogênico dos metabólitos D-2-HG e L-2-HG *in vitro* e *in vivo*. Kölker et al (2002) demonstraram, em cultura neuronal primária de pintos e ratos, que o acúmulo endógeno do metabólito D-2-HG, que é estruturalmente similar ao aminoácido excitatório glutamato, contribui para a neurodegeneração por ativação do receptor de N-metil-D-aspartato e inibição do complexo V da cadeia respiratória mitocondrial, além disso prejudica a homeostase do metabolismo cerebral por inibição da atividade da creatina quinase em córtex cerebral de ratos (da Silva et al., 2004). Latini et al (2005) realizaram um estudo no qual foi verificado o efeito do ácido D-2-HG na atividade do complexo de enzimas da cadeia respiratória no músculo cardíaco, esquelético e cerebral de ratos jovens. Foi observado que o D-2-HG inibe fortemente a atividade do complexo IV e, em menor extensão, o complexo V da cadeia respiratória no músculo esquelético e cardíaco. O L-2-HG não alterou nenhuma dessas atividades enzimáticas estudadas. Nas preparações mitocondriais de cérebro de ratos, foram observados que ambos os metabólitos estimulam o consumo de O₂ no estado IV e comprometem a formação de ATP, agindo

desta maneira como desacopladores endógenos da respiração mitocondrial, prejudicando assim o metabolismo energético. Além disso, o D-2-HG provoca estresse oxidativo e alterações histopatológicas em cérebro de ratos (Latini et al 2003; da Rosa et al., 2014). No que se refere ao enantiômero L-2-HG, foi observado que este provoca estresse oxidativo e alterações histopatológicas no estriado e em cerebelo de ratos (da Rosa et al., 2015) e contribui para o estresse oxidativo em pacientes com L-2-HGA (Jellouli et al., 2014).

Inúmeros estudos têm investigado o papel do estresse oxidativo na patogênese de EIM. O acúmulo de metabólitos tóxicos nessas doenças tem sido apontado como o principal responsável pela produção de radicais livres (Sitta et al., 2009; Ribas et al., 2010; Leipnitz et al., 2015). Além disso, sabe-se que radicais livres podem causar dano ao DNA por interação com metais de transição gerando diversas classes de produtos, como por exemplo, quebras em fita simples ou duplas, ligações cruzadas entre filamentos, ligações entre proteínas e DNA e produtos de fragmentação de açúcar. Dessa maneira, consequências deletérias podem ocorrer caso o mecanismo de reparo celular falhe (Marnett et al., 2000; Cooke et al., 2006). Neste contexto, investigamos o dano ao DNA *in vitro*, por ensaio cometa, provocado pelos ácidos enantioméricos D-2-HG e L-2-HG, bem como avaliamos parâmetros de estresse oxidativo e nitrativo na urina de pacientes afetados por L-2-HGA.

Com relação ao dano ao DNA, foi verificado que os metabólitos D-2-HG (50 μ M) e L-2-HG (30 μ M) causaram *in vitro* um aumento significativo de migração de DNA em leucócitos quando comparado aos controles. Esse resultado, é especialmente relevante para o metabólito L-2-HG, visto o crescente número de evidências que sugerem que pacientes com L-2-HGA tem predisposição a tumores cerebrais, com um risco estimado de 5% a 40% (Patay et al., 2012). Dano ao DNA é frequentemente observado em células submetidas ao estresse oxidativo podendo culminar em mutações, microsatélites, aberrações cromossômicas e crescimentos neoplásicos. Dessa forma, é importante enfatizar que mudanças permanentes no material genético resultante de modificações oxidativas representam o primeiro passo envolvido na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (Halliwell e Gutteridge, 2007). Para verificar o dano ao DNA, usamos uma técnica amplamente utilizada,

conhecida como ensaio cometa. O ensaio cometa é uma técnica relativamente simples, rápida e de baixo custo. A técnica permite avaliar dano ao DNA em células individuais sob condições alcalinas na qual ocorre desnaturação do DNA onde é possível avaliar quebra de fita simples e dupla e sítios álcali-lábeis (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000). No estudo *in vitro*, os leucócitos individualizados após incubação com os metabólitos, são misturados a agarose e espalhados sobre uma lâmina e submetidos à corrente elétrica. Dessa forma ocorre migração dos segmentos de DNA livres para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células são coradas e posteriormente analisadas em microscópio. A análise é feita contando-se 100 leucócitos da amostra biológica, e cada célula é classificada por um escore que varia de 0 (sem dano) à 4 (dano máximo) de acordo com o tamanho da cauda (Tice et al., 2000). Apesar da sensibilidade da técnica, a mesma não é capaz de discriminar se a causa do dano é oxidativa. Entretanto, alguns estudos na literatura mostram o envolvimento do estresse oxidativo nessas duas acidemias (da Rosa et al., 2014; Jellouli et al., 2014; da Rosa et al., 2015). Ainda, após investigar a capacidade dos ácidos D-2-HG e L-2-HG induzirem dano ao DNA, testou-se *in vitro* o efeito antioxidante da LC em duas concentrações (30 μ M e 150 μ M) sobre este dano. Verificou-se que a LC nas duas concentrações testadas, diminuem significativamente o dano ao DNA provocado pelos ácidos, sendo que na concentração de 150 μ M houve maior atenuação do dano. Cabe salientar que as concentrações testadas para os ácidos D-2-HG (50 μ M) e L-2-HG (30 μ M) foram baseadas nas concentrações plasmáticas encontradas nos pacientes (Gibson et al., 1993). As concentrações de LC foram baseadas em resultados prévios obtidos de estudos em pacientes afetados por acidúrias orgânicas e tratados com 100 mg/Kg/dia de LC, onde os níveis plasmáticos desse composto variam de 30 μ M ao diagnóstico a 100 μ M durante a suplementação com LC (Ribas et al., 2010a).

LC é uma molécula solúvel em água que desempenha importante função celular no metabolismo mitocondrial, atuando como mediadora no transporte de ácidos graxos de cadeia longa para β -oxidação e produção de ATP (Walter et al., 1996). Além disso, nos últimos anos inúmeros estudos têm demonstrado o efeito protetor da LC contra o dano oxidativo em importantes doenças neurodegenerativas como Doenças de Parkinson e de Alzheimer (Beal, 2003; Abdul and Butterfield, 2007). Sabe-se também

que o acúmulo de metabólitos tóxicos, como o que ocorre em doenças neurometabólicas hereditárias, podem levar a disfunção mitocondrial e aumento de ERO e tem como consequência o estresse oxidativo. Neste contexto, tem sido amplamente estudado o papel antioxidante da LC (Wajner et al; 2004; Ribas et al., 2014a, b).

Nas doenças neurometabólicas D-2-HGA e L-2-HGA a LC poderia ter um efeito benéfico devido a sua capacidade protetora contra o dano oxidativo, especialmente em sua ação como “scavenger” de radical superóxido e peróxido de hidrogênio e também como quelante de metais de transição, pois se sabe que o tecido cerebral é altamente suscetível ao ataque de espécies reativas devido ao alto consumo de oxigênio e baixos níveis de defesas antioxidantes (Gulçin, 2006). Ainda, tem sido demonstrado que a LC acelera o desaparecimento de quebras de fitas simples induzida por radicais do oxigênio e agentes alquilantes (Boerrigter et al., 1993) e exibe propriedades de redução de dano ao DNA *in vitro* provocado por metabólitos tóxicos acumulados em alguns EIM. Por exemplo, nas acidemias propiônica e metilmalônica a LC reduziu o dano ao DNA *in vitro* induzido pelo ácido metilmalônico (5mM) nas doses de 60, 90, 120 e 150 µM de LC bem como o dano induzido pelo ácido propiônico (5mM) nas doses de 90, 120 e 150 µM de LC (Ribas et al., 2010). Em pacientes PKU, a LC foi administrada adicionada à fórmula de aminoácidos restrita em Phe, e houve redução da lipoperoxidação e da oxidação proteica (Sitta et al., 2011). Além disso, foi observado que a LC, em concentrações que variaram de 15 a 150 µM, reduziram o dano ao DNA *in vitro* induzido pela Phe (1000 and 2500 µM). Outro resultado que destaca o papel antioxidante da LC, foi demonstrado por Mescka et al (2013). Os autores verificaram que pacientes com MSUD, suplementados com 50 mg/Kg/dia de LC, tiveram uma redução de oxidação lipídica durante tratamento com dieta de restrição proteica. Além disso, foi observado que concentrações de 90 a 150 µM de LC reduziram o dano ao DNA *in vitro* induzido por metabólitos acumulados na MSUD (Mescka et al 2014). Corroborando com este estudo, pacientes portadores de MSUD tratados e suplementados com LC (50 mg/Kg/dia) tiveram uma redução significativa de dano ao DNA *in vivo* (Meska et al., 2015). Em pacientes portadores de acidemia 3-hidroxi-3-

metil-glutárica, suplementados com LC (100 mg/kg/dia), houve uma reversão da peroxidação lipídica (dos Santos et al., 2015).

Ao longo dos últimos anos, têm sido investigado o envolvimento dos ácidos D-2-HG e L-2-HG no estresse oxidativo. Nesse contexto, Latini et al (2003) investigaram o efeito *in vitro* do D-2-HG, em concentrações usualmente encontradas no plasma e fluido cérebro-espinhal de pacientes D-2-HGA, sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em ratos jovens. Foi observado que o D-2-HG aumentou significativamente a quimiluminescência, que é a emissão de luz espontânea principalmente por lipídeos peroxidados devido ao aumento da produção de ERO ou ERN e aumentou significativamente a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), que reflete a formação de malondialdeído, um produto final da peroxidação de ácidos graxos de membrana (Halliwell e Gutteridge, 2001). Foi demonstrado também que o ácido ascórbico e α -tocoferol, “scavengers” de RL preveniram completamente o aumento de TBA-RS induzido pelo D-2-HG. Ainda, o N-nitro-L-arginina -metil -éster (L-NAME), um inibidor da oxido nítrico sintase, atenuou o aumento de TBA-RS sugerindo, desta forma, o envolvimento de ERN. Nessa linha de pesquisa, da Rosa et al (2014) realizaram um estudo em modelo animal. Após administração aguda intraestriatal do ácido D-2-HG foi possível observar que houve um aumento significativo dos níveis de MDA e formação de carbonilas, o que sugere dano oxidativo a lipídeos e a proteínas, respectivamente. Ainda, outros parâmetros foram avaliados no intuito de verificar quais espécies poderiam estar envolvidas no dano. Foi observado que a administração do D-2-HG aumentou significativamente a produção de nitratos e nitritos, no entanto não alterou a oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) e produção de H₂O₂. Esses últimos parâmetros sugerem o envolvimento de ERN, tendo em vista que a DCFH detecta predominantemente ERO. Outro dado importante deste trabalho é o fato de que o D-2-HG também prejudica as defesas antioxidantes no estriado, como a GSH e a atividade das enzimas GPx e SOD que apresentaram uma redução significativa. Além disso, nesse estudo foi possível sugerir que a ativação dos receptores NMDA pode ser um dos mecanismos pelo qual o D-2-HG induz pelo menos algumas alterações do estado redox, pois o MK-801, que é um antagonista não competitivo do receptor glutamatérgico NMDA e o L-NAME, que é

inibidor da enzima óxido nítrico sintase inibiram totalmente os efeitos do D-2-HG. Além desses achados, também foram observadas alterações histopatológicas importantes, como vacuolização, infiltrado linfocítico e macrófágico, sugerindo que o estado pró-oxidante possa ter contribuído para o dano.

Em nosso estudo, também avaliamos o dano oxidativo a proteínas e a lipídeos, bem como o dano nitrativo na urina de pacientes com L-2-HGA. Além disso, foi investigado o dano oxidativo ao DNA na urina dos pacientes através da medida de espécies de guanina oxidadas. As amostras de urina foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS/MS) confirmando o diagnóstico de L-2-HGA em todos os pacientes estudados.

Neste estudo, verificou-se que os níveis de di-tyr urinários nos pacientes L-2-HGA estavam significativamente aumentados em relação ao grupo controle. Ainda, observou-se uma tendência de aumento dos isoprostanos, um biomarcador de dano oxidativo a lipídeos, na urina dos pacientes L-2-HGA. A di-tyr, marcadora de dano oxidativo a proteínas, é formada por oxidação de resíduos de tirosina e leva a formação de ligações inter-fenólicas altamente estáveis, o que pode acarretar em prejuízo na função de enzimas, receptores e transportadores proteicos, resultando em alterações do metabolismo celular (Kirschbaum et al., 2002; Halliwell e Gutteridge, 2007). Entretanto, nossos resultados mostram que os níveis de nitrato e nitrito não estavam alterados na urina dos pacientes L-2-HGA, comparativamente aos controles, o que sugere o não envolvimento de ERN na fisiopatologia desta doença. Corroborando com nossos achados, da Rosa et al (2015) investigaram o efeito da administração aguda do L-2-HG na homeostase redox em cérebro de ratos (estriado e cerebelo). Foi observado um aumento de ERO, através da medida da oxidação da DCFH e H₂O₂ sem alterar a formação de ERN (nitratos e nitritos), além de MDA em ambas as estruturas cerebrais. Levando em consideração que encontramos uma tendência de formação de isoprostanos, cabe ressaltar que utilizamos parâmetro e amostra biológica diferente para avaliar lipoperoxidação. Outro achado neste estudo de da Rosa et al (2015) foi o fato de que antioxidantes sequestradores de radicais peroxila e hidroxila preveniram a lipoperoxidação e redução das defesas antioxidantes no estriado, tais como GSH, GPx e GR. Esses resultados em conjunto com os que encontramos na urina de pacientes L-

2-HG sugerem que o L-2-HG acumulado induz estresse oxidativo. Além disso, da Rosa et al (2015) encontraram alterações histopatológicas importantes nas duas estruturas cerebrais estudadas. Foi observada intensa vacuolização, infiltrado linfocítico e macrofágico além de necrose (apenas no estriado). No intuito de entender o mecanismo de dano ao DNA, foram investigados os níveis de espécies de guanina oxidadas (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, 8-hidroxi-guanosina e 8-hidroxi-guanina) na urina dos pacientes L-2-HGA e comparados com controles, tendo-se verificado um aumento significativo deste biomarcador, confirmando o mecanismo oxidativo no processo de dano ao DNA nestes pacientes.

Nos últimos anos, têm-se demonstrado que, em várias doenças, o DNA e o RNA sofrem dano oxidativo e que ocorrem processos de reparação o que faz com que espécies oxidadas sejam liberadas na urina. O dano oxidativo ao DNA ocorre como resultado do ataque de ERO (especialmente o OH^\bullet) ao DNA nuclear e mitocondrial gerando a forma oxidada de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), que é um produto da base purínica guanosina (Halliwell e Guttridge, 2007). O dano oxidativo a ácidos nucleicos tem sido encontrado em doenças como câncer e doenças neurodegenerativas (Krzysztof Roszkowski et al., 2011) além de alguns EIM. Neste contexto, foi demonstrado que pacientes PKU, um erro inato do metabolismo da Phe, apresentam altas concentrações urinárias de 8-OHdG associado com dano oxidativo, bem como uma correlação significativa positiva entre o metabólito Phe acumulado nesta doença e os níveis urinários de 8-OHdG (Deon et al., 2015). Nessa mesma linha de pesquisa, foi demonstrado que pacientes com mucopolissacaridose tipo IV, um erro inato do catabolismo de glicosaminoglicanos, apresentam níveis aumentados de 8-OHdG, reforçando o envolvimento de dano oxidativo ao DNA em EIM (Donida et al., 2015). Assim, no presente trabalho, pode-se inferir o envolvimento de ERO na L-2-HGA e que essas espécies podem potencialmente causar modificações oxidativas na base purínica do DNA.

Em suma, este trabalho demonstra, como primeira menção na literatura, que os ácidos D-2-HG e L-2-HG induzem dano ao DNA *in vitro* e que a LC tem um efeito atenuador *in vitro* desse dano. Além disso, esse estudo realizado na urina dos pacientes com L-2-HGA indica que ocorre dano oxidativo proteico e ao DNA. Estudos futuros

em líquido de pacientes portadores destas patologias poderão melhor esclarecer o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da disfunção neurológica que ocorre em pacientes acometidos por essas doenças. Pode-se especular também, o uso da LC como potencial terapia adjuvante para prevenir dano oxidativo a biomoléculas. No entanto, maiores estudos são necessários para melhor entender o efeito da LC em pacientes portadores das acidúrias D-2-HGA e L-2-HGA.

5. CONCLUSÕES

A partir do estudo *in vitro* dos ácidos D-2-HG e L-2-HG e em pacientes com L-2-HGA foi possível concluir que:

- a) Os ácidos D-2-HG e L-2-HG podem provocar dano *in vitro* ao DNA;
- b) A LC tem a capacidade de atenuar o dano ao DNA *in vitro* provocado pelos ácidos D-2-HG e L-2-HG;
- c) Pacientes com L-2-HGA apresentam dano oxidativo ao DNA e a proteínas.

Dessa forma, cabe salientar o potencial antioxidante da LC e promissor adjuvante no tratamento dos pacientes com L-2-HGA e D-2-HGA. Entretanto, maiores estudos são necessários para justificar seu uso.

6. PERSPECTIVAS

Pretende-se dar continuidade ao trabalho analisando outros parâmetros de estresse oxidativo em amostras de sangue total, plasma e líquido de pacientes portadores das acidúrias D-2-HGA e L-2-HGA. Dessa forma, espera-se:

- a) Avaliar as defesas antioxidantes enzimáticas (através da medida da atividade das enzimas CAT, SOD, GPx e GR) e não enzimáticas (através da quantificação de GSH) em eritrócitos e realizar teste *in vitro* com antioxidantes;
- b) Avaliar as defesas antioxidantes não enzimáticas (*Status* Antioxidante Total – TAS – e Reatividade Antioxidante Total – TAR) no plasma e na urina;
- c) Avaliar o dano oxidativo a lipídeos (através da quantificação de MDA em plasma) e proteínas (através da quantificação de grupamentos carbonílicos e sulfidrila em plasma);
- d) Correlacionar os parâmetros bioquímicos e oxidativos.

7. REFERÊNCIAS

Abdul HM, Butterfield DA. Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42 (3): 371-384.

Ahmed RG. The physiological and biochemical effects of diabetes on the balance between oxidative stress and antioxidant defense system. *Med J Islamic World Acad Sci*, 2005, 15 (1): 31-42.

Agarwal A, Said TM. Carnitines and male infertility. *Reprod Biomed Online*, 2004, 8: 376-384.

Aycicek A, Kocyigit A, Erel O, & Senturk H. Phototherapy causes DNA damage in peripheral mononuclear leukocytes in term infants. *J de pediat*, 2008, 84 (2): 141-146.

Balaji P, Viswanathan V, Chellathurai A, Panigrahi D. An interesting case of metabolic dystonia: L-2-hydroxyglutaric aciduria. *Ann Indian Acad Neurol*, 2014, 17 (1): 97-99.

Barschak AG, Sitta A, Deon M, de Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS et al. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab brain dis*, 2006, 21 (4): 279-286.

Beal MF. Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 2003, (suppl.3) S39-S48.

Boerrigter ME, Franceschi C, Arrigoni-Martelli E et al. The effect of L-carnitine and acetyl-l-carnitine on the disappearance of DNA single-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis*, 1993, 14:2131-2136.

Chalmers RA, Purkiss P, Watts RWE, Lawson AM. Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. *J Inher Metab Dis*, 1980, 3: 27-29.

Chapela SP, Krieger N, Fernández N, Stella CA. Involvement of L-carnitine in cellular metabolism: beyond Acyl-CoA transport. *Mini Rev Med Chem*, 2009, 9 (13): 1518-1526.

Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta*, 2006, 365: 30-49.

da Rosa MS, Seminotti B, Amaral AU et al. Disruption of redox homeostasis and histopathological alterations caused by in vivo intrastriatal administration of D-2-hydroxyglutaric acid to young rats. *Neuroscience*, 2014, 277: 281-293.

da Rosa MS, Ribeiro CAJ, Seminotti B et al (2015) In vivo intracerebral administration of L-2-hydroxyglutaric acid provokes oxidative stress and histopathological alterations in striatum and cerebellum of adolescent rats. *Free Radic Biol Med*, 2015, 83: 201-213.

da Silva CG, Bueno ARF, Schuck PF et al. L-2-hydroxyglutaric acid inhibits mitochondrial creatine kinase activity from cerebellum of developing rats. *Int J Dev Neurosci*, 2003, 21: 217-224.

Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Pigatto M, Schmitt GO et al. Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int Jour of Dev Neurosci*, 2007, 25 (7): 441-444.

Deon M, Landgraf SS, lamberty JF et al. Protective effect of L-carnitine on phenylalanine-induced DNA damage. *Metab Brain Dis*, 2015, 30: 925-933.

Donida B, Marchetti DP, Biancini GB, Deon M, Manini PR, da Rosa HT, Moura DJ, Saffi J, Bender F, Burin MG, Coitinho AS, Giugliani R, Vargas CR. Oxidative stress and inflammation in mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852 (5): 1012-1019.

dos Santos Mello M, Ribas GS, Wayhs CA et al. Increased oxidative stress in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Mol Cell Biochem*, 2015, 402:149-155.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002, 82: 47-95.

Duran M, Kamerling JP, Bakker HD, van Gennip AH, Wadman SK. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: an inborn error of metabolism? *J Inherit Metab Dis*, 1980, 3: 109-112.

Gibson KM, Craigen W, Herman GE, Jakobs C. D-2-hydroxyglutaric aciduria in a newborn with neurological abnormalities: a new neurometabolic disorder? *J Inherit Metab Dis*, 1993b, 16: 497-500.

Giugliani R, Vairo FP, Riegel M, de Souza CF, Schwartz IV, Pena SD. Rare disease landscape in Brazil: report of a successful experience in inborn errors of metabolism. *Orphanet J Rare Dis*, 2016, 11(1): 76 doi: 10.1186/s13023-016-0458-3

Gregersen N, Ingerslev J, Rasmussen K. Low molecular weight organic acids in the urine of the newborn. *Acta Paediatr Scand*, 1977, 66: 85-89.

Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci*. 2006, 78 (8): 803-81.

Halliwell B. Antioxidant in human health and disease. *Annu Rev Nutr*, 1996, 16: 33-50.

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 2001, 18 (9): 685-716.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol*, 2004, 142: 231-255.

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

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, 2007, 4th ed.

Hoffmann G. Organic acid analysis. In: Blau N, Duran M, Blaskovics M.E, editors. *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic disease*. 1st ed. London: Chapman and Hall, 1996, 31-49.

Jellouli NK, Hadj Salem I, Ellouz E et al. Founder effect confirmation of c.241A > G mutation in the L2HGDH gene and characterization of oxidative stress parameters in six Tunisian families with L-2-hydroxyglutaric aciduria. *J Hum Genet*, 2014, 59: 216-222.

Kirschbaum B. Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicators. *Clin Nephrol*. 2002, 58: 344-349.

Kölker S, Pawlak V, Ahlemeyer B et al. NMDA receptor activation and respiratory chain complex V inhibition contribute to neurodegeneration in D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Eur J Neurosci*, 2002, 16: 21-28.

Kranendijk M, Struys EA, Gibson KM et al. Evidence for genetic heterogeneity in D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Hum Mutat*, 2010a, 31: 279–283.

Kranendijk M, Struys EA, van Schaftingen E, Gibson KM, Kanhai WA, van der Knaap MS, et al. IDH2 mutations in patients with D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Science*, 2010b, 330 (6002): 336- 336.

Kranendijk M, Struys EA, Salomons GS, van der Knaap MS, Jakobs C. Progress in understanding 2-hydroxyglutaric acidurias. *J Inherit Metab Dis*, 2012, 35: 571-587.

Roszkowski K, Jozwicki W, Blaszczyk P et al. Oxidative damage DNA: 8-oxoGua and 8-oxodG as molecular markers of cancer. *Med Sci Monit*, 2011, 17: CR329-333.

Latini A, Scussiato K, Rosa RB et al. D-2-hydroxyglutaric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Eur J Neurosci*, 2003, 17: 2017-2022.

Latini A, Da Silva CG, Ferreira GC et al. Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab*, 2005, 86: 188-199.

Lee PJ, Harrison EL, Jones MG, Jones S, Leonard JV, Chalmers RA. L-carnitine and exercise tolerance in medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD) deficiency: a pilot study. *J Inherit Metab Dis*, 2005, 28 (2): 141-152.

Leipnitz G, Vargas CR, Wajner M. Disturbance of redox homeostasis as a contributing underlying pathomechanism of brain and liver alterations in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *J Inherit Metab Dis*, 2015, 38(6): 1021-1028.

Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 2000, 21:361-370
Mc Guire PJ, Parikh A, Diaz GA. Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab*, 2009, 98: 173-180.

Mescka CP, Moraes T, Rosa A, Mazzola P, Piccoli B, Jacques C, et al. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis*, 2011, 26 (1): 21-28.

Mescka CP, Wayhs CA, Vanzin CS, Biancini GB, Guerreiro G, Manfredini V, et al. Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: L-carnitine effect. *Int. J. Dev. Neurosc*, 2013, 31 (1): 21-24.

Mescka CP, Wayhs CA, Guerreiro G et al. Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro. *Gene*, 2014, 548: 294-298.

Mescka CP, Guerreiro G, Hammerschmidt T, Faverzani J, Coelho DM, Manfredini V et al. L-carnitine supplementation decreases DNA damage in treated MSUD patients. *Mutat Res*, 2015, 775: 43-47.

Moroni I, Bugiani M, D'Incerti L et al. L-2-hydroxyglutaric aciduria and brain malignant tumors: a predisposing condition? *Neurology*, 2004, 62: 1882-1884.

Mueller RR, Young ID. Biochemical genetics. In: Emery's Elements of Medical Genetics, 9th ed. New York: Churchill, Livingstone, 1995.

Patay Z, Mills JC, Löbel U, Lambert A, Sablauer A, Ellison D.W. Cerebral Neoplasms in L-2-hydroxyglutaric aciduria: 3 new cases and meta-analysis of literature data. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2012, 33 (5): 940-943.

Patay Z, Orr BA, Shulkin BL et al. Successive distinct high-grade gliomas in L-2-hydroxyglutaric aciduria. *J Inher Metab Dis*, 2015, 38: 273-277.

Ribas GS, Manfredini V, de Mari JF, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, et al. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int J Dev Neurosci*, 2010a, 28 (2): 127-132.

Ribas GS, Manfredini V, De Marco MG et al. Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. *Mutat Res*, 2010b, 702: 123-128.

Ribas GS, Vargas CR, Wajner M. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene*, 2014, 533: 469-476.

Rzem R, Veiga-da-Cunha M, Noel G, Goffette S, Nassogne MC, Tabarki B, Schöller C, Marquardt T, Vikkula M, Van Schaftingen E. A gene encoding a putative FAD-dependent L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase is mutated in L-2-hydroxyglutaric aciduria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 16849-16854.

Saudubray JM, Charpentier C. Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (Eds.): *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988, 175: 184-191.

Stanley CA. Carnitine deficiency disorders in children. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1033: 42-5.

Sitta A, Barschak AG, Deon M, Terroso T, Pires R, Giugliani R et al. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab brain dis*, 2006, 21 (4): 287-296.

Sitta A, Barschak AG, Deon M, de Mari JF, Barden AT, Vanzin CS, Biancini GB, Schwartz IV, Wajner M, Vargas CR. L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29 (2): 211-218.

Steenweg ME, Jakobs C, Errami A, van Dooren SJ, Adeva Bartolomé MT, Aerssens P, et al. An overview of L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene (L2HGDH) variants: a genotype-phenotype study. *Hum Mutat*, 2010, 31: 380-390.

Struys EA, Jansen EE, Verhoeven NM, Jakobs C. Measurement of urinary D- and L-2-hydroxyglutarate enantiomers by stable-isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry after derivatization with diacetyl-L-tartaric anhydride. *Clin Chem*, 2004a, 50: 1391-1395.

Struys EA, Verhoeven NM, Salomons GS et al. D-2-hydroxyglutaric aciduria in three patients with proven SSADH deficiency: genetic coincidence or a related biochemical epiphenomenon? *Mol Genet Metab*, 2006, 88: 53-57.

Tice RR, Agurell E, Anderson D. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 2000, 35: 206-221

Topçu M, Aydın OF, Yalcinkaya C et al. L-2-hydroxyglutaric aciduria: a report of 29 patients. *Turk J Pediatr*, 2005, 47: 1-7.

Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*, 2011, 111 (10): 5944-5972.

Van der Knaap MS, Jakobs C, Hoffmann GF, Duran M, Muntau AC, Schweitzer S, Kelley RI, Parrot-Roulaud F, Amiel J, De Lonlay P, Rabier D, Eeg-Olofsson O. D-2-hydroxyglutaric aciduria: further clinical delineation. *J Inherit Metab Dis*, 1999a, 22: 404-413.

Van der Knaap MS, Jakobs C, Hoffmann GF, Nyhan WL, Renier WO, Smeitink JA, Catsman-Berrevoets CE et al. D-2-hydroxyglutaric aciduria: biochemical marker or clinical disease entity? *Ann Neurol*, 1999b, 45: 111-119.

Van der Knaap MS, Valk J. Magnetic resonance of myelination and myelin disorders 3rd edn. Springer, Heidelberg, Berlin, 2005, 43: 334-337.

Van Schaftingen E, Rzem R, Veiga-da-Cunha M. L-2-hydroxyglutaric aciduria, a disorder of metabolite repair. *J Inherit Metab Dis*, 2008, 32: 135-142.

Vilarinho L, Cardoso ML, Gaspar P, et al. Novel L2HGDH mutations in 21 patients with L-2-hydroxyglutaric aciduria of Portuguese origin. *Hum Mut*, 2005, 26: 395-396.

Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis*, 2004, 27 (4): 427-448.

Wajner M, Coelho D de M, Ingrassia R, de Oliveira AB, Busanello EN, Raymond K, et al. Selective screening for organic acidemias by urine organic acid GC-MS analysis in Brazil: fifteen-year experience. *Clin Chim Acta*, 2009, 400 (1-2): 77-81.

Wajner M, Goodman SI. Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies. *J Bioenerg Biomembr*, 2011, 43: 31-38.

Walter JH. L-carnitine. *Arch Dis Child*, 1996, 74 (6): 475-478.

8.1 ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES COM ACIDEMIA D-2-HIDROXIGLUTÁRICA OU L-2-HIDROXIGLUTÁRICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PACIENTES COM ACIDEMIA L-2-HIDROXIGLUTÁRICA OU D-2-HIDROXIGLUTÁRICA

Estamos convidando você ou a pessoa pela qual você é responsável, que é portadora de Acidúria L-2-hidroxi-glutárica (L-2-HGA) ou D-2-hidroxi-glutárica (D-2-HGA), a participar do projeto de pesquisa intitulado “Investigação de parâmetros de estresse oxidativo e nitrativo em pacientes com Acidúria D-2-Hidroxi-glutárica e L-2-Hidroxi-glutárica: Efeito *in vitro* da L-carnitina e da vitamina E sobre o dano ao DNA”. O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, formados por radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com D-2-HGA ou L-2-HGA. Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com você (portador ou responsável legal do portador de L-2-HGA ou D-2-HGA), das coletas de sangue periférico e urina. Estes dados serão coletados nos dias de consultas rotineiras, não sendo necessário o comparecimento em consultas extras. Caso necessário, dados adicionais serão obtidos dos prontuários dos pacientes.

É muito importante que você saiba que os dados (entrevista, resultados das análises de sangue e urina) obtidos com a doação, são de relevante importância científica para o melhor entendimento da L-2-HGA ou D-2-HGA e, principalmente, na busca de terapias complementares para o tratamento dessa doença. Sendo que esses resultados também beneficiarão outros pacientes com a mesma doença.

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

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

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

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

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e a mestrandia Daiane G. Bardemaker Rodrigues) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa, no Serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: (51) 3359.8011. Ainda,

para maiores informações, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 3359.7640, de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h.

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

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

Data: _____

Nome: _____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

8.2 ANEXO 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES CONTROLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PACIENTES CONTROLE

Estamos convidando você a participar, como voluntário(a), do projeto de pesquisa intitulado “Investigação de parâmetros de estresse oxidativo e nitrativo em pacientes com Acidúria D-2-Hidroxi-glutárica e L-2-Hidroxi-glutárica: Efeito *in vitro* da L-carnitina e da vitamina E sobre o dano ao DNA” O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, formados por radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com a doença Acidemia L-2-hidroxi-glutárica (L-2-HGA) ou D-2-hidroxi-glutárica (D-2-HGA).

Para que este estudo seja realizado, é necessária uma comparação entre um grupo de pacientes que apresentam a doença com um grupo de pacientes que não apresentam. Portanto, você está sendo convidado(a) a participar deste estudo como controle, ou seja, como não portador(a) de Acidemia L-2-HGA ou D-2-HGA. Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com você e das coletas de sangue periférico e urina. Estes dados serão coletados nos dias de exames rotineiros, não sendo necessário o comparecimento em consultas extras.

Para participar, será feita a coleta de sangue e urina juntamente com as coletas solicitadas rotineiramente pelo médico. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue e urina são semelhantes aos da coleta para exames laboratoriais de rotina. A participação neste estudo não trará benefício direto a você, porém, os dados advindos desta doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novos

tratamentos para esta doença, bem como um melhor entendimento desta patologia. O material coletado será única e exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo reservado a você o acesso às mesmas.

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

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

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

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

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

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

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

Data: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

8.3 ANEXO 3- COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



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

COMISSÃO CIENTÍFICA

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

Projeto: 150601

Data da Versão do Projeto: 11/12/2015

Pesquisadores:

CARMEN REGLA VARGAS

CARLOS EDUARDO DIAZ JACQUES

GILIAN BATISTA BALBUENO GUERREIRO

MOACIR WAJNER

DAIANE GRIGOLO BARDEMAKER RODRIGUES

Título: Investigação de parâmetros de estresse oxidativo e nitrativo em pacientes com Acidúria D-2-Hidroxi-glutárica e L-2-Hidroxi-glutárica; Efeito in vitro da L-carnitina e da vitamina E sobre o dano ao DNA

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

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

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

Porto Alegre, 16 de janeiro de 2016.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA