

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

Belisa dos Santos Parmeggiani

**ESTUDO DOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA HIPERGLICINEMIA
NÃO CETÓTICA EM CÉREBRO DE RATOS**

Porto Alegre, janeiro de 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Parmeggiani, Belisa dos Santos
ESTUDO DOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA
HIPERGLICINEMIA NÃO CETÓTICA EM CÉREBRO DE RATOS /
Belisa dos Santos Parmeggiani. -- 2020.
142 f.
Orientador: Guilhian Leipnitz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. hiperglicinemia não cetótica. 2. glicina. 3.
mielina. 4. estresse oxidativo. 5.
n-metil-d-aspartato. I. Leipnitz, Guilhian, orient.
II. Título.

Belisa dos Santos Parmeggiani

**ESTUDO DOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA HIPERGLICINEMIA
NÃO CETÓTICA EM CÉREBRO DE RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Guilhian Leipnitz

Porto Alegre

2020

*“If nothing we do matters,
then all that matters is what
we do.”*

Angel, “Epiphany”

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Eduardo e Regina e minha irmã Brenda. Na minha casa, teve muito livro, o laboratório de Beakman, Animal Planet e kit de alquimia, que certamente despertaram o meu interesse pela ciência. Também teve muito carinho, apoio, risada e bichinhos. Eles nunca me disseram que eu não podia ser o que eu quisesse, então aqui estou eu hoje, cientista, por causa deles.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, minha segunda casa por praticamente 10 anos. Sou muito grata pela formação de qualidade e gratuita. Espero retribuir o que recebi.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de mestrado e doutorado, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado sanduíche, certamente uma das experiências mais felizes da minha formação.

Ao Professor Nick Greene, meu orientador no exterior, que acreditou em mim e me recebeu de portas abertas, e a seu grupo de pesquisa e meus amigos no UK.

Ao Professor Moacir Wajner, pelas colaborações e por sempre ter as portas do lab abertas para mim.

Aos meus amigos, colegas e ICs do “lab 65” e amigos de corredor da bioquímica, presentes e passados. Particularmente, Ânge, Brendinha, Cris, Iohanna, Júlia, Júlio, Marian, Neuton, Pauline, e Rafa. Foi e é muito bom contar com vocês.

Em especial, aos meus colegas e amigos, Alana, Bianca, Marina (e João Henrique!) e Mateus. Meus linduxos, sou mais feliz com vocês.

Às minhas amigas, Alicia, Carol e Djeni, da graduação, pro mundo.

Aos meus (muitos) amigos do coração, André, Bruna, Dante, Diego, Gabi, Lu, Malu, Moni, Mi, Nic, Raquel, Rodrigo, Tati, Tomazinho, Yan. Eu tenho sorte.

Vocês são ótimos. Foi ótimo!

E um muito obrigada gigante ao meu orientador, meu amigo, meu afilhado de casamento, Professor Guilhian. Foi muita mão segurada, muita rebeldia, muita dúvida, muito “não te estressa, vai dar tudo certo!” e “faz o que te fizer feliz!”.

Acho que deu tudo certo, tô feliz, e tu tem tudo a ver com isso.

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
I.1 INTRODUÇÃO	6
I.1.1 METABOLISMO DA GLICINA	6
I.1.2 ERROS INATOS DO METABOLISMO	7
I.1.3 HIPERGLICINEMIA NÃO CETÓTICA	8
I.1.3.1 DIAGNÓSTICO	10
I.1.3.2 TRATAMENTO	11
I.1.3.3 FISIOPATOLOGIA	11
I.1.4 BEZAFIBRATO	13
I.1.5 DEFEITOS DO TUBO NEURAL, HIDROCEFALIA E O	
METABOLISMO DE UM CARBONO	14
I.1.6 EQUILÍBRIO REDOX	15
I.1.6.1 ESPÉCIES REATIVAS E RADICAIS LIVRES	15
I.1.6.2 DEFESAS ANTIOXIDANTES	16
I.1.6.3 ESTRESSE OXIDATIVO	18
I.1.7 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO	19
I.1.7.1 RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS	19
I.1.7.2 TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO	21
I.1.8 MIELINA	22
I.2 OBJETIVOS	24
I.2.1 OBJETIVO GERAL	24

I.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
PARTE II	25
CAPÍTULO I	26
CAPÍTULO II	44
PARTE III	77
III.1 DISCUSSÃO	78
III.2 CONCLUSÕES	103
III.3 PERSPECTIVAS	104
REFERÊNCIAS	105
LISTA DE FIGURAS	116
ANEXO 1	117
ANEXO 2	119

PARTE I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

RESUMO

Hiperglicinememia não cetótica (HNC) é um erro inato do catabolismo da glicina caracterizado por convulsões, disgenesia do corpo caloso e atrofia cortical, porém o papel da glicina, um co-agonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), nos mecanismos desses achados clínicos ainda não está claro. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar possíveis alterações bioquímicas e celulares causadas pela glicina. Inicialmente, avaliamos os efeitos ex vivo de uma injeção intracerebroventricular de glicina sobre parâmetros de defesas antioxidantes e dano oxidativo em estriado, hipocampo e córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida eutanasiados 30 min após a administração. A glicina aumentou a atividade da superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase em estriado, sem provocar dano oxidativo. Em experimentos in vitro, observaram-se aumento de níveis de malondialdeído e diminuição nas concentrações de glutatona reduzida (GSH) em estriado em um curto período de incubação, implicando que o aumento das defesas antioxidantes enzimáticas ex vivo ocorre em resposta a um dano oxidativo rápido. Em hipocampo, houve diminuição nas concentrações de GSH, no conteúdo total de glutatona e na razão GSH/GSSG. Não houve modificações em córtex cerebral. É possível que a heterogeneidade nos resultados seja devido a diferenças na composição de subunidades do receptor NMDA nas regiões cerebrais, conferindo-lhes susceptibilidade diferencial ao dano. Também se testou o efeito do bezafibrato, o qual atenuou o aumento da atividade da GPx e preveniu os aumentos de SOD e GR, sugerindo que a indução de biogênese mitocondrial causada pelo bezafibrato preveniu a produção de espécies reativas em primeiro lugar, e, assim, não houve a regulação positiva das enzimas antioxidantes. Estudamos também os efeitos da injeção de glicina sobre parâmetros celulares e teciduais em animais neonatos eutanasiados 14 dias após a administração. Houve diminuição na marcação da proteína básica da mielina (MBP) e da glicoproteína associada à mielina (MAG), envolvidas na estrutura da mielina, em estriado e corpo caloso. Esse efeito foi possivelmente causado por redução do número de oligodendrócitos, já que observamos diminuição de NG2 em estriado, marcador de precursores de oligodendrócitos. A glicina também diminuiu o conteúdo de NeuN e aumentou a da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no estriado, sem alterações em córtex cerebral. Por outro lado, o conteúdo de NR1, a subunidade com sítio de ligação para glicina no receptor NMDA, estava diminuída em ambas as estruturas cerebrais, provavelmente por causa de feedback negativo da glicina. A gliose estriatal foi acompanhada por aumento no conteúdo do transportador de glutamato e aspartato GLAST, porém não observamos alteração na captação de [3H]glutamato nos tecidos, indicando que o aumento de proteínas astrocíticas não foi acompanhado de melhora de função dessa célula. Além disso, avaliamos a translocação do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e do co-ativador de receptor ativado por proliferadores de peroxissomos alfa (PGC1 α) e o conteúdo do fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) 5 dias após a injeção de glicina em ratos neonatos. A glicina diminuiu o conteúdo citosólico do Nrf2 em córtex cerebral e o conteúdo nuclear de Nrf2 em estriado, indicando dano à resposta antioxidante dos tecidos. Ainda encontramos aumento da translocação do PGC1 α em córtex cerebral e diminuição do conteúdo citosólico de TFAM. No estriado não houve alterações nos conteúdos de PGC1 α e TFAM. Nossos resultados mostram prejuízos em vias de sinalização importantes para homeostase energética e redox celular, representando possíveis mecanismos envolvidos no dano cerebral da HNC.

ABSTRACT

Non ketotic hyperglycinemia (NKH) is an inborn error of glycine catabolism characterized by seizures, disgenesis of the corpus callosum and cortical atrophy, but the involvement of glycine, an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor co-agonist, in the mechanisms of these clinical findings is not completely understood yet. Therefore, the aim of this work was to investigate potential biochemical and cellular alterations caused by glycine. We initially investigated the *ex vivo* effects of an intracerebroventricular injection of glycine on parameters of antioxidant defenses and oxidative damage in striatum, hippocampus and cerebral cortex of 30-day-old rats euthanized 30 min after glycine administration. Glycine increased the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and glucose-6-phosphate dehydrogenase in striatum, without causing oxidative damage. We also performed *in vitro* experiments where we observed increased levels of malondialdehyde and decreased concentrations of reduced glutathione (GSH) in striatum after a short incubation, implying that the increase in antioxidant defenses *ex vivo* occurs in response to early oxidative damage. In hippocampus, there was a decrease in GSH concentrations, total glutathione content and in the GSH/GSSG ratio. No alterations were found in cerebral cortex. It is possible that the heterogeneity of our results is due to distinct compositions in NMDA receptor subunit in the brain regions, conferring them differential susceptibility to damage. In this model, we also tested the effects of bezafibrate, which attenuated the increase in GPx activity and prevented the increase in SOD and GR activities, suggesting that the induction of mitochondrial biogenesis caused by bezafibrate prevented the production of reactive species in the first place, thus the upregulation of antioxidant enzymes did not occur. We also studied the effects of glycine on cellular and tissue parameters in neonatal rats euthanized 14 days after administration. There was a decrease in myelin basic protein (MBP) and myelin associated glycoprotein (MAG) staining, involved in myelin structure, in striatum and corpus callosum. This effect was likely caused by reduction in the number of oligodendrocytes, once we observed a decrease of NG2 in striatum, a marker of oligodendrocyte precursor. Glycine also decreased NeuN content and increased glial fibrillary acidic protein (GFAP) content in striatum, with no alterations in cerebral cortex. On the other hand, the immunoccontent of NR1, the subunit that contains the glycine binding site in NMDAR, was decreased in both brain structures, probably due to negative feedback by glycine. The gliosis seen in striatum was accompanied by increased glutamate aspartate transporter GLAST content, but [³H]glutamate uptake was not modified by glycine in the tissues, indicating that the increase in astrocytic proteins was not followed by ameliorated cell function. Additionally, we evaluated the translocation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 α) and the content of mitochondrial transcription factor A (TFAM) 5 days after a neonatal injection of glycine. We verified that glycine reduced Nrf2 cytosolic content in cerebral cortex and the nuclear content in striatum, indicating impairment in antioxidant response. Moreover, an increased translocation of PGC1 α was found in cerebral cortex, where glycine decreased the cytosolic content of TFAM in cerebral cortex. There were no changes in the striatal content of PGC1 α and TFAM. Our results demonstrate impairment in important cell redox and energy homeostasis pathways, which may represent possible mechanisms involved in the neurological damage of NKH.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA - receptor ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ARE - elementos de resposta antioxidante
BDNF - fator neurotrófico derivado do encéfalo
BrdU - bromo-desoxiuridina
CAT - catalase
CB1 - receptor canabinoide 1
DCFH - 2,7-diclorofluoresceína
DTN - defeitos do tubo neural
EAAC1 - carreador de aminoácidos excitatórios 1
EAAT (1-5) - transportadores de aminoácidos excitatórios 1-5
EIM - erros inatos do metabolismo
ERK 1/2 - cinase extracelular regulada por sinal 1/2
G6PDH - glicose-6-fosfato desidrogenase
GCL - glutamato cisteína ligase
GFAP - proteína ácida fibrilar glial
GLAST - transportador de glutamato e aspartato
GLT-1 - transportador de glutamato 1
GlyR - receptor de glicina
GlyT1 - transportador de glicina 1
GPx - glutaciona peroxidase
GR - glutaciona redutase
GSH - glutaciona reduzida
GSK3 β - glicogênio sintase cinase 3 β
GSSG - glutaciona oxidada
GST - glutaciona S-transferase
HNC - hiperglicinemia não cetótica
Keap1 - proteína tipo-Kelch associada a ECH 1
MAG - glicoproteína associada à mielina
MAPKs - proteínas cinases ativadas por mitógeno
MBP - proteína básica da mielina
MDA - malondialdeído
NADP⁺ - β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, oxidado

NADPH - β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, reduzido
NeuN - núcleos de neurônio
NG2 - antígeno proteoglicano condroitina sulfato neurônio/glia2
NMDAr - receptores N-metil-D-aspartato
NR 1-3 A-D - subunidades dos receptores NMDA 1-3 e subtipos A-D
NRF1 – fator respiratório nuclear 1
Nrf2 - fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
OPCs - células precursoras de oligodendrócitos
PGC1 α - co-ativador de receptor ativado por proliferadores de peroxissomos alfa
PPAR - receptores ativados por proliferadores de peroxissomos
S100B - proteína B de ligação ao Ca²⁺ S100
SCG - sistema de clivagem da glicina
SOD - superóxido dismutase
TFAM - fator de transcrição mitocondrial A

I.1 INTRODUÇÃO

I.1.1 Metabolismo da Glicina

A glicina é um aminoácido não-essencial, que pode ser obtido a partir da serina pela ação da enzima serina hidroximetiltransferase, com uso de piridoxal fosfato como cofator, ou reação reversa do sistema de clivagem da glicina (SCG). A reação reversível da SCG também realiza a degradação deste aminoácido (Hamosh e Johnston 2001). Esse sistema é composto por três enzimas e uma proteína, fracamente associadas à membrana mitocondrial interna: proteína P (glicina descarboxilase dependente de piridoxal fosfato), proteína H (proteína carreadora contendo ácido lipoico), proteína T (aminometiltransferase) e proteína L (dihidrolipoamida desidrogenase) (Kikuchi et al. 2008). A função orquestrada desse sistema ocorre como se fosse uma reação em três passos, ilustrados na figura 1. Alternativamente, a glicina também pode ser interconvertida à serina pela reação reversa da serina hidroximetiltransferase, ou, em menor proporção, oxidada a glioxalato pela glicina oxidase. O SCG, no entanto, ainda é a principal via de degradação da glicina conhecida.

A glicina possui diversas funções, atuando como constituinte de proteínas, substrato para vias biossintéticas e neurotransmissor. Por conter apenas um hidrogênio na sua cadeia lateral, a interferência estérica da glicina é mínima, sendo, portanto, comumente encontrada nas regiões de alfa-hélice de proteínas, tais como colágeno e elastina (Hamosh e Johnston 2001). Além disso, compõe o tripeptídeo glutathiona (GSH), e seu metabolismo está relacionado à síntese de purinas, creatina, porfirinas e folato para o

metabolismo de um carbono (Hamosh e Johnston 2001; Narisawa et al. 2012). No cérebro, atua como neurotransmissor excitatório, sendo um co-agonista de receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr); já no tronco encefálico, a glicina tem ação inibitória, ligando-se em receptores glicina (GlyR) (Dutertre et al. 2012).

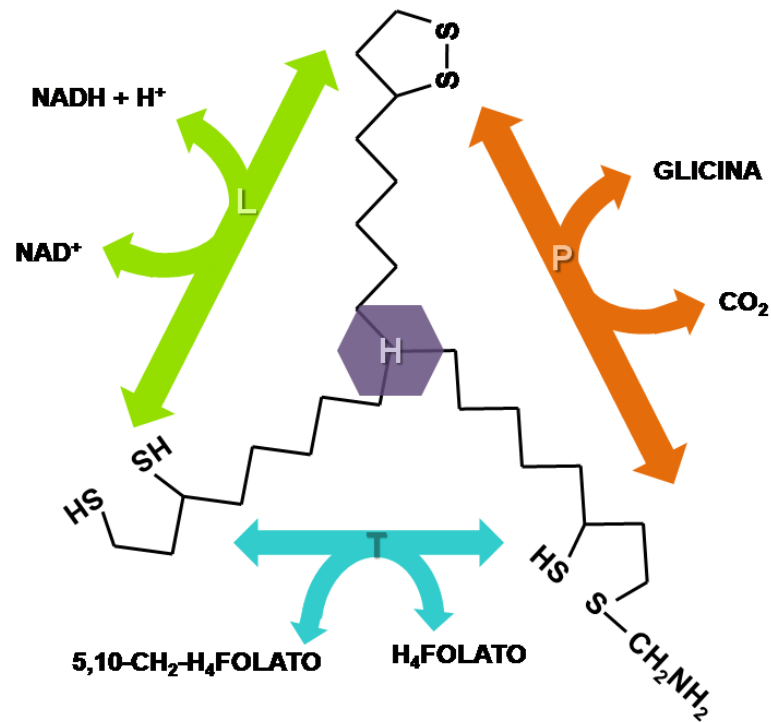


Figura 1. Representação ilustrativa da reação do sistema de clivagem da glicina. Proteína P (glicina descarboxilase dependente de piridoxal fosfato) em laranja, à direita; proteína H (proteína carreadora contendo ácido lipoico) em roxo, ao centro; proteína T (aminometiltransferase) em azul, embaixo; proteína L (dihidrolipoamida desidrogenase) em verde, à esquerda. Reação em sentido horário: a glicina é descarboxilada com concomitante redução de tiol no lipoato da proteína H, subsequente transferência de grupamento metileno para o tetrahydrofolato (H₄FOLATO) e liberação de NH₃ (não ilustrado). Por fim, a proteína L reoxida grupamentos tiol do lipoato com a redução de NAD⁺. Adaptado de Kikuchi et al., 2008.

I.1.2 Erros Inatos do Metabolismo

O termo erro inato do metabolismo (EIM) foi usado pela primeira vez por Sir Archibald Garrod, em 1908, para descrever a alcaptonúria, um defeito do

catabolismo dos aminoácidos tirosina e fenilalanina, levando à elevada excreção urinária de ácido homogentísico na urina dos pacientes afetados. Como um grupo, essas doenças são causadas por mutações genéticas, que levam à síntese de proteínas disfuncionais (geralmente enzimas), causando um bloqueio na rota em que essa proteína é integrante. Há, portanto, uma diminuição do produto dessa via e um acúmulo do seu substrato, o qual pode ser desviado para rotas alternativas, produzindo metabólitos secundários (Scriver 2001). Já foram descritos mais de 1.000 EIM, os quais podem ser divididos em defeitos em síntese, degradação, transporte ou armazenamento de moléculas. Individualmente, essas doenças são bastante raras, mas como um grupo, têm frequência estimada de 1:800 recém nascidos (Mak et al. 2013).

I.1.3 Hiperglicinemia não cetótica

A hiperglicinemia não cetótica (HNC), também chamada de encefalopatia por glicina, é um erro inato do catabolismo da glicina causado por mutações nos genes que codificam as proteínas do SCG, prejudicando sua atividade. Aproximadamente 80% dos casos são atribuídos a mutações no gene *GLDC*, que codifica a proteína P, 20% no gene *AMT*, que codifica a proteína T, e apenas alguns casos reportados de pacientes com proteína H defeituosa (gene *GCSH*) (Coughlin et al. 2017). Há, ainda, uma pequena parcela de pacientes acometidos por HNC atípica, cuja mutação genética não ocorre nos genes que codificam proteínas do SCG em si, mas prejudicam a sua atividade (Baker et al. 2014).

Apesar de a maioria dos pacientes serem deficientes para proteína P, não parece haver uma relação entre mutação ou proteína deficiente com o

fenótipo observado. A prevalência mundial da doença é desconhecida, porém um estudo multicêntrico estimou em 1:76.000 nascidos vivos (Coughlin et al. 2017). Por outro lado, acredita-se que a frequência da HNC seja subestimada devido a dificuldades de diagnóstico em regiões carentes, diagnósticos incorretos ou pacientes que falecem prematuramente sem diagnóstico definitivo (Zahid et al. 2019).

O fenótipo da HNC, similarmente a vários outros EIM, é bastante heterogêneo. Os pacientes geralmente são classificados conforme a idade de aparecimento dos sintomas, havendo as formas neonatal, infantil, tardia, episódica e transitória. A sua apresentação mais comum é a forma clássica ou neonatal (85% dos casos), em que a sintomatologia se manifesta já nos primeiros dias ou semanas de vida. Os sintomas mais marcantes são convulsões, frequentemente refratárias ao tratamento (Genc Sel et al. 2018), e dificuldades respiratórias, como soluço e apneia (Panayiotou et al. 2017), acompanhados de letargia, dificuldade de se alimentar e hipotonia, podendo levar ao coma e à morte (aproximadamente 30% dos casos) (Hoover-Fong et al. 2004). Dados da literatura sugerem que a gravidade da doença está relacionada à precocidade do início dos sintomas (Swanson et al. 2015). Além disso, observações clínicas sugerem que meninas parecem ter fenótipo pior que meninos diagnosticados com HNC (Hoover-Fong et al. 2004; Swanson et al. 2015).

Exames de imagem evidenciam atrofia cortical e cerebelar, hipomielinização (Genc Sel et al. 2018), vacuolização difusa da mielina (Lim et al. 2019), alargamento dos ventrículos e/ou da cisterna magna (Butler et al. 2017) e disgenesia do corpo caloso, sendo essa a malformação mais comum

em pacientes com HNC grave (Stence et al. 2019). Estudos *post mortem* demonstram ainda degeneração da substância branca e graus diversos de gliose em pacientes com até 3 anos de idade (Shuman et al. 1978). Também existem evidências de dano neurológico *in utero* (Paupe et al. 2002), o que é sustentado pelo fato de que o corpo caloso se desenvolve no período gestacional e que malformações nessa estrutura cerebral são bastante comuns (Goldstein et al. 2019; Weinstein et al. 2003).

I.1.3.1 Diagnóstico

Considerando-se a inespecificidade dos achados clínicos observados na HNC, o diagnóstico depende da quantificação da glicina no líquido cefalorraquidiano e no plasma, sendo uma razão líquido cefalorraquidiano/plasma maior do que 0,08 definitiva para diagnóstico (valor de referência < 0,02) (Hamosh e Johnston 2001). Valores normais de glicina no plasma e no líquido cefalorraquidiano variam de 104-254 μM e 3,0-7,0 μM , respectivamente, enquanto um trabalho recente mostrou que pacientes com HNC neonatal apresentavam até 2 mM de glicina no plasma e 510 μM no líquido cefalorraquidiano (Swanson et al. 2015). Valores similares já haviam sido previamente demonstrados (Tekinalp et al. 1995). Estudos com espectroscopia por ressonância magnética de prótons evidenciaram, em momentos de descompensação metabólica, picos de glicina no cérebro de pacientes de até 7,3 mM (Hamosh e Johnston 2001). A pesquisa de ácidos orgânicos na urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas é usada para diagnóstico diferencial de acidemias orgânicas com hiperglicinemia cetótica, como as acidemias propiônica, isovalérica e metilmalônica. A análise mutacional e medida da atividade do

SCG também são utilizadas para a confirmação do diagnóstico e em casos de HNC tardia, pois esses pacientes apresentam pouca ou nenhuma alteração nas concentrações de glicina (Applegarth e Toone 2001; Hamosh e Johnston 2001; Swanson et al. 2015).

I.1.3.2 Tratamento

O tratamento consiste no controle das convulsões e diminuição das concentrações de glicina. Para isso, são usados dieta cetogênica (Kava et al. 2019; Shbarou et al. 2019) e/ou administração de anticonvulsivantes, geralmente mais de um tipo em casos graves, com a ressalva de que deve ser evitado o uso de valproato por causar aumento nos níveis de glicina nos pacientes. A diminuição das concentrações de glicina é feita pelo controle da ingestão de glicina e serina na dieta e administração de benzoato de sódio, que se conjuga com a glicina e favorece a sua excreção urinária na forma de ácido hipúrico (Bjoraker et al. 2016). Além disso, alguns pacientes são tratados com antagonistas de NMDAr, tais como dextrometorfano e cetamina, uma vez que se acredita que as convulsões apresentadas pelos pacientes se devem, ao menos em parte, à ativação exacerbada desses receptores excitatórios, dos quais a glicina é um co-agonista. Como a HNC é bastante heterogênea e mesmo pacientes com fenótipos similares respondem diferentemente aos tratamentos, é necessária a análise de cada caso para determinar a estratégia terapêutica mais adequada (Bjoraker et al. 2016; Van Hove et al. 1993).

I.1.3.3 Fisiopatologia

Os exatos mecanismos responsáveis pelo aparecimento e progressão do dano neurológico característico da HNC neonatal ainda não estão totalmente esclarecidos. Nos EIM, é bem aceito que os metabólitos acumulados das rotas truncadas são potencialmente tóxicos e podem ter importante papel no mecanismo dos danos observados nessas doenças. Nesse sentido, dados da literatura sugerem fortemente que a glicina esteja diretamente relacionada aos sintomas e achados clínicos na HNC. Estudos *in vitro* já demonstraram que a glicina induz disfunção bioenergética e estresse oxidativo em córtex cerebral e cerebelo de ratos jovens (Busanello et al. 2010; Leipnitz et al. 2009; Moura et al. 2014). Trabalhos anteriores também verificaram, em modelos *ex vivo*, que o aminoácido modifica parâmetros de metabolismo energético e equilíbrio redox em diferentes estruturas cerebrais de ratos (Moura et al. 2013; Seminotti et al. 2011), e altera vias de sinalização importantes para sobrevivência celular, como a via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (Moura et al. 2018). Da mesma forma, em um estudo com animais neonatos, foi observado que a glicina parece ser particularmente prejudicial para o cérebro em desenvolvimento, já que, além de alterações nos mesmos parâmetros supracitados, também foram encontradas alterações celulares, como aumento de proteína B de ligação ao Ca^{2+} S100 (S100B) e proteína ácida fibrilar glial (GFAP) cinco dias após a exposição ao aminoácido (Moura et al. 2016). Em modelos de HNC quimicamente induzida em que foram administrados MK-801, um antagonista competitivo NMDAr, ou melatonina, um antioxidante, foi observada a prevenção de alguns dos efeitos causados pela glicina (Moura et al. 2018; Moura et al. 2016). Isso sugere que

excitotoxicidade e estresse oxidativo estão, ao menos parcialmente, envolvidos no dano neurológico presente na HNC.

Também há relatos de modelos da HNC em camundongos e *zebrafish* geneticamente modificados no gene análogo ao humano *GLDC* (Pai et al. 2015; Riche et al. 2018; Santos et al. 2019). Estes trabalhos mostraram que os animais *knockout* desenvolvem um fenótipo similar ao da HNC, com acúmulo de glicina, sendo que os camundongos ainda apresentam achados neurológicos similares (Pai et al. 2015; Santos et al. 2019), e os peixes, hipotonia, a qual é possivelmente causada pela superativação tanto de NMDAr como de GlyR. Além disso, o mesmo estudo demonstrou que a modulação da concentração de glicina sináptica recuperou a função motora dos peixes, reforçando a hipótese de que o acúmulo de glicina está mediando os achados da HNC (Riche et al. 2018). Por outro lado, os camundongos desenvolvem hidrocefalia (discutida a seguir) e malformações encefálicas, mostrando-se um modelo fidedigno de HNC (Pai et al. 2015; Santos et al. 2019).

I.1.4 Bezafibrato

Bezafibrato é um composto do grupo dos fibratos, amplamente usado no tratamento de dislipidemias (Wang et al. 2015). Assim como os outros fármacos desse grupo, o bezafibrato é um agonista de receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR), ativando vias de sinalização e fatores de transcrição promotores de proliferação celular e biogênese mitocondrial (Wenz et al. 2008). Além do seu uso clássico, no tratamento de doenças cardiovasculares (Goldenberg et al. 2008), o bezafibrato tem sido sugerido como adjuvante terapêutico para doenças neurológicas (Corona e Duchon

2015), e seu benefício também já foi demonstrado em modelos animais para outros erros inatos do metabolismo (da Rosa-Junior et al. 2019; Grings et al. 2017).

I.1.5 Defeitos do tubo neural, hidrocefalia e o metabolismo de um carbono

Espinha bífida e anencefalia são exemplos de defeitos do tubo neural (DTN) que ocorrem por uma falha no dobramento embrionário do tubo neural (Greene e Copp 2009). A hidrocefalia também é uma anomalia congênita que leva ao alargamento dos ventrículos e subsequente patologia (Rekate 2009). Embora sejam relativamente comuns, com prevalência de aproximadamente 1:1.000 nascimentos vivos, a exata causa dessas condições não é conhecida (Dewan et al. 2018). É bem aceito que envolva tanto fatores genéticos como ambientais. Destes, o envolvimento do metabolismo de um carbono é um forte candidato, já que a deficiência materna de folato predispõe ao aparecimento de DTN, ao passo que a suplementação materna com ácido fólico pode reduzir a ocorrência dessa condição (Beaudin e Stover 2009).

A reação do SCG produz 5,10-metilenotetrahidrofolato, um intermediário do metabolismo de um carbono (Kikuchi et al. 2008). Sendo assim, é possível que deficiências no SCG também estejam envolvidas no aparecimento de DTN (Narisawa et al. 2012). Além disso, deve ser considerado que a hidrocefalia é um achado característico de aproximadamente 8% dos pacientes com HNC (Hennermann et al. 2012; Hoover-Fong et al. 2004). Nesse sentido, alguns dados já demonstraram que existe uma relação entre os genes que codificam as proteínas do SCG e DTN tanto em animais como em humanos (Narisawa et

al. 2012). Em um modelo de camundongo *knockout* para o gene *Gldc*, o análogo murino do gene *GLDC* humano, foi visto que esses animais apresentam um fenótipo condizente com HNC e ainda têm maior tendência a terem DTN e hidrocefalia, os quais são totalmente prevenidos quando as genitoras são suplementadas com ácido fórmico, um doador de um carbono. No entanto, outros aspectos característicos da HNC não são alterados pelo ácido fórmico, como a presença de altas concentrações de glicina (Leung et al. 2017; Pai et al. 2015). Nos estudos com este modelo, os animais que sobreviviam após 5 semanas tiveram uma frequência de hidrocefalia de 20-25% entre os homozigotos mutantes (Pai et al. 2015).

Considerando-se essa relação entre o metabolismo de um carbono, defeitos congênitos e o SCG e seus genes correspondentes, os quais já são expressos no neuroepitélio no dia embrionário E9,5 (Pai et al. 2015), fica clara a importância da atividade desse sistema já no período gestacional.

I.1.6 Equilíbrio redox

I.1.6.1 Espécies reativas e radicais livres

Os elétrons de uma molécula geralmente orbitam em pares. As chamadas espécies reativas são moléculas instáveis e com alta reatividade, portanto, sendo capazes de reagir rapidamente com outras moléculas. Essas espécies reativas podem apresentar tanto elétrons pareados (em pares) quanto desemparelhados. Contudo, no caso de espécies reativas com um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, que estão “sozinhos” em um determinado orbital, essas são chamadas de radicais livres. Apesar de os radicais livres serem instáveis, eles possuem diferentes níveis de reatividade; no entanto,

devido ao elétron desemparelhado, todos os radicais livres interagem facilmente com moléculas não-radicaais, podendo gerar novos radicais, causando assim a perpetuação dessa reação (reação em cadeia) (Halliwell 1994). Um destes radicais livres é o hidroxil, que potencialmente reage com quaisquer moléculas biológicas, tendo meia vida curta e assim oxidando quaisquer moléculas próximas do seu sítio de formação, como ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos ou proteínas (Pastor et al. 2000).

Os radicais livres são produzidos em diferentes processos fisiológicos e, portanto, possuem uma função biológica. Nesse sentido, o óxido nítrico é um importante vasodilatador, ao passo que o ânion superóxido, gerado pela redução parcial de oxigênio molecular, é produzido por células do sistema imune que visam eliminar agentes infecciosos (Halliwell e Gutteridge 1984). Sabe-se também que o ânion superóxido é produzido em quantidades relevantes pela cadeia transportadora de elétrons. Os radicais ainda podem reagir entre si, como o óxido nítrico e o superóxido que, ao reagirem, produzem peroxinitrito, um composto não radical, porém tóxico (Halliwell 1994). Por outro lado, dentre as espécies reativas não radicais, o peróxido de hidrogênio é o mais abundante, sendo uma importante molécula sinalizadora de processos celulares e que tem função fundamental em peroxissomos, onde favorece a degradação de outras moléculas.

I.1.6.2 Defesas antioxidantes

Considerando-se a velocidade de reação das espécies reativas com moléculas biológicas, os organismos desenvolveram mecanismos de reparo e prevenção de dano oxidativo. Dentre esses mecanismos, as enzimas

antioxidantes estão entre os mais importantes, uma vez que podem otimizar o *clearance* de espécies reativas, como a conversão de ânion superóxido, um radical livre, em peróxido de hidrogênio, um não radical, a qual é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). As células expressam diferentes isoformas dessa enzima dependendo do compartimento, incluindo mitocôndrias, onde o vazamento de elétrons da cadeia transportadora é considerado a mais importante fonte geradora de radicais livres das células (Halliwell 1994). Tanto o peróxido de hidrogênio resultante da redução de superóxido como aquele produzido fisiologicamente nos peroxissomos deve ter sua concentração finamente controlada. Para isso, as peroxirredoxinas são as enzimas mais importantes envolvidas na eliminação de peróxido de hidrogênio, contribuindo para a regulação das concentrações fisiológicas dessa molécula para funções de sinalização celular (Halliwell 2012). Além disso, enquanto os peroxissomos expressam a enzima catalase (CAT), que finaliza a redução do peróxido de hidrogênio à água, em outros compartimentos encontra-se a enzima glutathiona peroxidase (GPx), uma selenoproteína que, além de detoxificar o peróxido de hidrogênio, também interage com peróxidos orgânicos numa reação de oxirredução dependente da oxidação de GSH (Gutteridge 2007; Halliwell 1994). A GSH também é utilizada pela enzima glutathiona S-transferase (GST), que a conjuga com xenobióticos, reduzindo a toxicidade desses compostos. Para a manutenção do *pool* de GSH, a enzima glutathiona redutase (GR) reduz novamente a glutathiona oxidada (GSSG) com a oxidação simultânea de um NADPH. Por sua vez, é necessário também manter a razão NADPH/NADP⁺ normal, o que é feito pela glicose-6-fosfato desidrogenase

(G6PDH), enzima do ciclo das pentoses fosfato cuja reação reduz o cofator NADP^+ a NADPH e assim contribui para a reciclagem de GSSG em GSH .

A GSH é um tripeptídeo composto por resíduos de glutamato, glicina e cisteína, sendo o grupamento tiol deste aminoácido o responsável pelo seu poder redutor. Além de funcionar como substrato de enzimas antioxidantes, com sua função redutora, também pode sequestrar diretamente moléculas pró-oxidantes. A síntese de GSH é limitada pela velocidade da enzima glutamato cisteína ligase (GCL), seguida pela GSH sintetase, que adiciona o resíduo de glicina. Visto que a GSH é o antioxidante mais abundante em células de mamíferos, muitas patologias estão ligadas à desregulação da sua síntese. Nesse contexto, já está bem descrito que os fatores de transcrição fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e fator nuclear *kappa* B (NFkB) podem influenciar a síntese da GSH (Lu 2013).

Além dos antioxidantes endógenos, os organismos também dispõem de antioxidantes provenientes da dieta, como as vitaminas E e C, carotenoides e flavonoides. Contudo, há trabalhos sugerindo que antioxidantes sintetizados pelas células são mais importantes, desde que não haja uma deficiência na aquisição dos antioxidantes exógenos que são essenciais para a síntese de determinadas biomoléculas (Halliwell 2011).

I.1.6.3 Estresse oxidativo

Quando há distúrbios na remoção de espécies reativas, um aumento da sua produção, ou ambos, pode ocorrer o que se chama de estresse oxidativo, em que as espécies de oxigênio e nitrogênio interagem e oxidam biomoléculas. Isso pode ocorrer em pequena escala, e as defesas antioxidantes devem ser

capazes de conter e reparar o dano oxidativo. No entanto, havendo disfunção nessas defesas ou produção exacerbada de radicais livres e não radicais, a oxidação pode levar a modificações estruturais e consequente perda de função, como a modificação de grupamentos tióis em proteínas, peroxidação de lipídios de membrana, levando à sua desorganização, entre outras alterações, caracterizando o quadro de estresse oxidativo (Gutteridge 2007; Halliwell 1994).

I.1.7 Sistema glutamatérgico

O glutamato é o principal e mais abundante neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, utilizado em cerca de 50-70% das sinapses corticais (Kalivas 2009; Reis et al. 2009). Ele pode ser mobilizado pela desaminação da glutamina catalisada pela enzima glutaminase em neurônios, ou sintetizado *de novo* em astrócitos por reações que utilizam o α -cetoglutarato (Schousboe 2019).

I.1.7.1 Receptores glutamatérgicos

O glutamato age através de diversos tipos de receptores, os quais podem ser divididos em duas categorias: receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos, como o nome sugere, são canais iônicos que, quando abertos pela ligação de um agonista, permitem a entrada de determinados cátions que desencadeiam diferentes ações no meio intracelular. Estes são os receptores canino, ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico (AMPA), δ e o já mencionado NMDAr (Cull-Candy et al. 2001; Traynelis et al. 2010).

O NMDAr é um heterotetrâmero, necessariamente formado por pelo menos duas subunidades 1 (NR1), onde se encontra o sítio de ligação da glicina, e outras duas subunidades, sendo pelo menos uma delas é do tipo 2 (NR2), onde se encontra o sítio de ligação para o glutamato (Mayer 2016). Já foram descritas diversas combinações dessas subunidades entre si, incluindo os diferentes tipos de NR2 e uma terceira (NR3) (Mayer 2016; Pinky et al. 2018), sendo que diferentes conformações já foram encontradas em regiões cerebrais (Cull-Candy e Leszkiewicz 2004) e subpopulações neuronais e conferem propriedades distintas ao receptor, além de serem diferentemente expressas durante o desenvolvimento (Cull-Candy et al. 2001; Pinky et al. 2018). O funcionamento do receptor é dependente da ligação tanto do glutamato, o agonista deste receptor, como da glicina, seu co-agonista. A glicina se liga na subunidade NR1 e modula a amplitude e a duração de abertura do canal, permitindo o influxo de Ca^{2+} (Cummings e Popescu 2015; Zhou e Danbolt 2014).

As sinapses via NMDAr estão relacionadas, entre outros, com plasticidade neural, e a disfunção desses receptores já foi implicada em muitas doenças, como acidentes vasculares cerebrais, esclerose múltipla e doença de Parkinson (Lau e Tymianski 2010). O acúmulo de glutamato na fenda sináptica pode levar à excitotoxicidade, quadro caracterizado pela hiperativação dos NMDAr, provocando um excesso de Ca^{2+} intracelular. O tamponamento celular desse cátion é feito, primariamente, pelo retículo endoplasmático, porém já foi relatado que as mitocôndrias também têm importante papel nesse processo. Se o influxo de Ca^{2+} persistir além da capacidade de tamponamento, a célula fica suscetível a disfunções da cadeia transportadora de elétrons e

superprodução de espécies reativas, o que pode levar à morte celular (Vishnoi et al. 2016).

I.1.7.2 Transportadores de glutamato

Para evitar a excitotoxicidade, a concentração de glutamato na fenda sináptica deve ser finamente controlada. Isso é realizado pelos transportadores de glutamato. Já foram descritos cinco destes, os chamados transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT 1-5). O EAAT1, mais conhecido como GLAST (transportador de glutamato e aspartato), é o único transportador exclusivamente expresso na glia e representa a maior parte dos transportadores em cerebelo, apesar de ser expresso por todo o encéfalo (Danbolt et al. 2016). O GLT-1 (transportador de glutamato 1, EAAT2) foi o primeiro transportador a ser descrito, provavelmente pela sua abundância, uma vez que representa até 1% de todo o conteúdo proteico no cérebro (Lehre e Danbolt 1998). Estima-se que 95% de toda a captação de glutamato seja mediada por GLT-1, que é majoritariamente expresso em astrócitos, porém também está presente em pequena proporção em terminais axonais (Danbolt et al. 2016). O EAAT3 (carreador de aminoácidos excitatórios 1, EAAC1), por sua vez, é exclusivamente encontrado em dendritos e soma de neurônios, e expresso em virtualmente todos os neurônios através do sistema nervoso central (Danbolt et al. 2016; Holmseth et al. 2012). Os EAAT4 e 5 são transportadores lentos e de alta condutividade a cloreto e, diferentemente dos outros, têm menor importância para o sistema nervoso central (Danbolt et al. 2016; Gameiro et al. 2011; Mim et al. 2005).

Uma vez que o glutamato é internalizado nos astrócitos, a enzima glutamina sintetase condensa uma molécula de amônia a esse aminoácido, convertendo-o em glutamina, a qual não tem atividade sináptica e pode ser liberada com segurança para captação por neurônios. Nessas células ocorre a desaminação de volta a glutamato pela glutaminase, fechando o chamado ciclo glutamato-glutamina (Olsen e Sonnewald 2015). É bem aceito que astrócitos são os grandes responsáveis pela manutenção da homeostase glutamatérgica (Mahmoud et al. 2019).

I.1.8 Mielina

Os oligodendrócitos projetam longas extensões de sua membrana plasmática em camadas concêntricas em torno de axônios (processos mielinizantes), formando a bainha de mielina, uma estrutura formada por uma membrana lipídica rica em glicofosfolípídeos e colesterol. A mielina, ao contrário do que se pensava anteriormente, não é uma estrutura passiva que apenas facilita a condutividade axonal, mas também é importante para o fornecimento de suporte metabólico e trófico para o axônio que envolve (Kondiles e Horner 2018; Saab e Nave 2017). É importante ressaltar que o próprio processo de mielinização depende tanto de sinais intrínsecos do oligodendrócito como vindos de outras células, tais como neurônios (Monje 2018).

Ao contrário do sistema nervoso periférico em que a proporção é de um axônio por célula de Schwann, muitos axônios no sistema nervoso central podem ser mielinizados por um único oligodendrócito. A população dessas células é mantida por seus precursores, as células precursoras de

oligodendrócitos (OPCs), células unipotentes que podem diretamente maturar a oligodendrócitos, ou fazer mitoses simétricas ou assimétricas, a última gerando uma OPC e um oligodendrócito, sendo as células mais proliferativas no cérebro adulto. As OPCs estão presentes desde o desenvolvimento pré-natal e persistem até a idade adulta, formando novos oligodendrócitos (Monje 2018). Essas células também são chamadas de glia NG2 devido à expressão de antígeno proteoglicano condroitina sulfato neurônio/glia 2 (NG2), e representam 5-10% de toda a população celular no cérebro, distribuída igualmente em todas as regiões (Eugenin-von Bernhardt e Dimou 2016).

No sistema nervoso central, aproximadamente 30% do conteúdo de proteína da mielina correspondem à proteína básica da mielina (MBP), responsável pela adesão das superfícies citosólicas das camadas da mielina. A MBP é considerada a única proteína indispensável para a formação da mielina, e sua deficiência está implicada em doenças com leucodistrofia como a esclerose múltipla (Boggs 2006; Han et al. 2013). A MBP interage amplamente com lipídios da membrana e também com outras moléculas proteicas, como actina, tubulina e especialmente calmodulina, cuja interação com a MBP diminui a sua ligação com superfícies lipídicas. Por sua vez, a glicoproteína associada à mielina (MAG), assim chamada pela grande quantidade de modificações pós-traducionais na sua estrutura, está localizada na camada mais profunda da mielina, na porção não compactada, e interage com gangliosídios. Visto que animais deficientes para a MAG apresentam neurodegeneração, é possível que a sinalização a partir dessa proteína entre oligodendrócito e axônio seja necessária para a manutenção dessas estruturas (Han et al. 2013; Schmitt et al. 2015).

I.2. OBJETIVOS

I.2.1 Objetivo geral

Considerando-se que os mecanismos neurotóxicos desencadeados pela glicina que possam estar envolvidos no aparecimento e progressão dos sintomas e achados neuropatológicos na HNC ainda não estão totalmente estabelecidos, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros bioquímicos e celulares em cérebro de ratos após a administração intracerebral de glicina.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da glicina sobre:

a) Parâmetros de estresse oxidativo em diferentes estruturas cerebrais de ratos de 30 dias de vida e o potencial protetor do bezafibrato sobre as possíveis alterações;

b) Marcadores de neurônios, glia e mielina em diferentes estruturas cerebrais 14 dias após a administração da glicina em animais de 1 dia de vida (neonatos);

c) Parâmetros de homeostase glutamatérgica em córtex cerebral e estriado 14 dias após a injeção do aminoácido em animais de 1 dia de vida (neonatos);

d) Vias de sinalização importantes para homeostase celular e marcadores de dano celular 5 dias após a injeção do aminoácido em animais de 1 dia de vida (neonatos).

PARTE II
ARTIGOS CIENTÍFICOS

Capítulo I

Bezafibrate Prevents Glycine-Induced Increase of Antioxidant Enzyme Activities in Rat Striatum

Belisa Parmeggiani, Mateus Grings, Nevton Teixeira da Rosa-Junior, Renata Britto, Moacir Wajner, Guilhian Leipnitz

Artigo científico publicado no periódico *Molecular Neurobiology* 56:29–38 (2019)

Capítulo II

Glycine alters mitochondrial metabolism and redox homeostasis signaling, myelin structure and glial markers in a neonatal model for non ketotic hyperglycinemia

Belisa Parmeggiani, Marian Flores Signori, Cristiane Cecatto,
Débora Guerini Souza, Diogo Onofre Gomes de Souza,
Moacir Wajner, Guilhian Leipnitz

Artigo científico em produção a ser submetido no periódico
Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease

PARTE III
DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E
PERSPECTIVAS

III.1 DISCUSSÃO

A HNC é uma doença genética de herança autossômica recessiva causada por defeitos no SCG, levando ao acúmulo de glicina nos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes afetados. Os principais sintomas da doença são hipotonia, dificuldade de se alimentar, convulsões e dificuldades respiratórias que podem levar a óbito. A precocidade no início dos sintomas geralmente está relacionada a um pior prognóstico e, portanto, pacientes acometidos pela forma clássica neonatal da doença geralmente apresentam sequelas neurológicas mais graves (Swanson et al. 2015; Van Hove et al. 1993). Exames de imagem mostram atrofia cortical e cerebelar, hipomielinização, hidrocefalia e disgenesia do corpo caloso, um achado comum da HNC que pode ser evidenciado já no período gestacional (Butler et al. 2017; Hamosh e Johnston 2001; Hamosh e Johnston 2001; Pai et al. 2015).

Apesar de os mecanismos do dano cerebral característico da HNC ainda não estarem totalmente elucidados, é bem aceito na literatura que o acúmulo de glicina, especialmente no sistema nervoso central, está fortemente relacionado com fenótipo (Hamosh e Johnston 2001; Hoover-Fong et al. 2004; Swanson et al. 2015). A excitotoxicidade via NMDAr é frequentemente implicada na HNC, mecanismo que pode provocar disfunção redox e energética nas células, sendo que ambos efeitos já foram observados tanto *in vitro* como *ex vivo* em estruturas cerebrais expostas à glicina (Busanello et al. 2010; Leipnitz et al. 2009; Moura et al. 2013; Moura et al. 2014; Seminotti et al. 2011). Com relação ao cérebro em desenvolvimento, estudos realizados em roedores nos períodos pré- e neonatal, utilizados como modelos para a HNC,

evidenciaram alterações estruturais e celulares no cérebro desses animais (Moura et al. 2016; Pai et al. 2015). Também foi demonstrado que antioxidantes e moduladores do NMDAr alteram ou previnem os efeitos deletérios da glicina, sugerindo fortemente o envolvimento de estresse oxidativo e excitotoxicidade na patologia da HNC (Moura et al. 2013; Moura et al. 2018; Moura et al. 2016). Ainda assim, pouco se sabe sobre vias de sinalização específicas potencialmente afetadas pela glicina, além de não haver estudos abordando a neurotransmissão glutamatérgica e a hipomielinização, esta um achado clássico da HNC.

No primeiro capítulo desta tese, foram estudados os efeitos da glicina em animais de 30 dias de vida sobre parâmetros de estresse oxidativo. Os animais foram eutanasiados 30 min após a injeção intracerebral do aminoácido e tiveram estriado, hipocampo e córtex cerebral dissecados. Foi observado, com relação a defesas antioxidantes, que a glicina induziu um aumento na atividade das enzimas SOD, GPx, GR e G6PDH em estriado. Em contraste, quando investigamos os parâmetros níveis de malondialdeído (MDA), concentrações de GSH, oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), conteúdo de grupamentos sulfidríla e formação de carbonilas, não observamos modificações significativas em estriado. Em conjunto, esses achados sugerem que a glicina potencialmente inicia uma resposta pró-oxidante, a qual induz um aumento na atividade dessas enzimas, removendo as espécies reativas formadas e mantendo o conteúdo de GSH normal, o que preveniu o dano oxidativo. Em concordância com essa hipótese, verificamos que a exposição *in vitro* de sobrenadantes de estriado à glicina durante 20 min (curto período de

tempo) já foi suficiente para causar a diminuição das concentrações de GSH e o aumento dos níveis de MDA. De forma interessante, um estudo já demonstrou que um acúmulo transitório de glicina por bloqueio do seu transportador GlyT1 induz proteção, a curto prazo, contra morte celular mediada por excitotoxicidade (Pinto et al. 2015). Assim, pode ser especulado que a exposição direta à glicina seja capaz de induzir disfunção na homeostase redox (abordagem *in vitro*), porém, quando administrada em um sistema complexo (por exemplo, na abordagem *ex vivo* através da injeção intracerebral), é possível que a ativação de determinadas vias de sinalização provoque uma resposta protetora a esses efeitos tóxicos causados pela glicina, o que incluiria uma *upregulation* de enzimas antioxidantes. Além disso, não podemos descartar a hipótese de que a concentração de glicina atingida pela injeção intracerebral tenha sido capaz de induzir adaptação, ao passo que a concentração *in vitro* foi suficientemente elevada para causar dano pronunciado.

Por outro lado, um trabalho anterior de nosso grupo evidenciou que a administração intraestriatal de glicina (4 μmol) em ratos induz dano oxidativo lipídico e proteico (Seminotti et al. 2011). Apesar de a dose utilizada nesse estudo ser menor que a do presente trabalho (5 μmol), deve ser considerado que a injeção no estriado possivelmente causa dano por ser uma aplicação direta nessa estrutura cerebral, o que seria similar ao experimento *in vitro* realizado em sobrenadantes de estriado, em comparação à injeção intracerebroventricular da glicina, a qual permite a difusão do metabólito por todo o cérebro e não apenas numa estrutura cerebral isolada.

Com relação ao hipocampo, a glicina diminuiu a concentração de GSH e o conteúdo total de glutathiona (reduzida e oxidada), além de ter diminuído a razão GSH/GSSG nessa estrutura, porém não alterou a atividade da enzima GCL, o passo limitante da síntese desse tripeptídeo. Sendo assim, outros mecanismos não investigados neste estudo devem estar envolvidos nesses efeitos. É necessário ressaltar aqui que não apenas encontramos um aumento na oxidação de GSH (formação de GSSG), mas também uma diminuição do seu *pool* total, sugerindo menor síntese ou maior degradação dessa molécula. Ainda que a atividade da GCL não tenha sido alterada, é possível que a formação de GSH tenha sido prejudicada no passo seguinte, reação catalisada pela glutathiona sintetase, cuja deficiência já foi associada com anormalidades psiquiátricas e cognitivas (Njalsson et al. 2005), ou ao nível de fornecimento de substrato, já que estudos verificaram diminuição na síntese de GSH por bloqueio no transportador de cisteína xCT em outras condições patológicas (Kritis et al. 2015).

Curiosamente, não foram observadas modificações em nenhum dos parâmetros analisados em córtex cerebral. Outros trabalhos demonstraram que não apenas as estruturas cerebrais podem responder de maneira distinta a um mesmo estímulo, sendo ele pró-oxidante (Piloni et al. 2017) ou antioxidante (Franco-Enzastiga et al. 2017), mas mesmo as diferentes regiões corticais podem apresentar respostas diferenciadas (Al-Amin et al. 2015). Isso pode estar relacionado tanto à fisiologia das subdivisões corticais bem como às suas características bioquímicas, visto que diferem até mesmo na capacidade de captação de glutamato (Romanos et al. 2019). Portanto, pode ser especulado

que a glicina provoque alterações redox em determinadas regiões corticais, porém esse efeito não foi verificado em nosso estudo porque utilizamos todo o córtex cerebral para a avaliação dos parâmetros, sem dissecar as diferentes regiões dessa estrutura. Além disso, já foi descrito que o estriado e o hipocampo reagem a insultos de maneira mais semelhante entre si, comparativamente ao córtex cerebral (Franco-Enzastiga et al. 2017; Piloni et al. 2017).

Há uma heterogeneidade em nossos resultados demonstrados no capítulo I, que pode ter explicação nas diferentes características bioquímicas e metabólicas das estruturas cerebrais estudadas. A própria expressão do SCG deve ser considerada, uma vez que não trabalhamos com animais deficientes para as proteínas constituintes desse sistema, sendo que hipocampo, cerebelo e bulbo olfatório têm maior expressão do SCG do que outras regiões cerebrais (Sakata et al. 2001), provavelmente conferindo ao hipocampo uma maior capacidade de metabolizar a glicina comparativamente às outras estruturas. O hipocampo também é mais eficiente no *clearance* de glutamato, tanto pela difusão pós-sináptica mais rápida como pelo fato de seus transportadores de glutamato terem maior tolerância à saturação do que os do estriado. Enquanto essas diferenças fisiológicas são importantes para que cada uma dessas estruturas execute suas funções corretamente, é possível que o *clearance* de glutamato mais lento no estriado o torne mais susceptível ao dano via NMDAr, como por exemplo ocorre na doença de Huntington (Pinky et al. 2018). Além disso, as diferenças na composição do NMDAr entre as estruturas encefálicas também podem contribuir para a variação nos efeitos induzidos pela glicina que

foram observados, visto que as diferentes subunidades conferem uma afinidade diferenciada para esse aminoácido (Goebel e Poosch 1999). Nesse contexto, receptores com subunidade NR2A são chamados sinápticos, têm maior afinidade por D-serina e transduzem preferencialmente sinalização de sobrevivência, enquanto receptores contendo subunidade NR2B são extrasinápticos, têm maior afinidade por glicina e desencadeiam sinalização que induz excitotoxicidade e morte celular (Zhang e Luo 2013). Com isso em mente, uma maior susceptibilidade do estriado ao dano parece ser plausível considerando que essa região expressa, proporcionalmente, maior quantidade de NR2B do que NR2A, diferentemente do córtex cerebral e do hipocampo (Cowan e Raymond 2006). Há também diferença na capacidade mitocondrial de retenção de Ca^{2+} , sendo que as mitocôndrias neuronais e astrocíticas no estriado têm capacidade menor do que as corticais (Oliveira e Goncalves 2009), podendo levar ao extravasamento desse íon e indução de dano. Ainda foi constatado em um estudo que o ácido quinolínico, um agonista NMDAr, causa efeitos distintos em diferentes regiões cerebrais com relação a dano oxidativo (Vandresen-Filho et al. 2015), e em outro trabalho, foi observado que a própria glicina provoca alterações bioenergéticas diferentes em córtex cerebral e estriado (Moura et al. 2013).

Também estudamos os efeitos do bezafibrato sobre as alterações provocadas pela glicina. O bezafibrato é um pan-agonista de receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR), e a ativação dessa via de sinalização promove a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios e energético, defesas antioxidantes e biogênese mitocondrial, dentre

outros processos (Corona e Duchon 2015). Esse composto é comumente utilizado no tratamento de dislipidemias, porém estudos com modelos animais de doenças neurodegenerativas como a doença Huntington vêm mostrando seu potencial neuroprotetor (Johri et al. 2012).

Dentre as enzimas antioxidantes que tiveram sua atividade aumentada pela glicina em estriado, o pré-tratamento com bezafibrato preveniu o aumento na atividade da SOD e da GR, atenuou o aumento da GPx, porém não teve efeito sobre a atividade aumentada da G6PDH, nem sobre a diminuição nas concentrações de GSH hipocampal. Considerando-se que o bezafibrato geralmente leva ao aumento na expressão de enzimas antioxidantes (Chaturvedi e Beal 2013), nossos resultados são aparentemente contraditórios. No entanto, pode ser sugerido que, pela indução de biogênese mitocondrial e consequente aumento na expressão de subunidades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Valero 2014), a suposta superprodução inicial de espécies reativas provocada pela glicina foi prevenida, removendo a necessidade de promover a expressão gênica de mais defesas antioxidantes em primeiro lugar. Essa suposição é reforçada pelo fato de que prejuízos na bioenergética e homeostase mitocondrial provocados por glicina foram, de fato, encontrados anteriormente em outros modelos em períodos relativamente curtos após a administração de glicina (Busanello et al. 2010; Moura et al. 2013; Moura et al. 2016).

Em conjunto, os achados do capítulo I demonstram uma maior susceptibilidade do estriado aos efeitos tóxicos da glicina, provavelmente iniciados por um prejuízo na função mitocondrial, que levaria a um desequilíbrio

redox e consequente dano celular. Além disso, vimos que o bezafibrato poderia ser utilizado como adjuvante no tratamento da HNC, uma vez que demonstrou efeitos benéficos no nosso e em outros modelos de EIM (da Rosa-Junior et al. 2019; Grings et al. 2017).

No segundo capítulo, utilizamos um modelo de injeção intracerebral de glicina (0,2 μmol) em animais neonatos, de modo a melhor mimetizar a forma clássica da HNC e estudar o impacto da glicina no cérebro em desenvolvimento. Para isso, iniciamos com a análise por fluorescência de MBP, MAG e FluoroMyelinTM, marcadores de mielina, em corpo caloso, córtex cerebral e estriado de animais eutanasiados com 15 dias de vida. Nossos resultados mostraram uma diminuição acentuada na fluorescência de MBP em corpo caloso e estriado, e uma tendência à diminuição em córtex cerebral dos animais do grupo glicina. Da mesma forma, a marcação de MAG foi significativamente diminuída no corpo caloso, com tendência à redução no estriado e sem alteração no córtex cerebral. A modificação na marcação dessas proteínas, esses experimentos, em conjunto com a marcação com a sonda lipofílica FluoroMyelinTM, sugerem um prejuízo na organização e compactação da mielina, mais evidente no estriado, onde os feixes axonais se mostram mais difusos e menos compactados.

Alterações na MBP e MAG já foram descritas em doenças desmielinizantes (Boggs 2006), porém a ordem dos eventos não é clara, isto é, se a falta dessas proteínas leva à perda de mielina, ou se estão diminuídas porque há menos áreas mielinizadas. Nossos achados mostrando que os feixes axonais estão mais difusos devido à glicina são condizentes com o fato

de MBP ser responsável pela compactação das camadas lamelares da mielina. Além disso, a MBP e a MAG também interagem amplamente com lipídios das membranas, e alterações nessa organização podem modificar a conformação de outras proteínas associadas à membrana, além dos próprios lipídios, potencialmente prejudicando a sinalização. É importante lembrar também que a MBP possui dois sítios de ligação para calmodulina, uma proteína responsiva ao Ca^{2+} , podendo ter sua função alterada por esse cátion, assim como por MAPKs (Boggs 2006), as quais já foram demonstradas estar alteradas em um modelo de HNC (Moura et al. 2018).

Contemplando a hipótese de que a diminuição da MBP e MAG é causada por alterações na própria mielinização, deve-se pensar na possibilidade de estar ocorrendo uma disfunção em oligodendrócitos, as células mielinizantes no sistema nervoso central. Nesse contexto, um modelo da doença de Parkinson mostrou, por exemplo, que a deposição de α -sinucleína diminui os níveis de MBP e leva a uma menor maturação de oligodendrócitos em estriado, causando problemas de mielinização nessa estrutura ao longo do tempo (Grigoletto et al. 2017). Ainda deve ser considerado que os oligodendrócitos expressam NMDAr responsivos a glutamato, os quais são necessários para controlar a liberação de lactato das células gliais, majoritariamente dos oligodendrócitos, a fim de suprir a demanda energética axonal no corpo caloso (Meyer et al. 2018; Saab e Nave 2017). A composição desse receptor na mielina difere daqueles em neurônios por conter alta expressão subunidades NR2C/D e/ou NR3A (Paoletti e Neyton 2007), e pode mediar dano à mielina por aumento do influxo de Ca^{2+} , como comentado anteriormente (Doyle et al. 2018; Rinholm et al. 2016), especialmente porque

receptores que co-expressam subunidades NR1 e NR3 podem ser ativados exclusivamente por agonistas do sítio de ligação da glicina, dispensando glutamato para sua atividade (Pina-Crespo et al. 2010). Ainda tendo em vista que os receptores estão presentes nos processos mielinizantes dos oligodendrócitos, é possível que haja uma concentração relativa maior de Ca^{2+} nesse local em resposta ao agonista (Karadottir et al. 2005). Nesse contexto, é importante frisar que, apesar de culturas de astrócitos do corpo caloso expressarem toda a maquinaria necessária para o metabolismo do glutamato (Goursaud et al. 2009), lesões no corpo caloso induzidas por glutamato já foram documentadas *in vivo* (Starkey et al. 2017) e *in vitro*, esta comprovadamente mediada por NMDAr (Zhang et al. 2013). Sendo assim, é possível que o NMDAr esteja mediando excitotoxicidade que leva ao dano à mielina (Benarroch 2011).

O corpo caloso foi dramaticamente afetado no nosso modelo, em concordância com os achados clínicos da HNC (Swanson et al. 2015). Diferentemente de outras malformações apresentadas pelos pacientes, como hidrocefalia, que é principalmente relacionado ao metabolismo de um carbono (Pai et al. 2015), a disgenesia do corpo caloso, apesar de já ser visualizada em estágio pré-natal (Paupe et al. 2002), parece estar ligada ao acúmulo de glicina, o que é reforçado pelo relato de um paciente afetado por HNC causada por deficiência do transportador de glicina GLYT1, que também apresentava malformação do corpo caloso (Alfallaj e Alfadhel 2019). Outras patologias do sistema nervoso central, tipicamente associadas à mielina ou não, mostram alterações no corpo caloso, como esclerose múltipla (Beckmann et al. 2018), doença de Huntington (Pepin et al. 2016) e depressão (Coloigner et al. 2019),

porém os mecanismos do dano à substância branca variam. Quanto à diferente magnitude de efeito nas estruturas estudadas, dados da literatura sugerem que o corpo caloso é mais sensível a dano do que outras regiões. Isso já foi observado em estudos com modelos da doença de Huntington caracterizada por atrofia estriatal, mostrando comprometimento da mielina especialmente em corpo caloso (Pepin et al. 2016), antecedente ao dano neuronal em estriado e ligado aos oligodendrócitos (Teo et al. 2016).

A partir desses dados, surgiu-nos a seguinte questão: o dano à mielina causado pela glicina é devido à falta de OPCs (também chamadas de glia NG2) e, portanto, de oligodendrócitos? Para tentar responder essa pergunta, fizemos uma marcação por imunofluorescência de NG2, um marcador de OPCs, e verificamos uma redução na fluorescência total causada pela glicina no estriado de animais de 15 dias de vida. A proteína NG2 nas OPCs está relacionada a vias de migração e sobrevivência, função neuromodulatória via receptores AMPA e adesão celular (Sakry e Trotter 2016). Além disso, o NG2 também é expresso em algumas populações de pericitos, células do sistema vascular que compõem a barreira hematoencefálica, porém é sugerido que não tenha a mesma função nos dois tipos celulares, uma vez que glutamato induz modificações estruturais em NG2 das OPCs que não são visualizadas em pericitos (Eugenin-von Bernhardt e Dimou 2016). Dessa forma, o menor conteúdo de NG2 pode representar uma menor quantidade de OPCs, células altamente mitóticas que mantêm o número de oligodendrócitos, responsáveis pela mielinização. Além disso, a diminuição na fluorescência dessa proteína pode representar tanto uma perda de função como uma diminuição no próprio *pool* de glia NG2 (Sakry e Trotter 2016). Analisando em conjunto, nossos

dados sobre mielinização indicam que o comprometimento da mielina verificado nos animais injetados com glicina pode ser por hipomielinização e/ou desmielinização.

Uma vez que nossos resultados indicam que as OPCs foram alteradas pela glicina, decidimos determinar, por western blotting, o conteúdo de marcadores celulares de neurônios e astrócitos em córtex cerebral e estriado de animais de 15 dias, células que também podem ter sido afetadas pela glicina e estarem envolvidas no dano à mielina. Verificamos que o imunoc conteúdo de NeuN foi reduzido em estriado, sem alteração em córtex cerebral. A marcação com a proteína NeuN é amplamente aceita e utilizada como um marcador neuronal que não faz distinção entre os tipos de neurônios, e sua diminuição é, geralmente, relacionada à perda neuronal. Ressalte-se que, apesar de o pico de expressão de NeuN ser similar em córtex cerebral e estriado, os neurônios de cada estrutura maturam em momentos diferentes (Duan et al. 2016), e a maturação modifica a expressão de subunidades NMDAr em cada região, sendo que no estriado há uma manutenção de alto conteúdo de receptores contendo a subunidade NR2B (Cowan e Raymond 2006). Isso é fundamental para entender a maior vulnerabilidade do estriado a dano excitotóxico, porque a expressão de NR2B aumenta a afinidade do receptor à glicina (ao invés de D-serina) e a ativação exacerbada dos NMDAr pode então estar ligada à toxicidade e morte celular, em contraste com receptores com NR2A, cuja sinalização geralmente promove sobrevivência (Zhang e Luo 2013).

Nos últimos anos, alguns estudos vêm apontando a necessidade de se interpretar com mais cuidado alterações em NeuN, visto que este marcador é

uma proteína que pode ter sua expressão alterada em determinados tratamentos ou períodos da vida (Duan et al. 2016). De fato, já foi visto que a deleção dessa proteína causa aumento de sinapses excitatórias (Lin et al. 2016), o que é de especial importância para o estriado, já que esta região recebe um grande *input* de sinapses glutamatérgicas (Reig e Silberberg 2016), podendo então aumentar a susceptibilidade de células estriatais à excitotoxicidade. Ainda, num trabalho anterior do nosso grupo, neste mesmo modelo animal, foi observado que não há alteração na marcação imunofluorescente de NeuN em córtex cerebral ou estriado 5 dias ou 2 semanas após a injeção neonatal de glicina (Moura et al. 2016). Visto que naquele estudo foi usada imunofluorescência, uma técnica que propicia uma quantificação menos sensível que a de western blotting, e que não foi feita a contagem de células, acreditamos que nossos achados não estão em conflito com os dados anteriores, e sim acrescentam a essa discussão. Desse modo, apesar de a diminuição de NeuN não significar, necessariamente, perda de neurônios, é fortemente sugestivo de, pelo menos, prejuízos na função dessas células. Além disso, danos à substância branca estão presentes mesmo em doenças neurológicas tipicamente “neurais”, indicando uma relação entre disfunção neuronal e desmielinização (Saab e Nave 2017).

Quanto à GFAP, marcador de astrócitos, houve aumento no imunoconteúdo no estriado de animais de 15 dias após a injeção neonatal de glicina. A GFAP é o principal filamento intermediário de astrócitos, logo é amplamente utilizado para a identificação dessas células, mas também como marcador de reatividade glial, principalmente pela relação entre o aumento dessa proteína com dano cerebral e neurodegeneração (Middeldorp e Hol

2011). Sendo assim, como os marcadores anteriormente discutidos, um aumento no imunoconteúdo de GFAP pode ser interpretado como um aumento no número de astrócitos ou como um efeito direto na expressão da proteína. Dentre as funções atribuídas à GFAP, pode-se citar o suporte à mielinização, a formação da barreira hemato-encefálica, o isolamento de tecido danificado e a supressão de proliferação neuronal, evidenciando a sua óbvia importância não só para os astrócitos propriamente ditos, mas para todo o sistema nervoso central (Brenner 2014). O aumento de GFAP tem sido claramente relacionado a problemas na mielina, já que uma das primeiras descrições da proteína foi em placas do cérebro de pacientes com esclerose múltipla, compostas por axônios desmielinizados e astrócitos (Middeldorp e Hol 2011). Nesse contexto, a doença de Alexander, uma doença genética que provoca o aumento de GFAP, é classicamente caracterizada por leucodistrofia. De forma interessante, a morte neuronal não é comum na doença de Alexander, mas quando ocorre, parece ser correlacionada com áreas de maior *input* glutamatérgico, inclusive encontrando-se perda de neurônios no estriado (Sosunov et al. 2018).

Similarmente à alteração na marcação de NeuN, a alteração em GFAP também foi encontrada apenas em estriado, e não no córtex cerebral. Essa diferença pode ser explicada por diversos fatores, tais como a existência de uma identidade molecular e morfológica específica em astrócitos dependendo da região em que se encontram (Chai et al. 2017) e pelo fato de que as estruturas têm níveis constitutivos de GFAP distintos (Zhang et al. 2019) e, desse modo, a sua resposta a lesões é metabolicamente e temporalmente diferente (Cragolini et al. 2018; Pierozan et al. 2014). Finalmente, neurônios e astrócitos estriatais têm menor capacidade de retenção de Ca^{2+} do que os

corticais, diferença essa encontrada especificamente nas mitocôndrias dessas células, mas não no retículo endoplasmático. É importante ressaltar aqui que o Ca^{2+} tem implicações diretas sobre a homeostase e sobrevivência celulares (Oliveira e Goncalves 2009). Acrescente-se ainda que, em um modelo de doença de Parkinson, as lesões estriatais afetaram áreas distintas do córtex cerebral (Becker et al. 2018), demonstrando mais uma vez a heterogeneidade dessa estrutura e, retomando a discussão do capítulo I, sugerindo a possibilidade de dano em regiões específicas do córtex cerebral, o que não foi avaliado no presente trabalho. Nesse contexto, o trabalho anterior do nosso grupo com o mesmo modelo de injeção neonatal de glicina demonstrou, por imunofluorescência, aumento de GFAP em corpo caloso e de S100B em córtex cerebral e estriado 5 dias após a injeção de glicina em ratos de 1 dia de vida (Moura et al. 2016). Dessa forma, é possível especular que, devido a essa maior susceptibilidade a dano no estriado, essa região se mantenha com alterações astrocitárias aos 15 dias de vida do animal, enquanto o córtex cerebral se recupera desse dano.

O passo seguinte foi o de investigar se há alterações em proteínas tipicamente relacionadas às funções de neurônios e astrócitos já que foram verificadas modificações em NeuN e GFAP. Para isso, realizamos a medida do imunoconteúdo proteico de NR1, a subunidade do NMDAr em que se encontra o sítio de ligação para glicina, do receptor canabinoide 1 (CB1) e de GLAST, transportador de glutamato exclusivamente expresso na glia.

A administração de glicina diminuiu o conteúdo de NR1 nas duas estruturas cerebrais estudadas. O mecanismo envolvido nesse achado parece ser direto, ou seja, já que essa subunidade tem o sítio de ligação para a glicina,

os resultados sugerem um *feedback* negativo pelo excesso de glicina após a injeção desse aminoácido. De fato, já foi visto que o conteúdo proteico de NR1 tem uma *downregulation* em neurônios após a ativação excessiva de NMDAr, numa sinalização dependente de NR2B (Gascon et al. 2005), subunidade que, como já comentado, está envolvida na indução de excitotoxicidade mediada por glutamato (Zhang e Luo 2013). Outro aspecto importante é que a NR1 é expressa ubiquamente por todo o cérebro, sendo que a montagem do NMDAr é necessariamente iniciada pela formação de heterodímeros de NR1. O funcionamento adequado do NMDAr depende, portanto, da presença de NR1, cuja diminuição já mostrou alterar comportamento em modelos animais (Finlay et al. 2015) e modificar a regulação temporal do desenvolvimento do corpo caloso (Elberger e Deng 2003), que também foi uma área bastante afetada em nosso modelo. É relevante mencionar ainda que essa subunidade está sujeita à regulação redox através da oxidação de resíduos de cisteína na sua estrutura, o que diminui a sua atividade e culmina em uma menor expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Ibi et al. 2017), e que estudos anteriores (assim como resultados do capítulo I) já mostraram que a glicina altera a homeostase redox (Leipnitz et al. 2009; Moura et al. 2016; Seminotti et al. 2011). Esses achados em conjunto sugerem potenciais alterações que não foram investigadas neste trabalho, tais como os níveis de BDNF. Por sua vez, o imunoc conteúdo de CB1 não foi alterado em nenhuma das estruturas avaliadas, o que reforça que a diminuição em NR1 seja de fato uma resposta regulatória, e não simplesmente um reflexo de uma redução no número de neurônios, já que o CB1 é expresso em neurônios e está funcionalmente e fisicamente ligado ao NMDAr (Sanchez-Blazquez et al. 2014).

De acordo com os resultados anteriores em astrócitos, observamos um aumento no imunoconteúdo de GLAST em estriado após injeção de glicina, sem efeitos sobre esse transportador em córtex cerebral. Comparativamente, o GLT1 é mais expresso (Lehre e Danbolt 1998) e tem maior taxa de transporte de glutamato do que o GLAST, porém este tem maior afinidade pelo substrato (Rose et al. 2018). Por outro lado, tem sido sugerido que a importância do GLAST vem sendo, talvez, subestimada, já que bloqueio de GLT1 não diminui a captação de glutamato na proporção esperada, mesmo em condições basais (Pinky et al. 2018). O aumento de GLAST pode ser facilmente explicado pelo aumento de GFAP, já que essas proteínas não só estão fisicamente associadas, como também a GFAP é fundamental para a manutenção de GLAST nas membranas (Sullivan et al. 2007). Além disso, o aumento de glutamato extracelular induz aumento no conteúdo de GLAST (Munir et al. 2000), provavelmente num mecanismo compensatório, o que estaria de acordo com os nossos resultados e com achados em outros EIM (Lagranha et al. 2014).

Para averiguar se o aumento no conteúdo de GLAST é acompanhado de um aumento no transporte de glutamato, realizamos experimentos de medida de captação de [³H]glutamato em córtex cerebral e estriado de animais de 15 dias. Nossos dados mostram que não houve diferença na captação desse neurotransmissor em nenhum dos tecidos avaliados. Ainda que tal resultado fosse o esperado em córtex cerebral, foi relativamente surpreendente em estriado, onde encontramos um aumento de GLAST. Deve ser considerado que, apesar de exercerem a mesma função, a expressão de GLAST e GLT-1 é diferentemente regulada, não se descartando um efeito sobre este

transportador (Jimenez et al. 2014). Por isso, a nossa hipótese é que, embora os astrócitos pareçam estar respondendo ao insulto causado pela glicina, como evidenciado pelo aumento de GFAP e GLAST, essa reação não culmina em um melhor funcionamento dessas células. As alterações do imunocontéudo proteico em estriado estão ilustradas na figura 2.

a)

b)

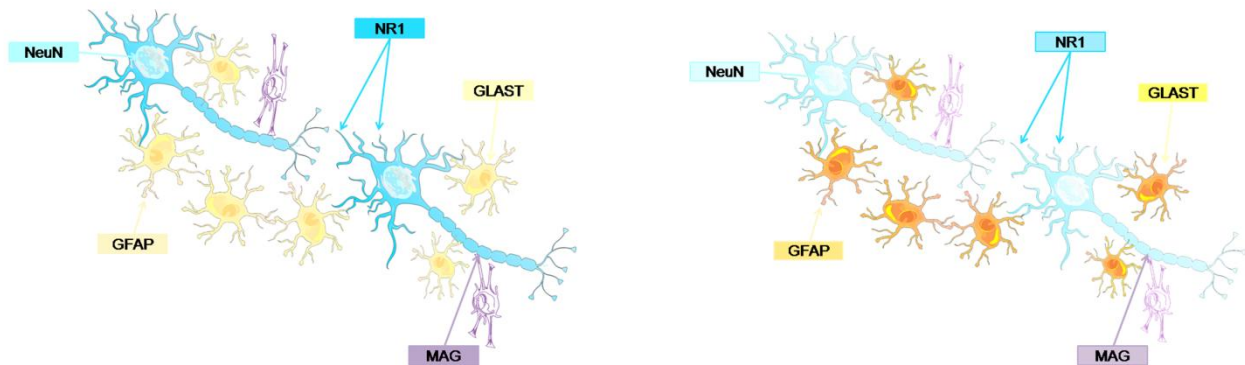


Figura 2. Ilustração da localização das alterações de imunocontéudo proteico encontradas em estriado, comparando controle (a) e glicina (b). Astrócitos em amarelo/laranja, mostrando aumento de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e transportador de aspartato e glutamato (GLAST); neurônios em azul, mostrando a diminuição de núcleo neuronal (NeuN) e de subunidade NR1 do receptor NMDA (NR1); oligodendrócitos em roxo, demonstrando a diminuição na glicoproteína associada à mielina (MAG).

Para melhor entender o passo seguinte de nosso estudo, algumas considerações são importantes: 1) há uma disfunção neuronal e glial generalizada, especialmente em estriado; 2) astrócitos, que são os principais reguladores de homeostase redox e glutamatérgica, se mostraram estruturalmente e funcionalmente alterados; 3) os efeitos causados pela glicina parecem estar ligados com excitotoxicidade; e 4) estudos já mostraram que a glicina altera a homeostase redox, inclusive no mesmo modelo deste trabalho

(Moura et al. 2016). Por esses motivos, decidimos avaliar parâmetros de produção de espécies reativas e dano oxidativo em córtex cerebral e estriado de animais 14 dias após injeção neonatal de glicina. Foi verificado que a oxidação de DCFH, concentrações de GSH e níveis de MDA não foram modificados pela glicina em córtex cerebral e estriado, o que foi surpreendente tanto pela quantidade de alterações teciduais já encontradas nesse modelo, como por esses mesmos parâmetros já terem se mostrado alterados anteriormente. Em detalhe, Moura e colaboradores (2016) reportaram dano oxidativo e modificação na atividade de enzimas antioxidantes em córtex cerebral no modelo de injeção neonatal de glicina. Nesse estudo, os experimentos foram realizados 1, 5 e 10 dias após a administração do aminoácido, e foi observada uma maior magnitude de alterações em 5 dias, como uma curva em sino. Com isso, hipotetizamos que os efeitos bioquímicos da glicina estariam precedendo e, potencialmente, causando os efeitos celulares e teciduais que observamos em 15 dias. Para avaliar isso, nos propusemos a investigar a ativação de importantes fatores de transcrição 5 dias após a injeção neonatal de glicina, partindo do pressuposto que as alterações nos parâmetros bioquímicos estariam sinalizando respostas celulares que causariam uma compensação, tornando indetectáveis as modificações nesses parâmetros no cérebro dos animais em uma idade maior.

A investigação dos fatores de transcrição foi feita pela medida de seus imunocontêidos em fração citosólica e fração enriquecida em núcleo de uma mesma amostra de córtex cerebral ou estriado em animais de 6 dias de vida. Iniciamos pela avaliação de Nrf2, um importante sensor de estresse oxidativo nas células. Nossos resultados mostram que a glicina diminuiu o conteúdo

citossólico de Nrf2 em córtex cerebral, com conseqüente diminuição da razão citossol/núcleo desse fator de transcrição. Essa diminuição na razão, no entanto, não parece refletir a uma maior translocação ativa do Nrf2, já que em um trabalho anterior não foi vista uma indução de enzimas antioxidantes nessa ou em idades subseqüentes (Moura et al. 2016). Por outro lado, pelo fato de que o conteúdo nuclear de Nrf2 não foi modificado, especulamos que esteja ocorrendo uma disfunção na atividade de GSK3 β , que é responsável pela exportação desse fator de transcrição após sua ação no núcleo (Liddell 2017). Nesse sentido, já foi visto que essa enzima pode ser inibida por estresse oxidativo (Lavu et al. 2019), e que mesmo a ativação constitutiva de Nrf2 também pode causar aumento de espécies reativas (Kovac et al. 2015).

Já no estriado, o conteúdo nuclear de Nrf2 foi diminuído pela glicina, com tendência em aumentar a razão citossol/núcleo. O controle do Nrf2 é feito pela proteína tipo-Kelch associada a ECH 1 (Keap1), que mantém o Nrf2 no citossol até que, havendo aumento de espécies reativas, a oxidação de tióis na sua estrutura permite a liberação e translocação de Nrf2 para o núcleo, onde exerce a sua atividade ligando-se a elementos de resposta antioxidante (ARE) na região promotora de genes de regulação redox e metabólica e de regeneração de NADPH (Tonelli et al. 2018). Considerando que este não é um efeito agudo da glicina, é possível, como visto antes, que o aumento de espécies reativas estimule maior expressão de Nrf2, mas esse conteúdo elevado fica retido no citossol (Verma et al. 2018). Nesse contexto, iniciamos a investigação de Keap1 citossólico, mas a quantificação das densidades das bandas do western blot não foi possível devido ao intenso *background* (dados

não mostrados). Assim, sugerimos algumas alternativas para tentar explicar nossos resultados.

Há uma via não-canônica de regulação de Nrf2 que envolve diversas cinases, incluindo a cinase extracelular regulada por sinal 1/2 (ERK 1/2) cuja atividade é necessária para a translocação nuclear de Nrf2 (Bruna et al. 2018; Liddell 2017). Nesse sentido, um trabalho do nosso grupo evidenciou que a glicina induz diminuição na fosforilação de ERK1/2 em córtex cerebral e estriado de ratos neonatos (Moura et al. 2018). Foi visto ainda que a melatonina é capaz de prevenir efeitos tóxicos da glicina na mesma idade de 6 dias (Moura et al. 2016), e, nesse contexto, é bem evidenciado que esse antioxidante é capaz de ativar a via do Nrf2 (Shah et al. 2017). Tais observações sugerem que a glicina altera a translocação do Nrf2 em estriado, e que isso pode ser devido a danos na via da ERK. Dessa forma, concluímos que os resultados aqui verificados estão alinhados com achados anteriores do nosso grupo em ratos neonatos. Além disso, como a indução de Nrf2 parece ser mais expressiva em astrócitos do que em neurônios (Liddell 2017), é possível especular que nossos dados provavelmente reflitam, ao menos em parte, um prejuízo na sinalização por Nrf2 em astrócitos, que, por sua vez, são responsáveis pela manutenção da homeostase redox em neurônios, novamente mostrando a integração das alterações celulares nos tecidos. Também é importante considerar que a desestabilização de Nrf2 ocorre de maneira distinta em cada estrutura cerebral; portanto, é possível que genes diferentes sejam afetados em córtex cerebral e estriado (Ehrnhoefer et al. 2018), o que explicaria porque efeitos inicialmente similares em 6 dias têm desfecho diferenciado em 15 dias de vida.

Considerando-se que a sinalização de Nrf2 também está relacionada com o processo de biogênese mitocondrial, a qual é classicamente controlada pela cascata do coativador de PPAR 1 α (PGC1 α), e que os resultados do capítulo I mostram que o bezafibrato, um indutor de biogênese mitocondrial, afeta os efeitos provocados pela glicina, investigamos a ativação de PGC1 α e o conteúdo citosólico do fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) no nosso modelo neonatal. Desta vez, tivemos resultados mais pronunciados no córtex cerebral, onde encontramos aumento nos conteúdos citosólico e nuclear e diminuição da razão citosol/núcleo de PGC1 α , indicando maior translocação desse fator de transcrição, com concomitante diminuição de TFAM. Esses dados estão em aparente desacordo porque tanto a translocação de Nrf2 e a expressão de TFAM são promovidas por PGC1 α (Gureev et al. 2019). Embora TFAM seja um alvo *downstream* clássico de PGC1 α (Li et al. 2017), dados da literatura evidenciam que suas expressões não estão obrigatoriamente correlacionadas (Remels et al. 2014; Rice et al. 2014). Nesse sentido, é possível que alterações no fator respiratório nuclear 1 (NRF1) estejam envolvidas nos nossos achados, já que este fator intermedeia a ação de PGC1 α sobre TFAM (Li et al. 2017). Por sua vez, a glicina não alterou o conteúdo estriatal de PGC1 α ou de TFAM.

Apesar de os mecanismos que desencadearam esses efeitos sobre o conteúdo de PGC1 α não estarem claros, eles estão de acordo com os efeitos observados em 15 dias de vida, ou seja, de danos mais pronunciados em estriado do que em córtex cerebral. Como já mencionado, as mitocôndrias astrocitárias e neuronais do estriado são menos resistentes do que as corticais (Oliveira e Goncalves 2009), e dados da literatura sugerem que isto pode ser,

ao menos em parte, por diferenças intrínsecas na sinalização via PGC1 α em resposta a insulto (Crescenzo et al. 2019), e a ativação desta via poderia ter efeito protetor no córtex cerebral. Um modelo *knockout* para PGC1 α em camundongos mostra lesões espongiformes mais abundantes e pronunciadas em estriado do que outras regiões, inclusive o córtex cerebral (Lin et al. 2004), o que está de acordo com o nosso modelo. A expressão de PGC1 α também pode ser aumentada por estresse oxidativo (St-Pierre et al. 2006), o que está de acordo com nossos presentes resultados e um trabalho anterior de nosso grupo demonstrando que a glicina induz estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos 5 dias após a injeção do aminoácido (Moura et al. 2016).

Os resultados apresentados no capítulo II indicam que há efeitos bioquímicos sendo desencadeados pela glicina, os quais provocam mudanças iniciais em vias de sinalização importantes para homeostase metabólica e sobrevivência celular. Por sua vez, essas modificações parecem ter efeitos duradouros a médio prazo, pois tanto córtex cerebral como estriado têm alteração na composição do NMDAr (diminuição do conteúdo de NR1). Efeitos importantes também são vistos sobre a mielina, especialmente em corpo caloso, a região mais mielinizada de todo o cérebro. Além disso, também foram observadas alterações em astrócitos, dando indícios de prejuízos no metabolismo glutamatérgico e possível indução de excitotoxicidade que, por sua vez, explicaria a perda neuronal. Pelo que temos conhecimento, esses efeitos da glicina não haviam sido reportados na literatura e apresentam importantes correlações entre o acúmulo de glicina e metabolismo energético e redox. Nossos dados também relacionam o papel dos astrócitos sobre o

sistema glutamatérgico e a mielinização, indicando potenciais participantes do dano neurológico característico da HNC.

Em conjunto, os dados apresentados nos capítulos I e II reforçam a noção que o acúmulo de glicina promove estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes, diminuição de GSH e prejuízo da sinalização de Nrf2. O tratamento com bezafibrato, um pan-agonista de receptores PPAR que leva à ativação do PGC1 α utilizado no capítulo I, atenuou ou preveniu as alterações provocadas pela glicina em estriado (Gureev et al. 2019). Além disso, o fato de a injeção neonatal de glicina aumentar a translocação desse coativador de transcrição para o núcleo em córtex cerebral está de acordo com a ausência de modificações redox mostrada no capítulo I, sugerindo que está ocorrendo uma resposta adaptativa desse tecido em reação à glicina (Oliveira e Goncalves 2009). É possível ainda que essas características intrínsecas do córtex cerebral possam ser reforçadas pelo pré-tratamento com bezafibrato. Com isso, temos a perspectiva de que o bezafibrato poderia beneficiar pacientes afetados pela HNC.

Especificamente com relação ao estriado, essa estrutura se mostrou particularmente susceptível aos danos causados pela glicina, o que já foi evidenciado, por exemplo, na doença de Huntington. Nossa hipótese de trabalho é que a maior proporção de NMDAr expressando a subunidade NR2B nessa região contribua para esse fenômeno (Cowan e Raymond 2006), já que essa característica geralmente confere uma maior susceptibilidade à indução de excitotoxicidade mediada por glutamato (Zhang e Luo 2013), acrescido da já mencionada menor resistência das mitocôndrias estriatais a dano (Oliveira e Goncalves 2009).

Nossos achados ainda sugerem que os astrócitos sejam os pivôs do dano neurológico na HNC, já que indicam que a glicina induz uma gliose “disfuncional”, ou seja, que não é acompanhada por melhora da função astrocitária, como demonstrado pela medida da captação de [³H]glutamato, potencialmente permitindo acúmulo extracelular de glutamato e morte excitotóxica de neurônios. Considerando que o glutamato pode induzir lesões à mielina, inclusive no corpo caloso que é a área cerebral mais mielinizada (Zhang et al. 2013), que a glicina *per se* já pode causar hiperativação de NMDAr em oligodendrócitos (Pina-Crespo et al. 2010), e que houve diminuição tanto de proteínas estruturais da mielina como de NG2, marcador de OPCs, é possível que o dano à mielina causado pela glicina ocorra tanto por hipomielinização quanto por desmielinização com envolvimento do sistema glutamatérgico.

III.2 Conclusões

A glicina, metabólito acumulado na HNC, induz alterações em neurônios, astrócitos e em glia NG2, além de prejudicar a homeostase redox em cérebro de ratos. Observamos também importantes alterações na estrutura e composição da mielina, em especial no corpo caloso, estrutura caracteristicamente comprometida na HNC. Não surpreendentemente, todos esses efeitos parecem estar interligados, e nossos dados reforçam que isso seja mediado pela glicina, via NMDAr, provocando alterações bioquímicas a curto prazo, como nas vias de sinalização do Nrf2 e do PGC1 α , que culminariam no dano cerebral observado a médio prazo no nosso modelo. Além disso, a alteração em PGC1 α , somada aos efeitos do bezafibrato sobre os efeitos causados pela glicina, sugere esse composto como um potencial adjuvante no tratamento para HNC.

III.3 Perspectivas

- a) Avaliar, no modelo de HNC neonatal: o conteúdo citosólico de Keap1 em córtex cerebral e estriado 5 dias após a injeção de glicina; a co-localização da imunomarcção de GFAP e NG2 com bromo-deoxiuridina (BrdU), um marcador de proliferação, em córtex cerebral, estriado e corpo caloso; o imunocntéudo de glutamina sintetase em córtex cerebral e estriado e a imunomarcção para GFAP e O4 (marcador de oligodendrócito) em córtex cerebral, estriado e corpo caloso 14 dias após a injeção de glicina.
- b) Estudar os efeitos da glicina sobre parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético e sobre vias de sinalização (Nrf2 e PGC1 α) em culturas celulares de astrócitos e oligodendrócitos.
- c) Investigar o potencial efeito protetor do Infeprodil, um inibidor de NR2B, sobre os efeitos da glicina em mielina, astrócitos e neurônios 14 dias após a injeção neonatal de glicina.

REFERÊNCIAS

- Al-Amin MM, Akhter S, Hasan AT, Alam T, Nageeb Hasan SM, Saifullah AR, Shohel M. 2015. The antioxidant effect of astaxanthin is higher in young mice than aged: A region specific study on brain. *Metabolic brain disease*. 30(5):1237-1246.
- Alfallaj R, Alfadhel M. 2019. Glycine transporter 1 encephalopathy from biochemical pathway to clinical disease: Review. *Child neurology open*. 6:2329048X19831486.
- Applegarth DA, Toone JR. 2001. Nonketotic hyperglycinemia (glycine encephalopathy): Laboratory diagnosis. *Molecular genetics and metabolism*. 74(1-2):139-146.
- Baker PR, 2nd, Friederich MW, Swanson MA, Shaikh T, Bhattacharya K, Scharer GH, Aicher J, Creadon-Swindell G, Geiger E, MacLean KN et al. 2014. Variant non ketotic hyperglycinemia is caused by mutations in *lias*, *bola3* and the novel gene *glrx5*. *Brain : a journal of neurology*. 137(Pt 2):366-379.
- Beaudin AE, Stover PJ. 2009. Insights into metabolic mechanisms underlying folate-responsive neural tube defects: A minireview. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 85(4):274-284.
- Becker B, Demirbas M, Johann S, Zendedel A, Beyer C, Clusmann H, Haas SJ, Wree A, Tan SKH, Kipp M. 2018. Effect of intrastriatal 6-ohda lesions on extrastriatal brain structures in the mouse. *Molecular neurobiology*. 55(5):4240-4252.
- Beckmann N, Giorgetti E, Neuhaus A, Zurbruegg S, Accart N, Smith P, Perdoux J, Perrot L, Nash M, Desrayaud S et al. 2018. Brain region-specific enhancement of remyelination and prevention of demyelination by the *csf1r* kinase inhibitor *blz945*. *Acta neuropathologica communications*. 6(1):9.
- Benarroch EE. 2011. Glycine and its synaptic interactions: Functional and clinical implications. *Neurology*. 77(7):677-683.
- Bjoraker KJ, Swanson MA, Coughlin CR, 2nd, Christodoulou J, Tan ES, Fergeson M, Dyack S, Ahmad A, Friederich MW, Spector EB et al. 2016. Neurodevelopmental outcome and treatment efficacy of benzoate and dextromethorphan in siblings with attenuated nonketotic hyperglycinemia. *The Journal of pediatrics*. 170:234-239.
- Boggs JM. 2006. Myelin basic protein: A multifunctional protein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 63(17):1945-1961.
- Brenner M. 2014. Role of *gfap* in cns injuries. *Neuroscience letters*. 565:7-13.
- Bruna B, Lobos P, Herrera-Molina R, Hidalgo C, Paula-Lima A, Adasme T. 2018. The signaling pathways underlying *bdnf*-induced *nrf2* hippocampal nuclear translocation involve *ros*, *ryr*-mediated *ca(2+)* signals, *erk* and *pi3k*. *Biochemical and biophysical research communications*. 505(1):201-207.
- Busanello EN, Moura AP, Viegas CM, Zanatta A, da Costa Ferreira G, Schuck PF, Wajner M. 2010. Neurochemical evidence that glycine induces bioenergetical dysfunction. *Neurochemistry international*. 56(8):948-954.

- Butler CJ, Likeman M, Mallick AA. 2017. Distinctive magnetic resonance imaging findings in neonatal nonketotic hyperglycinemia. *Pediatric neurology*. 72:90-91.
- Chai H, Diaz-Castro B, Shigetomi E, Monte E, Oceau JC, Yu X, Cohn W, Rajendran PS, Vondriska TM, Whitelegge JP et al. 2017. Neural circuit-specialized astrocytes: Transcriptomic, proteomic, morphological, and functional evidence. *Neuron*. 95(3):531-549 e539.
- Chaturvedi RK, Beal MF. 2013. Mitochondria targeted therapeutic approaches in parkinson's and huntington's diseases. *Molecular and cellular neurosciences*. 55:101-114.
- Coloigner J, Batail JM, Commowick O, Corouge I, Robert G, Barillot C, Drapier D. 2019. White matter abnormalities in depression: A categorical and phenotypic diffusion mri study. *NeuroImage Clinical*. 22:101710.
- Corona JC, Duchen MR. 2015. Ppargamma and pgc-1alpha as therapeutic targets in parkinson's. *Neurochemical research*. 40(2):308-316.
- Coughlin CR, 2nd, Swanson MA, Kronquist K, Acquaviva C, Hutchin T, Rodriguez-Pombo P, Vaisanen ML, Spector E, Creadon-Swindell G, Bras-Goldberg AM et al. 2017. The genetic basis of classic nonketotic hyperglycinemia due to mutations in *glcd* and *amt*. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 19(1):104-111.
- Cowan CM, Raymond LA. 2006. Selective neuronal degeneration in huntington's disease. *Current topics in developmental biology*. 75:25-71.
- Cragolini AB, Montenegro G, Friedman WJ, Masco DH. 2018. Brain-region specific responses of astrocytes to an in vitro injury and neurotrophins. *Molecular and cellular neurosciences*. 88:240-248.
- Crescenzo R, Spagnuolo MS, Cancelliere R, Iannotta L, Mazzoli A, Gatto C, Iossa S, Cigliano L. 2019. Effect of initial aging and high-fat/high-fructose diet on mitochondrial bioenergetics and oxidative status in rat brain. *Molecular neurobiology*. 56(11):7651-7663.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. 2001. Nmda receptor subunits: Diversity, development and disease. *Current opinion in neurobiology*. 11(3):327-335.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. 2004. Role of distinct nmda receptor subtypes at central synapses. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2004(255):re16.
- Cummings KA, Popescu GK. 2015. Glycine-dependent activation of nmda receptors. *The Journal of general physiology*. 145(6):513-527.
- da Rosa-Junior NT, Parmeggiani B, da Rosa MS, Glanzel NM, de Moura Alvorcem L, Wajner M, Leipnitz G. 2019. Bezafibrate in vivo administration prevents 3-methylglutaric acid-induced impairment of redox status, mitochondrial biogenesis, and neural injury in brain of developing rats. *Neurotoxicity research*. 35(4):809-822.
- Danbolt NC, Furness DN, Zhou Y. 2016. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochemistry international*. 98:29-45.
- Dewan MC, Rattani A, Mekary R, Glancz LJ, Yunusa I, Baticulon RE, Fieggen G, Wellons JC, Park KB, Warf BC. 2018. Global hydrocephalus epidemiology and incidence: Systematic review and meta-analysis. *Journal of neurosurgery*. 1-15.

- Doyle S, Hansen DB, Vella J, Bond P, Harper G, Zammit C, Valentino M, Fern R. 2018. Vesicular glutamate release from central axons contributes to myelin damage. *Nature communications*. 9(1):1032.
- Duan W, Zhang YP, Hou Z, Huang C, Zhu H, Zhang CQ, Yin Q. 2016. Novel insights into neun: From neuronal marker to splicing regulator. *Molecular neurobiology*. 53(3):1637-1647.
- Dutertre S, Becker CM, Betz H. 2012. Inhibitory glycine receptors: An update. *The Journal of biological chemistry*. 287(48):40216-40223.
- Ehrnhoefer DE, Southwell AL, Sivasubramanian M, Qiu X, Villanueva EB, Xie Y, Walzl S, Anderson L, Fazeli A, Casal L et al. 2018. Hace1 is essential for astrocyte mitochondrial function and influences huntington disease phenotypes in vivo. *Human molecular genetics*. 27(2):239-253.
- Elberger AJ, Deng J. 2003. Corpus callosum and visual cortex of mice with deletion of the nmda-nr1 receptor: I. Accelerated development of callosal projection neurons. *Brain research Developmental brain research*. 144(2):121-133.
- Eugenin-von Bernhardt J, Dimou L. 2016. Ng2-glia, more than progenitor cells. *Advances in experimental medicine and biology*. 949:27-45.
- Finlay JM, Dunham GA, Isherwood AM, Newton CJ, Nguyen TV, Reppar PC, Snitkovski I, Paschall SA, Greene RW. 2015. Effects of prefrontal cortex and hippocampal nmda nr1-subunit deletion on complex cognitive and social behaviors. *Brain research*. 1600:70-83.
- Franco-Enzastiga U, Santana-Martinez RA, Silva-Islas CA, Barrera-Oviedo D, Chanez-Cardenas ME, Maldonado PD. 2017. Chronic administration of s-allylcysteine activates nrf2 factor and enhances the activity of antioxidant enzymes in the striatum, frontal cortex and hippocampus. *Neurochemical research*. 42(11):3041-3051.
- Gameiro A, Braams S, Rauen T, Grever C. 2011. The discovery of slowness: Low-capacity transport and slow anion channel gating by the glutamate transporter eaat5. *Biophysical journal*. 100(11):2623-2632.
- Gascon S, Deogracias R, Sobrado M, Roda JM, Renart J, Rodriguez-Pena A, Diaz-Guerra M. 2005. Transcription of the nr1 subunit of the n-methyl-d-aspartate receptor is down-regulated by excitotoxic stimulation and cerebral ischemia. *The Journal of biological chemistry*. 280(41):35018-35027.
- Genc Sel C, Kilic M, Yuksel D, Aksoy A, Kasapkara CS, Ceylaner S, Oguz KK. 2018. Nonketotic hyperglycinemia: Clinical range and outcome of a rare neurometabolic disease in a single-center. *Brain & development*. 40(10):865-875.
- Goebel DJ, Pooch MS. 1999. Nmda receptor subunit gene expression in the rat brain: A quantitative analysis of endogenous mrna levels of nr1com, nr2a, nr2b, nr2c, nr2d and nr3a. *Brain research Molecular brain research*. 69(2):164-170.
- Goldenberg I, Benderly M, Goldbourt U. 2008. Update on the use of fibrates: Focus on bezafibrate. *Vascular health and risk management*. 4(1):131-141.
- Goldstein A, Covington BP, Mahabadi N, Mesfin FB. 2019. Neuroanatomy, corpus callosum. *Statpearls*. Treasure Island (FL).

- Goursaud S, Kozlova EN, Maloteaux JM, Hermans E. 2009. Cultured astrocytes derived from corpus callosum or cortical grey matter show distinct glutamate handling properties. *Journal of neurochemistry*. 108(6):1442-1452.
- Greene ND, Copp AJ. 2009. Development of the vertebrate central nervous system: Formation of the neural tube. *Prenatal diagnosis*. 29(4):303-311.
- Grigoletto J, Pukass K, Gamliel A, Davidi D, Katz-Brull R, Richter-Landsberg C, Sharon R. 2017. Higher levels of myelin phospholipids in brains of neuronal alpha-synuclein transgenic mice precede myelin loss. *Acta neuropathologica communications*. 5(1):37.
- Grings M, Moura AP, Parmeggiani B, Pletsch JT, Cardoso GMF, August PM, Matte C, Wyse ATS, Wajner M, Leipnitz G. 2017. Bezafibrate prevents mitochondrial dysfunction, antioxidant system disturbance, glial reactivity and neuronal damage induced by sulfite administration in striatum of rats: Implications for a possible therapeutic strategy for sulfite oxidase deficiency. *Biochimica et biophysica acta*. 1863(9):2135-2148.
- Gureev AP, Shaforostova EA, Popov VN. 2019. Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: Interaction between the nrf2 and pgc-1alpha signaling pathways. *Frontiers in genetics*. 10:435.
- Gutteridge BHaJMC. 2007. Free radicals in biology and medicine.
- Halliwell B. 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition reviews*. 52(8 Pt 1):253-265.
- Halliwell B. 2011. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends in pharmacological sciences*. 32(3):125-130.
- Halliwell B. 2012. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutrition reviews*. 70(5):257-265.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal*. 219(1):1-14.
- Hamosh A, Johnston MV. 2001. Non-ketotic hyperglycinemia. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill. p. 2065 - 2078.
- Han H, Myllykoski M, Ruskamo S, Wang C, Kursula P. 2013. Myelin-specific proteins: A structurally diverse group of membrane-interacting molecules. *Biofactors*. 39(3):233-241.
- Hennermann JB, Berger JM, Grieben U, Scharer G, Van Hove JL. 2012. Prediction of long-term outcome in glycine encephalopathy: A clinical survey. *Journal of inherited metabolic disease*. 35(2):253-261.
- Holmseth S, Dehnes Y, Huang YH, Follin-Arbelet VV, Grutle NJ, Mylonakou MN, Plachez C, Zhou Y, Furness DN, Bergles DE et al. 2012. The density of eaac1 (eaat3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian cns. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 32(17):6000-6013.
- Hoover-Fong JE, Shah S, Van Hove JL, Applegarth D, Toone J, Hamosh A. 2004. Natural history of nonketotic hyperglycinemia in 65 patients. *Neurology*. 63(10):1847-1853.
- Ibi M, Liu J, Arakawa N, Kitaoka S, Kawaji A, Matsuda KI, Iwata K, Matsumoto M, Katsuyama M, Zhu K et al. 2017. Depressive-like behaviors are regulated by nox1/nadph oxidase by redox modification of nmda receptor

1. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 37(15):4200-4212.
- Jimenez E, Nunez E, Ibanez I, Draffin JE, Zafra F, Gimenez C. 2014. Differential regulation of the glutamate transporters glt-1 and glast by gsk3beta. *Neurochemistry international*. 79:33-43.
- Johri A, Calingasan NY, Hennessey TM, Sharma A, Yang L, Wille E, Chandra A, Beal MF. 2012. Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of huntington's disease. *Human molecular genetics*. 21(5):1124-1137.
- Kalivas PW. 2009. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nature reviews Neuroscience*. 10(8):561-572.
- Karadottir R, Cavellier P, Bergersen LH, Attwell D. 2005. Nmda receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature*. 438(7071):1162-1166.
- Kava MP, Robertson A, Greed L, Balasubramaniam S. 2019. Ketogenic diet, a potentially valuable therapeutic option for the management of refractory epilepsy in classical neonatal nonketotic hyperglycinemia: A case report. *European journal of clinical nutrition*. 73(6):961-965.
- Kikuchi G, Motokawa Y, Yoshida T, Hiraga K. 2008. Glycine cleavage system: Reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*. 84(7):246-263.
- Kondiles BR, Horner PJ. 2018. Myelin plasticity, neural activity, and traumatic neural injury. *Developmental neurobiology*. 78(2):108-122.
- Kovac S, Angelova PR, Holmstrom KM, Zhang Y, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. 2015. Nrf2 regulates ros production by mitochondria and nadph oxidase. *Biochimica et biophysica acta*. 1850(4):794-801.
- Kritis AA, Stamoula EG, Paniskaki KA, Vavilis TD. 2015. Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis/study. *Frontiers in cellular neuroscience*. 9:91.
- Lagranha VL, Matte U, de Carvalho TG, Seminotti B, Pereira CC, Koeller DM, Wontner M, Goodman SI, de Souza DO, Wajner M. 2014. Increased glutamate receptor and transporter expression in the cerebral cortex and striatum of gcdh-/- mice: Possible implications for the neuropathology of glutaric acidemia type i. *PloS one*. 9(3):e90477.
- Lau A, Tymianski M. 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 460(2):525-542.
- Lavu N, Richardson L, Radnaa E, Kechichian T, Urrabaz-Garza R, Sheller-Miller S, Bonney E, Menon R. 2019. Oxidative stress-induced downregulation of glycogen synthase kinase 3 beta in fetal membranes promotes cellular senescence. *Biology of reproduction*. 101(5):1018-1030.
- Lehre KP, Danbolt NC. 1998. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: Chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 18(21):8751-8757.

- Leipnitz G, Solano AF, Seminotti B, Amaral AU, Fernandes CG, Beskow AP, Dutra Filho CS, Wajner M. 2009. Glycine provokes lipid oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in brain cortex of young rats. *Cellular and molecular neurobiology*. 29(2):253-261.
- Leung KY, Pai YJ, Chen Q, Santos C, Calvani E, Sudiwala S, Savery D, Ralser M, Gross SS, Copp AJ et al. 2017. Partitioning of one-carbon units in folate and methionine metabolism is essential for neural tube closure. *Cell reports*. 21(7):1795-1808.
- Li PA, Hou X, Hao S. 2017. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration. *Journal of neuroscience research*. 95(10):2025-2029.
- Liddell JR. 2017. Are astrocytes the predominant cell type for activation of nrf2 in aging and neurodegeneration? *Antioxidants (Basel)*. 6(3).
- Lim YT, Mankad K, Kinali M, Tan AP. 2019. Neuroimaging spectrum of inherited neurotransmitter disorders. *Neuropediatrics*.
- Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang CY, Mootha VK, Jager S, Vianna CR, Reznick RM et al. 2004. Defects in adaptive energy metabolism with cns-linked hyperactivity in pgc-1alpha null mice. *Cell*. 119(1):121-135.
- Lin YS, Wang HY, Huang DF, Hsieh PF, Lin MY, Chou CH, Wu IJ, Huang GJ, Gau SS, Huang HS. 2016. Neuronal splicing regulator rbfox3 (neun) regulates adult hippocampal neurogenesis and synaptogenesis. *PloS one*. 11(10):e0164164.
- Lu SC. 2013. Glutathione synthesis. *Biochimica et biophysica acta*. 1830(5):3143-3153.
- Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D. 2019. Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the cns by controlling the balance between glutamate uptake and release. *Cells*. 8(2).
- Mak CM, Lee HC, Chan AY, Lam CW. 2013. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: Review and update. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 50(6):142-162.
- Mayer ML. 2016. Structural biology of glutamate receptor ion channel complexes. *Current opinion in structural biology*. 41:119-127.
- Meyer N, Richter N, Fan Z, Siemonsmeier G, Pivneva T, Jordan P, Steinhäuser C, Semtner M, Nolte C, Kettenmann H. 2018. Oligodendrocytes in the mouse corpus callosum maintain axonal function by delivery of glucose. *Cell reports*. 22(9):2383-2394.
- Middeldorp J, Hol EM. 2011. Gfap in health and disease. *Progress in neurobiology*. 93(3):421-443.
- Mim C, Balani P, Rauen T, Grever C. 2005. The glutamate transporter subtypes eaat4 and eaats 1-3 transport glutamate with dramatically different kinetics and voltage dependence but share a common uptake mechanism. *The Journal of general physiology*. 126(6):571-589.
- Monje M. 2018. Myelin plasticity and nervous system function. *Annual review of neuroscience*. 41:61-76.
- Moura AP, Grings M, Dos Santos Parmeggiani B, Marcowich GF, Tonin AM, Viegas CM, Zanatta A, Ribeiro CA, Wajner M, Leipnitz G. 2013. Glycine intracerebroventricular administration disrupts mitochondrial energy homeostasis in cerebral cortex and striatum of young rats. *Neurotoxicity research*. 24(4):502-511.

- Moura AP, Grings M, Marcowich GF, Bumbel AP, Parmeggiani B, de Moura Alvorcem L, Wajner M, Leipnitz G. 2014. Evidence that glycine induces lipid peroxidation and decreases glutathione concentrations in rat cerebellum. *Molecular and cellular biochemistry*. 395(1-2):125-134.
- Moura AP, Parmeggiani B, Gasparotto J, Grings M, Fernandez Cardoso GM, Seminotti B, Moreira JCF, Gelain DP, Wajner M, Leipnitz G. 2018. Glycine administration alters mapk signaling pathways and causes neuronal damage in rat brain: Putative mechanisms involved in the neurological dysfunction in nonketotic hyperglycinemia. *Molecular neurobiology*. 55(1):741-750.
- Moura AP, Parmeggiani B, Grings M, Alvorcem LM, Boldrini RM, Bumbel AP, Motta MM, Seminotti B, Wajner M, Leipnitz G. 2016. Intracerebral glycine administration impairs energy and redox homeostasis and induces glial reactivity in cerebral cortex of newborn rats. *Molecular neurobiology*. 53(9):5864-5875.
- Munir M, Correale DM, Robinson MB. 2000. Substrate-induced up-regulation of na(+)-dependent glutamate transport activity. *Neurochemistry international*. 37(2-3):147-162.
- Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL et al. 2012. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Human molecular genetics*. 21(7):1496-1503.
- Njalsson R, Ristoff E, Carlsson K, Winkler A, Larsson A, Norgren S. 2005. Genotype, enzyme activity, glutathione level, and clinical phenotype in patients with glutathione synthetase deficiency. *Human genetics*. 116(5):384-389.
- Oliveira JM, Goncalves J. 2009. In situ mitochondrial ca²⁺ buffering differences of intact neurons and astrocytes from cortex and striatum. *The Journal of biological chemistry*. 284(8):5010-5020.
- Olsen GM, Sonnewald U. 2015. Glutamate: Where does it come from and where does it go? *Neurochemistry international*. 88:47-52.
- Pai YJ, Leung KY, Savery D, Hutchin T, Prunty H, Heales S, Brosnan ME, Brosnan JT, Copp AJ, Greene ND. 2015. Glycine decarboxylase deficiency causes neural tube defects and features of non-ketotic hyperglycinemia in mice. *Nature communications*. 6:6388.
- Panayiotou E, Spike K, Morley C, Belteki G. 2017. Ventilator respiratory graphic diagnosis of hiccupping in non-ketotic hyperglycinaemia. *BMJ case reports*. 2017.
- Paoletti P, Neyton J. 2007. Nmda receptor subunits: Function and pharmacology. *Current opinion in pharmacology*. 7(1):39-47.
- Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. 2000. A detailed interpretation of oh radical footprints in a tbp-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *Journal of molecular biology*. 304(1):55-68.
- Paupé A, Bidat L, Sonigo P, Lenclen R, Molho M, Ville Y. 2002. Prenatal diagnosis of hypoplasia of the corpus callosum in association with non-ketotic hyperglycinemia. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 20(6):616-619.

- Pepin J, Francelle L, Carrillo-de Sauvage MA, de Longprez L, Gipchtein P, Cambon K, Valette J, Brouillet E, Flament J. 2016. In vivo imaging of brain glutamate defects in a knock-in mouse model of huntington's disease. *NeuroImage*. 139:53-64.
- Pierozan P, Ferreira F, Ortiz de Lima B, Goncalves Fernandes C, Totarelli Monteforte P, de Castro Medaglia N, Bincoletto C, Soubhi Smaili S, Pessoa-Pureur R. 2014. The phosphorylation status and cytoskeletal remodeling of striatal astrocytes treated with quinolinic acid. *Experimental cell research*. 322(2):313-323.
- Piloni NE, Reiteri M, Hernando MP, Cervino CO, Puntarulo S. 2017. Differential effect of acute iron overload on oxidative status and antioxidant content in regions of rat brain. *Toxicologic pathology*. 45(8):1067-1076.
- Pina-Crespo JC, Talantova M, Micu I, States B, Chen HS, Tu S, Nakanishi N, Tong G, Zhang D, Heinemann SF et al. 2010. Excitatory glycine responses of cns myelin mediated by nr1/nr3 "nmda" receptor subunits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30(34):11501-11505.
- Pinky NF, Wilkie CM, Barnes JR, Parsons MP. 2018. Region- and activity-dependent regulation of extracellular glutamate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 38(23):5351-5366.
- Pinto MC, Lima IV, da Costa FL, Rosa DV, Mendes-Goulart VA, Resende RR, Romano-Silva MA, de Oliveira AC, Gomez MV, Gomez RS. 2015. Glycine transporters type 1 inhibitor promotes brain preconditioning against nmda-induced excitotoxicity. *Neuropharmacology*. 89:274-281.
- Reig R, Silberberg G. 2016. Distinct corticostriatal and intracortical pathways mediate bilateral sensory responses in the striatum. *Cereb Cortex*. 26(12):4405-4415.
- Reis HJ, Guatimosim C, Paquet M, Santos M, Ribeiro FM, Kummer A, Schenatto G, Salgado JV, Vieira LB, Teixeira AL et al. 2009. Neurotransmitters in the central nervous system & their implication in learning and memory processes. *Current medicinal chemistry*. 16(7):796-840.
- Rekate HL. 2009. A contemporary definition and classification of hydrocephalus. *Seminars in pediatric neurology*. 16(1):9-15.
- Remels AH, Gosker HR, Langen RC, Polkey M, Sliwinski P, Galdiz J, van den Borst B, Pansters NA, Schols AM. 2014. Classical nf-kappab activation impairs skeletal muscle oxidative phenotype by reducing ikk-alpha expression. *Biochimica et biophysica acta*. 1842(2):175-185.
- Rice AC, Keeney PM, Algarzae NK, Ladd AC, Thomas RR, Bennett JP, Jr. 2014. Mitochondrial DNA copy numbers in pyramidal neurons are decreased and mitochondrial biogenesis transcriptome signaling is disrupted in alzheimer's disease hippocampi. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 40(2):319-330.
- Riche R, Liao M, Pena IA, Leung KY, Lepage N, Greene NDE, Sarafoglou K, Schimmenti LA, Drapeau P, Samarut E. 2018. Glycine decarboxylase deficiency-induced motor dysfunction in zebrafish is rescued by counterbalancing glycine synaptic level. *JCI insight*. 3(21).
- Rinholm JE, Vervaeke K, Tadross MR, Tkachuk AN, Kopek BG, Brown TA, Bergersen LH, Clayton DA. 2016. Movement and structure of

- mitochondria in oligodendrocytes and their myelin sheaths. *Glia*. 64(5):810-825.
- Romanos J, Benke D, Saab AS, Zeilhofer HU, Santello M. 2019. Differences in glutamate uptake between cortical regions impact neuronal nmda receptor activation. *Communications biology*. 2:127.
- Rose CR, Ziemens D, Untiet V, Fahlke C. 2018. Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. *Brain research bulletin*. 136:3-16.
- Saab AS, Nave KA. 2017. Myelin dynamics: Protecting and shaping neuronal functions. *Current opinion in neurobiology*. 47:104-112.
- Sakata Y, Owada Y, Sato K, Kojima K, Hisanaga K, Shinka T, Suzuki Y, Aoki Y, Satoh J, Kondo H et al. 2001. Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system. *Brain research Molecular brain research*. 94(1-2):119-130.
- Sakry D, Trotter J. 2016. The role of the ng2 proteoglycan in opc and cns network function. *Brain research*. 1638(Pt B):161-166.
- Sanchez-Blazquez P, Rodriguez-Munoz M, Garzon J. 2014. The cannabinoid receptor 1 associates with nmda receptors to produce glutamatergic hypofunction: Implications in psychosis and schizophrenia. *Frontiers in pharmacology*. 4:169.
- Santos C, Pai YJ, Mahmood MR, Leung KY, Savery D, Waddington SN, Copp AJ, Greene N. 2019. Impaired folate one-carbon metabolism causes formate-preventable hydrocephalus in glycine decarboxylase-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*.
- Schmitt S, Castelvetti LC, Simons M. 2015. Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochimica et biophysica acta*. 1851(8):999-1005.
- Schousboe A. 2019. Metabolic signaling in the brain and the role of astrocytes in control of glutamate and gaba neurotransmission. *Neuroscience letters*. 689:11-13.
- Scriver CB, A.; Sly, W.; Valle, D.; Childs, B.; Kinzler, K.; Vogelstein, B. 2001. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill.
- Seminotti B, Knebel LA, Fernandes CG, Amaral AU, da Rosa MS, Eichler P, Leipnitz G, Wajner M. 2011. Glycine intrastratial administration induces lipid and protein oxidative damage and alters the enzymatic antioxidant defenses in rat brain. *Life sciences*. 89(7-8):276-281.
- Shah SA, Khan M, Jo MH, Jo MG, Amin FU, Kim MO. 2017. Melatonin stimulates the sirt1/nrf2 signaling pathway counteracting lipopolysaccharide (lps)-induced oxidative stress to rescue postnatal rat brain. *CNS neuroscience & therapeutics*. 23(1):33-44.
- Shbarou RM, Boustany RM, Daher RT, Pakdel P, Nouredine A, Karam PE. 2019. Outcome of nonketotic hyperglycinemia in lebanon: 14-year retrospective review. *Neuropediatrics*. 50(4):235-243.
- Shuman RM, Leech RW, Scott CR. 1978. The neuropathology of the nonketotic and ketotic hyperglycinemias: Three cases. *Neurology*. 28(2):139-146.
- Sosunov A, Olabarria M, Goldman JE. 2018. Alexander disease: An astrocytopathy that produces a leukodystrophy. *Brain Pathol*. 28(3):388-398.

- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W et al. 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the pgc-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 127(2):397-408.
- Starkey J, Kobayashi N, Numaguchi Y, Moritani T. 2017. Cytotoxic lesions of the corpus callosum that show restricted diffusion: Mechanisms, causes, and manifestations. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc.* 37(2):562-576.
- Stence NV, Fenton LZ, Levek C, Tong S, Coughlin CR, 2nd, Hennermann JB, Wortmann SB, Van Hove JLK. 2019. Brain imaging in classic nonketotic hyperglycinemia: Quantitative analysis and relation to phenotype. *Journal of inherited metabolic disease*. 42(3):438-450.
- Sullivan SM, Lee A, Bjorkman ST, Miller SM, Sullivan RK, Poronnik P, Colditz PB, Pow DV. 2007. Cytoskeletal anchoring of glast determines susceptibility to brain damage: An identified role for gfap. *The Journal of biological chemistry*. 282(40):29414-29423.
- Swanson MA, Coughlin CR, Jr., Scharer GH, Szerlong HJ, Bjoraker KJ, Spector EB, Creadon-Swindell G, Mahieu V, Matthijs G, Hennermann JB et al. 2015. Biochemical and molecular predictors for prognosis in nonketotic hyperglycinemia. *Annals of neurology*. 78(4):606-618.
- Tekinalp G, Coskun T, Oran O, Ozalp I, Figen G, Ergin H. 1995. Nonketotic hyperglycinemia in a newborn infant. *The Turkish journal of pediatrics*. 37(1):57-60.
- Teo RT, Hong X, Yu-Taeger L, Huang Y, Tan LJ, Xie Y, To XV, Guo L, Rajendran R, Novati A et al. 2016. Structural and molecular myelination deficits occur prior to neuronal loss in the yac128 and bachd models of huntington disease. *Human molecular genetics*. 25(13):2621-2632.
- Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. 2018. Transcriptional regulation by nrf2. *Antioxidants & redox signaling*. 29(17):1727-1745.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. 2010. Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*. 62(3):405-496.
- Valero T. 2014. Mitochondrial biogenesis: Pharmacological approaches. *Current pharmaceutical design*. 20(35):5507-5509.
- Van Hove JLK, Coughlin C, II, Swanson M, Hennermann JB. 1993. Nonketotic hyperglycinemia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. *Genereviews((r))*. Seattle (WA).
- Vandresen-Filho S, Martins WC, Bertoldo DB, Mancini G, De Bem AF, Tasca CI. 2015. Cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum show differential susceptibility to quinolinic acid-induced oxidative stress. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 36(8):1449-1456.
- Verma AK, Yadav A, Singh SV, Mishra P, Rath SK. 2018. Isoniazid induces apoptosis: Role of oxidative stress and inhibition of nuclear translocation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (nrf2). *Life sciences*. 199:23-33.

- Vishnoi S, Raisuddin S, Parvez S. 2016. Glutamate excitotoxicity and oxidative stress in epilepsy: Modulatory role of melatonin. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*. 35(4):365-374.
- Wang D, Liu B, Tao W, Hao Z, Liu M. 2015. Fibrates for secondary prevention of cardiovascular disease and stroke. *The Cochrane database of systematic reviews*. (10):CD009580.
- Weinstein AS, Goldstein RB, Barkovich AJ. 2003. In utero disappearance of the corpus callosum secondary to extensive brain injury. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. 22(8):837-840.
- Wenz T, Diaz F, Spiegelman BM, Moraes CT. 2008. Activation of the ppar/pgc-1alpha pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell metabolism*. 8(3):249-256.
- Zahid M, Khan AH, Yunus ZM, Chen BC, Steinmann B, Johannes H, Afroze B. 2019. Inherited metabolic disorders presenting as hypoxic ischaemic encephalopathy: A case series of patients presenting at a tertiary care hospital in pakistan. *JPMA The Journal of the Pakistan Medical Association*. 69(3):432-436.
- Zhang J, Liu J, Fox HS, Xiong H. 2013. N-methyl-d-aspartate receptor-mediated axonal injury in adult rat corpus callosum. *Journal of neuroscience research*. 91(2):240-248.
- Zhang XM, Luo JH. 2013. Glun2a versus glun2b: Twins, but quite different. *Neuroscience bulletin*. 29(6):761-772.
- Zhang Z, Ma Z, Zou W, Guo H, Liu M, Ma Y, Zhang L. 2019. The appropriate marker for astrocytes: Comparing the distribution and expression of three astrocytic markers in different mouse cerebral regions. *BioMed research international*. 2019:9605265.
- Zhou Y, Danbolt NC. 2014. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 121(8):799-817.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação ilustrativa da reação do sistema de clivagem da glicina	7
Figura 2 - Ilustração da localização das alterações de imunoconteúdo proteico encontradas em estriado, comparando controle e glicina	95

Anexo 1 – Cartas de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 23787

Título: INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS FISIOPATOGÊNICOS ENVOLVIDOS NO DANO CEREBRAL NA HIPERGLICINEMIA NÃO-CETÓTICA

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

GUILHIAN LEIPNITZ - coordenador desde 01/11/2012
MOACIR WAJNER - pesquisador desde 01/11/2012
CÉSAR AUGUSTO JOÃO RIBEIRO - pesquisador desde 01/11/2012
GUSTAVO FLORA MARCOWICH - pesquisador desde 01/11/2012
Anelise Miotti Tonin - pesquisador desde 01/11/2012
Mateus Grings - pesquisador desde 01/11/2012
BELISA DOS SANTOS PARMEGGIANI - pesquisador desde 01/11/2012
Alana Pimentel Moura - pesquisador desde 01/11/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 05/11/2012 - Sala do 2º andar - Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 1300 ratos, Wistar, machos e fêmeas, 30 dias de vida, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 13 de Novembro de 2012

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 27657

Título: EFEITO DA GLICINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E MIELINIZAÇÃO EM CÉREBRO DE RATOS

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

GUILHIAN LEIPNITZ - coordenador desde 01/09/2014
MOACIR WAJNER - pesquisador desde 01/09/2014
Bianca Seminotti - pesquisador desde 01/09/2014
GUSTAVO FLORA MARCOWICH - Outra Função desde 01/09/2014
LEONARDO DE MOURA ALVORCEM - Outra Função desde 01/09/2014
ANNA PAULA BUMBEL PRATTI - Outra Função desde 01/09/2014
JULIA TAUANA PLETSCH - Outra Função desde 01/09/2014
Mateus Grings - Aluno de Doutorado desde 01/09/2014
BELISA DOS SANTOS PARMEGGIANI - Aluno de Mestrado desde 01/09/2014
Alana Pimentel Moura - Aluno de Doutorado desde 01/09/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 23/03/2015 - Sala 330 - Prédio do Anexo I da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 526 ratos Wistar de ambos os sexos neonatos e de 30 dias de vida, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 1 de Abril de 2015

Cristiane Matte

CRISTIANE MATTE

Vice Coordenador da comissão de ética



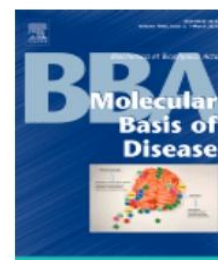
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - MOLECULAR BASIS OF DISEASE

One of the nine topical journals of BBA

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0925-4439

DESCRIPTION

BBA Molecular Basis of Disease addresses the **biochemistry** and **molecular genetics** of **disease** processes and models of human disease. This journal covers aspects of aging, cancer, metabolic-, neurological-, and immunological-based disease. Manuscripts focused on using animal models to elucidate biochemical and mechanistic insight in each of these conditions, are particularly encouraged. Manuscripts should emphasize the underlying mechanisms of disease pathways and provide novel contributions to the understanding and/or treatment of these disorders. Highly descriptive and method development submissions may be declined without full review.

Given the complex regulation of gene expression by a vast network of miRNA's, manuscripts describing the regulation of (disease-associated) genes by single miRNAs will only be considered if they provide genuine, novel insight in a disease mechanism. Further, studies restricted to a single cell line will not be considered unless they present truly novel insights.

The [submission](#) of uninvited reviews to *BBA - Molecular Basis of Disease* is strongly discouraged, and any such unsolicited review should be preceded by a presubmission enquiry to the Editorial Office (bbareviews@elsevier.com).

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Basic and clinical researchers studying molecular aspects of disease processes, Human geneticists, Biochemists, Molecular biologists, Cell biologists, Cell physiologists

IMPACT FACTOR

2018: 4.328 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2019

ABSTRACTING AND INDEXING

Science Citation Index
EMBiology
Sociedad Iberoamericana de Informacion Cientifica (SIIC) Data Bases
BIOSIS Citation Index
Chemical Abstracts
Current Contents - Life Sciences
Embase
Index Chemicus
PubMed/Medline
Scopus

EDITORIAL BOARD

Executive Editors

Jeffrey Keller, Louisiana State University System, Baton Rouge, Louisiana, United States
Ronald Oude Elferink, Academic Medical Center Tytgat Institute for Liver and Intestinal Research, Amsterdam, Netherlands
M. Paul Murphy, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, United States
Michael Hsiao, Academia Sinica, Taipei, Taiwan

Scientific Editor (Elsevier, Cambridge, MA, USA)

Angela Schena

Editorial Board Members

Gianfranco Alpini, Richard L Roudebush VA Medical Center, Indianapolis, Indiana, United States
Yidong Bai, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas, United States
Shairaz Baksh, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada
Piter Bosma, Academic Medical Center, Amsterdam, Netherlands
D. Allan Butterfield, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, United States
Garth J. S. Cooper, The University of Manchester, Manchester, UK, and University of Auckland, Auckland, New Zealand
Stuart E. Dryer, University of Houston, Houston, Texas, United States
Jason Dyck, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada
Peter Fickert, Hospital of the Federal State of Styria and University Hospital Graz Division of Gastroenterology and Hepatology, Weiz, Austria
Maria Figueiredo-Pereira, City University of New York, New York, New York, United States
Nikolaos G. Frangogiannis, Yeshiva University Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, United States
Saeid Ghavami, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada
Fernando Gómez-Pinilla, University of California Los Angeles, Los Angeles, California, United States
Grace L. Guo, Rutgers University Department of Pharmacology and Toxicology, Piscataway, New Jersey, United States
B. Therese Kinsella, University College Dublin, Dublin, Ireland
Sergio Lavandero, University of Chile, Santiago de Chile, Chile
Valter D. Longo, University of Southern California, Los Angeles, California, United States
José E. Manautou, University of Connecticut Department of Pharmaceutical Sciences, Storrs, Connecticut, United States
Sara Mole, University College London, London, United Kingdom
Paula Moreira, University of Coimbra, Coimbra, Portugal
Antonio Moschetta, Padiglione Chini, UOC Medicina Interna Frugoni, Department of Interdisciplinary Medicine, Università di Bari, Bari, Italy
Ram Nagaraj, University of Colorado Denver School of Medicine, Aurora, Colorado, United States
Athanasios G. Papavassiliou, National and Kapodistrian University of Athens School of Health Sciences, Athens, Greece
Samir Kumar Patra, National Institute of Technology Rourkela Department of Life Science, Rourkela, India
Raghavan Raju, Augusta University, Augusta, Georgia, United States
Hemachandra Reddy, Texas Tech University System, Lubbock, Texas, United States
Jun Ren, University of Wyoming Family Medicine Residency Program - Cheyenne, Cheyenne, Wyoming, United States
Manfredi Rizzo, University of Palermo, Palermo, Italy
Luis Sobrevia, Pontifical Catholic University of Chile, Santiago de Chile, Chile
Mark Sussman, San Diego State University Department of Biology, San Diego, California, United States

Russell H. Swerdlow, University of Kansas School of Medicine, Kansas City, Kansas, United States
Ya-Xiong Tao, Auburn University, Auburn, Alabama, United States
Angela M. Valverde, Biomedical Research Network Centre of Diabetes and Associated Metabolic Diseases, Madrid, Spain
Holly Van Remmen, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, Oklahoma, United States
Arthur J. Verhoeven, Academic Medical Center, Amsterdam, Netherlands
Patricia Wilson, University College London, London, United Kingdom
Silvana Zanolungo, Pontifical Catholic University of Chile, Santiago de Chile, Chile
Massimo Zeviani, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom
Yingmei Zhang, Zhongyuan University of Technology, Zhengzhou, China, USA
Xiongwei Zhu, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio, United States

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

BBA *Molecular Basis of Disease* addresses the biochemistry and molecular genetics of disease processes and their models with a specific focus on human disease.

The section covers metabolic, membrane, receptor and immunological disorders, and includes the biochemistry of differentiation disorders, tissue damage and aging. Manuscripts should emphasize the underlying mechanisms of disease pathways and provide novel contributions to the understanding and treatment of these processes. Highly descriptive and method development submissions may be declined without full review.

Types of paper

Full-length research articles (Regular paper), brief reports (BBA Research Letters), review articles and mini-reviews

Reviews and mini-reviews are typically commissioned by the Editors. All Review Articles should be authoritative, state-of-the-art accounts of the selected research field, be of high interest, balanced and accurate. Beyond summaries of important scientific developments and ideas, authors are encouraged to identify and discuss how the field may be impacted or develop in the future, including insights that may be of significance to the scientific community. All BBA Review Articles undergo rigorous and full peer review, in the same way as regular research papers, and publication cannot be guaranteed. The number of co-authors of review articles is limited to five and each author is expected to make a substantial contribution to the writing of the manuscript.

Unsolicited reviews will be considered only in exceptional cases and should be preceded by a letter of enquiry from the prospective author, who should be a recognized expert in the field of the proposed article. Presubmission enquires may be sent to the Editorial Office (bbareviews@elsevier.com). Specifically, authors must provide the following in their review proposal: **1)** Title of the review; **2)** both your own and any co-author(s) affiliation and full contact details; **3)** an explanation of the current interest and significance to the broad readership of the journal, that is, compelling reasons why the review should be considered; **4)** a 500-600 word summary which clearly outlines what will be discussed in the article, plus up to 20 key references that indicate the intended breadth of the proposed article (please note that references should include work published in the past 2-4 years); **5)** A list of the author(s)' most recent publication contributions (up to 5) which are relevant to the field of the proposed review. Only proposals that include this information will be considered. Please be sure to specify which one of the BBA journals you request to consider your proposal.

Reviews (full-length) should provide a comprehensive analysis on topics of broad interest to the journal's readership. Reviews should be thorough, sufficiently critical and accommodate different points of view. They should stand out from other recently published reviews on the same theme. Although Reviews are not of any fixed length, they are usually 6,000 to 10,000 words in length (excluding references and figure legends), include an abstract that is no more than 150 words, up to 100 references (should include titles), and a minimum of three figures/illustrations.

Mini-reviews are succinct, focused updates of the literature related to a question of current interest in the scientific community (typically from the last 2-3 years). Subjects covered in Mini-reviews are generally narrower, either in scope or depth, than those covered in full-length Reviews. They should highlight/analyze/discuss recent and important findings and include the author's viewpoint on how the subject relates to the current state of the field. Mini-reviews are usually 2000 to 4000 words in length (excluding references and figure legends), include an abstract that is no more than 100 words, up to 50 references (should include titles), and one to three figures/illustrations.

BBA Research Letters

BBA Research Letters briefly report on original scientific observations that are either limited in scope or preliminary in nature. The findings should be timely and of high significance for the relevant field of research. With a focus on simple and succinct communication, *BBA Research Letters* do not include headings or extensive introduction, nor do they include an abstract. They are limited to 1,500 words (not including figure legends or references) and no more than 1 key figure or table; the reference list should not exceed 15 entries. Up to 3 additional figures or tables may be included as supplemental materials. The author name(s) and affiliation(s) should be placed at the end of the text.

BBA Research Letters are subject to review and must adhere to the quality standards and ethical guidelines outlined in the general Guide for Authors.

Contact details for submission

Papers should be submitted using the **BBA Molecular Basis of Disease** online submission system <http://ees.elsevier.com/bbadis>. For questions on the submission and reviewing process, please contact the Editorial Office at bbadis@elsevier.com.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association \(Declaration of Helsinki\)](#) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of interest statement using [this template](#) and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. If there are no interests to declare, please choose: 'Declarations of interest: none' in the template. This statement will be published within the article if accepted. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

[More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Elsevier journals comply with current NIH public access policy

Open access

Please visit our Open Access page from the Journal Homepage for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Please submit the names, addresses, and e-mail addresses of 4 potential referees, as well as a brief description of their expertise relevant to your manuscript. Suggested reviewers should be individuals qualified to evaluate the work you have submitted. Editorial Board members who do not have relevant expertise on the topic of your article should not be suggested. Please note that the reviewers suggested may not be current, recent or extensive collaborators of yours, and cannot have been involved in the preparation of the manuscript.

Please note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used. Failure to provide appropriate reviewer suggestions as noted above may result in your manuscript being returned to you without review.

Authors may request exclusion of certain referees if conflicts of interest are anticipated. However, no more than 3 such names should be given. Entire groups, institutions or countries cannot be specified for exclusion.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure your paper includes page numbers - this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Key resources table

To enable reproducibility of the research, we encourage authors to submit a Key Resources Table, which helps make the resources clear to readers. The Key Resources Table highlights the genetically modified organisms and strains, cell lines, reagents and other resources essential to reproduce the results presented in a paper. More information is available here <https://www.elsevier.com/authors/author-resources/key-resources-table>

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

A Regular paper should have a Summary of 100-250 words.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Standards for Reporting Enzymology Data (STREND A)

This journal follows the recommendations of the STREND A (**S**tandards for **R**eporting **E**nzymology **D**ata) Commission of the Beilstein-Institut for the reporting of kinetic and equilibrium binding data. Detailed guidelines can be found at (<http://www.strenda.org/documents.html>) or in this [pdf](#) file.

All reports of kinetic and binding data must include a description of the identity of the catalytic or binding entity (enzyme, protein, nucleic acid or other molecule). This information should include the origin or source of the molecule, its purity, composition, and other characteristics such as post-translational modifications, mutations, and any modifications made to facilitate expression or purification. The assay methods and exact experimental conditions of the assay must be fully described if it is a new assay or provided as a reference to previously published work, with or without modifications. The temperature, pH and pressure (if other than atmospheric) of the assay **must** always be included, even if previously published. In instances where catalytic activity or binding cannot be detected, an estimate of the limit of detection based on the sensitivity and error analysis of the assay should be provided. Ambiguous terms such as "not detectable" should be avoided. A description of the software used for data analysis should be included along with calculated errors for all parameters.

First-order and second-order rate constants: see [pdf](#) for full instructions.

Electrophoretic gels and blots

Manuscripts reporting results from blots (including Western blots) and electrophoretic gels should adhere to the following guidelines: In accordance with our policy on image manipulation, the image should not be adjusted in any way that affects the scientific interpretation displayed, e.g. by strong modification of the background or contrast. Authors should be able to provide original uncropped and unadjusted blots and gels, including molecular size markers, upon request by the editor or any of the reviewers. Similarly, in case the authors use multiple blots for protein quantitation (or draw quantitative conclusions from the blots), the authors should be able to provide upon request pictures of all full blots that have contributed to this quantitation for review purposes. Quantitation should

only be performed using a minimum of 3 blots/gels, each obtained from separate experimental trials. Cropped blots in the body of the paper should retain sufficient space above and below the band (about six band widths). Any non-specific band should be labelled as such and an attempt should be made to explain its nature. The image should include all relevant controls, and controls should be run on the same blot or gel as the samples. The image should also display the position of the molecular weight markers. A figure panel may not include composite images of bands originating from different blots or gels. If the figure shows non-adjacent bands from the same blot or gel, this should be clearly denoted by vertical black lines and the figure legend should provide details of how the figure was prepared. The submission of high-contrast gels and blots is discouraged, as overexposure may mask additional bands. Authors should strive for exposures with gray backgrounds. Multiple exposures should be presented in supplementary information if high contrast is unavoidable.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Image manipulation

While it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable as long as they are applied to the entire image and do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Digital images in manuscripts nearing acceptance for publication may be scrutinized for any indication of improper manipulation. *BBA Molecular Basis of Disease* reserves the right to ask for original data or images and, if these are not satisfactory, we may decide not to accept the manuscript.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/bba-molecular-basis-of-disease>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or

setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

For any further information please visit our customer support site at <https://service.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>