

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

**EFEITOS *IN VITRO* E *EX VIVO* DOS ÁCIDOS METILMALÔNICO E  
PROPIÔNICO SOBRE IMPORTANTES PARÂMETROS DE ESTRESSE  
OXIDATIVO EM CÉREBRO DE RATOS JOVENS**

**MESTRANDA: CAROLINA GONÇALVES FERNANDES**

**ORIENTADOR: PROF. DR. MOACIR WAJNER**

**Porto Alegre, 2011**

## ÍNDICE

<b>PARTE I</b> .....	<b>4</b>
RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTA DE ABREVIATURAS .....	7
<b>I.1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
I.1.1. Erros Inatos do Metabolismo .....	9
I.1.1.1. Conceito e classificação .....	9
I.1.1.2. Sintomatologia .....	11
I.1.2. Acidúrias orgânicas .....	14
I.1.2.1. Acidúrias orgânicas de cadeia ramificada .....	14
I.1.2.1.1. Acidúria metilmalônica .....	15
I.1.2.1.2. Acidúria propiônica .....	15
I.1.2.1.3. Achados clínicos e neuropatológicos .....	18
I.1.2.1.4. Diagnóstico .....	19
I.1.2.1.5. Prognóstico e tratamento .....	20
I.1.2.1.6. Fisiopatologia .....	20
I.1.2.1.6.1. Acidúria metilmalônica .....	21
I.1.2.1.6.2. Acidúria propiônica .....	23
I.1.3. Radicais Livres .....	25
I.1.3.1. Mecanismos do dano celular induzido por radicais livres .....	26
I.1.3.1.1. Lipoperoxidação .....	26
I.1.4. Defesas antioxidantes .....	28
I.1.4.1. Defesas antioxidantes não enzimáticas .....	28
I.1.4.2. Defesas antioxidantes enzimáticas .....	29

I.1.5. Estresse oxidativo .....	29
I.1.6. Suscetibilidade cerebral ao dano oxidativo .....	31
I.1.7. Estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas .....	32
<b>I.2. OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
I.2.1. Objetivo geral .....	34
I.2.2. Objetivos específicos .....	34
<b>PARTE II .....</b>	<b>35</b>
Capítulo I .....	35
<b>PARTE III .....</b>	<b>80</b>
III.1. Discussão .....	81
III.2. Conclusões .....	86
III.3. Perspectivas .....	87
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>

## **PARTE I**

### **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## RESUMO

As acidúrias metilmalônica e propiônica são doenças que afetam o catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada e ácidos graxos de cadeia ímpar causadas pela deficiência das enzimas metilmalonil-CoA mutase (EC 5.4.99.2) e propionil-CoA carboxilase (EC 6.4.1.3), respectivamente. Esses distúrbios são bioquimicamente caracterizados pelo acúmulo tecidual e elevada excreção urinária predominante dos ácidos metilmalônico (MMA) e propiônico (PA). Tendo em vista que os mecanismos responsáveis pelo dano neurológico encontrado nesses distúrbios ainda não estão bem estabelecidos, especialmente no que se refere ao tipo de células neurais vulneráveis à ação tóxica, o presente trabalho investigou os efeitos *in vitro* do MMA e do PA sobre importantes parâmetros de dano oxidativo lipídico e protéico e sobre a produção de espécies reativas em preparações sinaptossomais de cérebro de ratos jovens que são utilizadas para o estudo de efeitos neurotóxicos de compostos em neurônios. Também foi avaliado os efeitos da administração intraestriatal *in vivo* de MMA ou PA sobre os mesmos parâmetros, bem como sobre as atividades de enzimas antioxidantes em estriado de ratos jovens. Nossos resultados demonstraram que o MMA aumentou *in vitro* e *in vivo* a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em preparações sinaptossomais e no estriado, respectivamente, indicando que o metabólito induz peroxidação lipídica. Verificamos ainda que a adição de MK-801 (antagonista glutamatérgico do tipo NMDA) e dos antioxidantes melatonina e trolox preveniu o aumento nos níveis de TBA-RS causado pelo MMA em sinaptossomas, indicando o envolvimento de receptores de glutamato e de espécies reativas neste efeito. Além disso, o MMA aumentou significativamente a oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína diacetato em sinaptossomas, refletindo um aumento na produção de espécies reativas induzido por esse ácido orgânico. Observamos também que o MMA aumentou a formação de carbonilas *in vitro* em sinaptossomas e a oxidação de grupamentos sulfidrilas *in vivo* em estriado, evidenciando dano oxidativo protéico. A administração intraestriatal de MMA inibiu significativamente a atividade da glutationa peroxidase, ao passo que as atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase não foram alteradas. Por sua vez, o PA não alterou *in vitro* e *in vivo* qualquer dos parâmetros avaliados. O presente estudo indica que o MMA induz estresse oxidativo em sinaptossomas e em estriado, através do aumento da produção de espécies reativas e redução das defesas antioxidantes. Presumimos que o dano oxidativo provavelmente neuronal causado por esse metabólito possa representar um importante mecanismo fisiopatogênico envolvido na disfunção neurológica encontrada nos pacientes afetados pela acidúria metilmalônica.

## ABSTRACT

Propionic acidemia and methylmalonic acidemia are disorders that affect the catabolism of branched-chain amino acids and odd-chain fatty acids caused by deficiency of methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) and propionyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.3) activities, respectively. These disorders are biochemically characterized by tissue accumulation and high urinary excretion of methylmalonic (MMA) and propionic (PA) acids. Considering that the pathomechanisms of brain damage found in propionic and methylmalonic acidemias are not well established, specially regarding the type of neural cells vulnerable to the toxicity, the present study investigated the *in vitro* effects of MMA and PA on important parameters of lipid and protein oxidative damage and on the production of reactive species in synaptosomal preparations from brain of young rats used to study the neurotoxic effects of compounds on neurons. The *in vivo* effects of intrastriatal administration of MMA or PA on the same parameters, as well as on enzymatic antioxidant defenses, were also evaluated in striatum of young rats. It was observed *in vitro* and *in vivo* that MMA increased thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) levels in synaptosomal preparations and in striatum, respectively, indicating that this organic acid induces lipid peroxidation. Furthermore, the lipid oxidative damage was attenuated by the free radical scavengers  $\alpha$ -tocopherol and melatonin and by the NMDA glutamate receptor antagonist MK-801, implying the involvement of reactive species and glutamate receptor activation in these effects. In addition, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate oxidation was significantly increased in synaptosomes by MMA *in vitro*, reinforcing the observation that reactive species generation is elicited by MMA. We also found that MMA increased carbonyl formation *in vitro* and sulfhydryl oxidation *in vivo*, suggesting that this metabolite induces protein oxidative damage. Moreover, intrastriatal administration of MMA significantly inhibited glutathione peroxidase activity, whereas it did not alter the activities of superoxide dismutase and catalase. PA did not modify these parameters *in vivo* and *in vitro*. Our data showed that MMA induces lipid and protein oxidative damage in synaptosomes and in striatum mediated by increased production of reactive species and the reduction of antioxidant defenses. Therefore, it is presumed that the cellular oxidative damage caused by MMA may represent an important pathophysiological mechanism involved in the neurological dysfunction found in patients affected by methylmalonic acidemia.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – adenosina-5'-trifosfato;

CAT – catalase;

CoA – Coenzima A;

DCF-DA – 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato;

DNA – ácido desoxiribonucleico;

EIM – erros inatos do metabolismo;

ERN – espécies reativas de nitrogênio;

ERO – espécies reativas de oxigênio;

GPx – glutaciona peroxidase;

GR – glutaciona redutase;

GSH – glutaciona reduzida;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio;

HNE – 4-hidroxinonenal;

LCR – líquido cefaloraquidiano;

LDL – lipoproteína de baixa densidade;

L-NAME – N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster;

LOOH – lipoperóxido;

MCM – metilmalonil-CoA mutase;

MDA – malondialdeído;

MEL – melatonina;

MMA – ácido metilmalônico;

MnSOD – superóxido dismutase manganês;

NMDA – N-metil-D-aspartato;

NO• – óxido nítrico;

O<sub>2</sub> – oxigênio molecular;

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – oxigênio singlete;

8-OHdGA – 8-hidróxi-2'-deoxiguanosina;

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – ânion superóxido;

OH• – radical hidroxila;

ONOO<sup>-</sup> – peroxinitrito;

PA – ácido propiônico;

PCC – propionil-CoA carboxilase;

PUFA – ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada;

RNA – ácido ribonucléico;

SOD – superóxido dismutase;

TBA-RS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;

TRO – trolox.



## **I.1. INTRODUÇÃO**

### **I.1.1. Erros Inatos do Metabolismo (EIM)**

#### **I.1.1.1. Conceito e classificação**

O termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi utilizado pela primeira vez por Archibald Garrod em 1908 através de estudos realizados em pacientes com alcaptonúria, doença em que os afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. O pesquisador observou que, frequentemente, um ou mais indivíduos da mesma família demonstravam ser afetados sem que seus pais ou demais parentes apresentassem a doença. Baseado também na observação da maior incidência de consanguinidade entre os pais dos pacientes e nas leis de Mendel, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio. Através da determinação do ácido homogentísico na urina de pacientes com alcaptonúria e da observação de que esta substância era um metabólito normal da degradação da tirosina, ele relacionou este acúmulo a um bloqueio na conversão do ácido homogentísico até fumarato e acetoacetato. Verificou-se mais tarde que tais alterações resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína enzimática (SCRIVER *et al.*, 2001).

A maioria dos EIM deve-se à deficiência na atividade de uma enzima. A ausência ou deficiência severa da atividade enzimática leva a um bloqueio metabólico com acúmulo dos substratos e seus derivados, com repercussão clínica variável no indivíduo, dependendo da importância da rota afetada. No entanto, geralmente provocam sintomatologia grave e, algumas vezes, letal. Os EIM já foram descritos em todas as áreas do metabolismo humano normal (MITCHELL e FUKAO, 2001).

Sinclair (1982) classificou os EIM em quatro grandes grupos conforme o tipo de função exercida pela proteína deficiente e o tecido envolvido, considerando ainda aspectos clínicos, bioquímicos, patológicos e terapêuticos:

- a) Desordens de transporte: envolvem proteínas transportadoras de moléculas orgânicas ou inorgânicas. Exemplos: deficiência de dissacaridases e defeito no transporte de magnésio.
- b) Desordens de armazenamento, degradação e secreção: envolvem proteínas relacionadas com o aparelho de Golgi ou lisossomos, na sua grande maioria, provocando acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos. Exemplos: doenças lisossômicas de depósito, glicogenoses e cistinose.
- c) Desordens de síntese: envolvem a síntese de proteínas com funções hormonais, de defesa imunológica, estrutural, etc. Exemplo: hiperplasia adrenal congênita por deficiência na atividade da enzima 21-hidroxilase, hipogamaglobulinemia.
- d) Desordens do metabolismo intermediário: caracterizam-se por deficiências enzimáticas das rotas do metabolismo intermediário de moléculas pequenas, comprometendo importantes rotas, como o ciclo do ácido tricarbóxico, o ciclo da uréia ou outras rotas. Assim, o substrato da enzima deficiente se acumula e, a menos que haja uma rota alternativa para metabolizá-lo, o produto final da reação não será formado. Os mecanismos de injúria podem ocorrer pela ação do substrato acumulado ou por seus derivados que podem ser tóxicos, levando a alterações bioquímicas e danos em determinados tecidos por serem liberados na circulação e transportados para todo o organismo, ou pela falta de substâncias essenciais ao desenvolvimento do organismo causada pelo bloqueio metabólico. Considerados os mais frequentes EIM, essas desordens têm como exemplo as acidúrias orgânicas, as aminoacidopatias, as desordens do metabolismo das purinas e pentoses, entre outros.

A identificação de um EIM permite, muitas vezes, a introdução de um tratamento eficaz. Quando isso é possível, a ocorrência de outros afetados no mesmo grupo familiar pode ser evitada pela identificação de casais em risco, aos quais pode ser oferecido o aconselhamento genético e, em muitos casos, o diagnóstico pré-natal (SCRIVER *et al.*, 2001).

### **I.1.1.2. Sintomatologia**

Os pacientes portadores de EIM apresentam sintomas muito variados e inespecíficos, inclusive aqueles que possuem o mesmo distúrbio. Essa variação fenotípica deve-se a diferentes graus de deficiência enzimática, área do metabolismo envolvida e tecidos afetados. No entanto, algumas manifestações clínicas aparecem com maior frequência no período neonatal, tais como retardo no crescimento, vômitos, diarreia, convulsões, letargia ou coma, odor peculiar na pele ou urina e dificuldade alimentar, enquanto outras (atraso no desenvolvimento psicomotor, neurodegeneração progressiva) podem aparecer mais tarde (BURTON, 1987).

Outros sintomas e sinais clínicos devem alertar o médico para esse grupo de doenças. A forma de aparecimento dos sintomas é um fator importante na distinção entre os EIM devido a alterações do metabolismo intermediário e EIM devidos ao depósito intracelular de macromoléculas. Os defeitos do metabolismo intermediário que levam ao acúmulo de moléculas pequenas (aminoácidos e ácidos orgânicos) geralmente têm uma apresentação clínica súbita e a evolução se caracteriza por episódios de agudização recorrentes geralmente precedidos por infecções, ingestão alimentar exagerada de alimentos específicos, cirurgia, jejum ou outras condições de catabolismo elevado, já que nestas situações ocorre degradação de proteínas ou lipídeos que vão originar os metabólitos potencialmente tóxicos (ex.: defeitos do ciclo da uréia e acidemias orgânicas). São consideradas doenças de intoxicação e/ou de comprometimento do metabolismo energético, pois várias dessas entidades patológicas caracterizam-se por prejuízo deste sistema (SCRIVER *et al.*, 2001).

Nos intervalos entre as crises os pacientes podem estar clinicamente normais. Para muitas destas doenças é, portanto, essencial que as amostras para análise laboratorial sejam coletadas nos momentos de crise metabólica. O exame físico geralmente é inespecífico assim como os exames histopatológicos dos órgãos mais afetados. O tratamento agudo com restrição alimentar específica (proteínas, lipídios ou glicídios) associada ou não à suplementação de vitaminas (que ajudam as reações enzimáticas) mostra resultados extraordinários, retirando o paciente da crise em poucas horas. Um outro grupo dessas doenças mostra uma evolução crônica desde o nascimento ou nos primeiros meses ou anos de vida. Nesses casos, a intoxicação é crônica (ex.: fenilcetonúria) e os afetados apresentam um atraso na aquisição das habilidades motoras, não adquirindo em muitos casos as habilidades cognitivas normais (SCRIVER *et al.*, 2001).

A Tabela I mostra os principais achados clínico-laboratoriais que devem levar à suspeita de um EIM de intoxicação ou de deficiência energética (erros inatos devidos à alteração do metabolismo de moléculas pequenas). Pode-se observar que os sintomas predominantes são neurológicos, sugerindo que este tecido é mais suscetível aos metabólitos acumulados nestas doenças.

## **Tabela I**

Principais manifestações clínicas dos erros inatos do metabolismo de moléculas pequenas

---

<b>Neonato</b>
Vômitos incoercíveis Recusa alimentar Hipotonia/hipertonia Letargia, coma intermitente Convulsões de causa desconhecida Mioclonias Miopatia/cardiomiopatia Taquipnéia/apnéia Dismorfismo Odor peculiar na urina ou no paciente Macrocefalia
<b>Criança com até 10 anos de idade</b>
Intolerância alimentar Atraso no desenvolvimento físico e psicomotor Ataxia, hipotonia, coreoatetose, paraparesia espástica, marcha anormal Microcefala/macrocefala, distúrbio de comportamento Hepatomegalia/hepatopatia, pancreatite, urolitíase, disfunção tubular renal Deslocamento de cristalino e atrofia ótica Alterações esqueléticas Alopecia, alterações pigmentares na pele e cabelos Odor peculiar na urina ou no paciente Doença aguda precipitada por estresse (infecção, cirurgia ou indiscrição alimentar)
<b>Adolescente até a fase juvenil</b>
Retardo mental, estupor ou ataxia episódica, sintomas neuropsiquiátricos, letargia, coma Oclusão vascular prematura Hepatomegalia, urolitíase Deslocamento do cristalino, retinite pigmentar Alterações esqueléticas Odor peculiar Doença aguda precipitada por estresse (infecção, cirurgia ou indiscrição alimentar)

---

Fonte: baseada em SCRIVER *et al.*, 2001

Por outro lado, os EIM de moléculas complexas ou de organelas (doenças lisossômicas de depósito e peroxissomais) manifestam-se na sua quase totalidade de uma forma crônica e progressiva, atingindo tecidos e órgãos (fígado, baço, medula óssea e encéfalo) em que os substratos (glicogênio, lipídeos complexos e mucopolissacarídeos), que não podem ser degradados, ali se depositam. É comum encontrar nesses pacientes distorções e sinais clínicos específicos (hepatomegalia, esplenomegalia, leucodistrofia, etc.). A doença geralmente se manifesta após os primeiros meses ou anos de vida e é comum o afetado perder as habilidades motoras e cognitivas que já tinham sido adquiridas. Os exames histopatológicos nos afetados por várias dessas doenças são bastante informativos (presença de glicogênio no fígado nas glicogenoses, de lipídeos específicos em vários tecidos nas lipidoses, etc.). O tratamento dessas doenças, no entanto, é ainda experimental, sendo que a reposição enzimática tem tido sucesso em várias delas recentemente (SCRIVER *et al.*, 2001; HUGHES *et al.*, 2007; CHOI *et al.*, 2008; GRABOWSKI, 2008; ORTIZ *et al.*, 2008; SIMON *et al.*, 2008; VEDDER *et al.*, 2008).

### **I.1.2. Acidúrias Orgânicas**

Acidúrias orgânicas são doenças metabólicas hereditárias caracterizadas pelo acúmulo tecidual e excreção urinária aumentada de ácidos orgânicos produzidos no metabolismo intermediário (SCRIVER *et al.*, 2001).

#### **I.1.2.1. Acidúrias orgânicas de cadeia ramificada**

As acidúrias orgânicas de cadeia ramificada são um grupo de distúrbios resultantes de uma anormalidade hereditária de enzimas específicas que envolvem o catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada, ácidos graxos de cadeia ímpar, entre outros compostos. Dentre elas estão as acidúrias metilmalônica e propiônica (OGIER DE BAULNY e SAUDUBRAY, 2002).

#### **I.1.2.1.1. Acidúria metilmalônica**

A acidúria metilmalônica corresponde a um grupo de doenças geneticamente heterogêneas do metabolismo do metilmalonato e da cobalamina caracterizadas pelo acúmulo predominante de ácido metilmalônico (MMA) no plasma e líquido (3 mM) e na urina (1.000 – 10.000 mmol/mol de creatina) (FENTON *et al.*, 2001; MANOLI e VENDITTI, 2010) dos pacientes afetados, porém estes valores podem aumentar drasticamente durante crises de descompensação metabólica (HOFFMANN *et al.*, 1993). Este acúmulo de MMA geralmente é acompanhado pela produção aumentada de alguns derivados, tais como propionil-CoA, ácido 2-metilcítrico,  $\beta$ -hidroxipropionato e butanona.

A acidúria metilmalônica é uma doença de caráter autossômico recessivo com uma incidência aproximada de 1:50.000 causada pela deficiência da enzima metilmalonil-CoA mutase (MCM), a qual é dependente de adenosilcobalamina (uma forma da vitamina B12) (Figura 1). A MCM é encontrada na forma de um dímero com subunidades idênticas ( $\alpha_2$ ) e é codificada pelo gene *MUT* que está localizado no cromossomo 6p21.2-p12 (DEODATO *et al.*, 2006). As variantes mais comuns da acidúria metilmalônica são a *mut*<sup>0</sup>, na qual a enzima MCM está totalmente inativa e a *mut*<sup>-</sup>, que apresenta 2 a 75% da atividade normal. Mais de 80 mutações para esse gene já foram descritas. Por outro lado, a acidúria metilmalônica também pode acontecer devido a defeitos genéticos na síntese da coenzima adenosilcobalamina e é classificada de acordo com 2 diferentes grupos de complementação: *cbIA*, causado por mutação no gene *MMAA* no cromossomo 4q31; e *cbIB*, causado por mutação no gene *MMAB* no cromossomo 12q24 (OGIER DE BAULNY e SAUDUBRAY, 2002; DEODATO *et al.*, 2006).

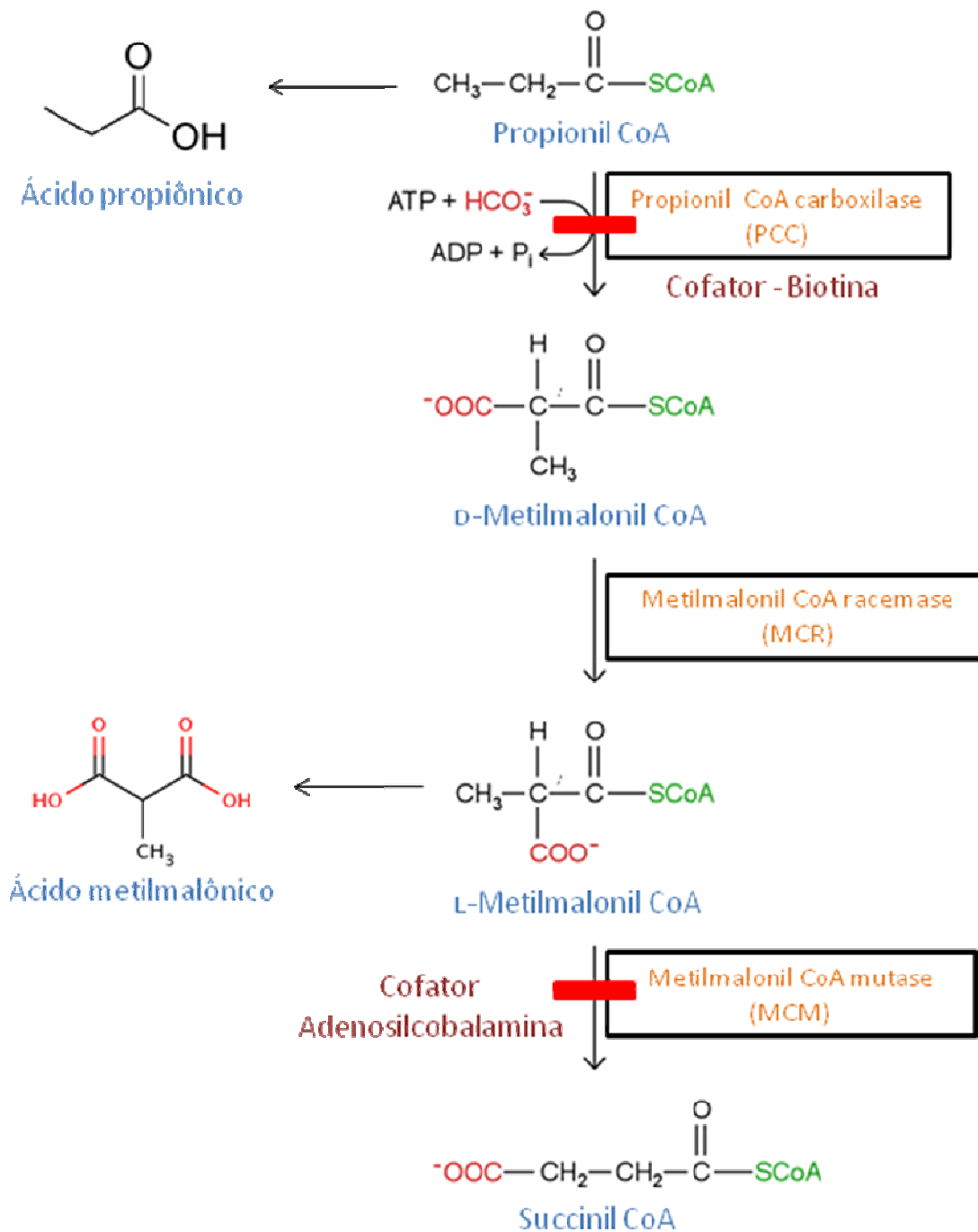
#### **I.1.2.1.2. Acidúria propiônica**

A acidúria propiônica é uma doença de caráter autossômico recessivo causada pela deficiência da atividade da propionil-CoA carboxilase (PCC), uma enzima mitocondrial e dependente de biotina (Figura 1). Essa enzima é formada por subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  não-idênticas (holocarboxilase  $\alpha\beta_6$ ) e a coenzima biotina

encontra-se ligada à subunidade  $\alpha$ . A subunidade  $\alpha$  é codificada pelo gene *PCCA* localizado no cromossomo 13q32, ao passo que a subunidade  $\beta$  é codificada pelo gene *PCCB* do cromossomo 3q13.3-q22. Foram descritas cerca de 40 mutações no *PCCA* e 60 no *PCCB* (FENTON *et al.*, 2001; DEODATO *et al.*, 2006).

A acidúria propiônica apresenta uma incidência de 1:50.000 recém-nascidos e é caracterizada pelo aumento de propionato livre no plasma e no líquido (2,5 a 5 mM) e na urina (11 a 14,5 mg/mg de creatinina) nos pacientes afetados durante as crises de descompensação metabólica, porém estas concentrações podem ser ainda maiores no cérebro (HOFFMANN *et al.*, 1993). Entretanto, o diagnóstico pode ser baseado na identificação de vários subprodutos do ácido propiônico, tais como propionil-carnitina, 3-hidroxiopropionato e metilcitrato. Além disso, durante episódios de crise metabólica o ácido 3-hidroxiisovalérico e intermediários da rota de catabolismo da leucina (ácido tíglico, tiglicina, 2-metil-3-hidroxi butirato, 3-hidroxi butirato, propionilglicina e metilmalonato) também estão aumentados (OGIER DE BAULNY e SAUDUBRAY, 2002).





Fonte: baseada em FENTON *et al.*, 2001

**Figura 1** – Detalhes enzimáticos da rota catabólica do propionil CoA e do metilmalonil CoA.

### **I.1.2.1.3. Achados clínicos e neuropatológicos**

Os sintomas apresentados pelos pacientes portadores das acidúrias metilmalônica e propiônica são muito semelhantes. Na maioria dos casos, em ambas as doenças, os primeiros sintomas aparecem no período neonatal, mas também podem se manifestar mais tardiamente.

No período neonatal os sinais clínicos iniciam normalmente em recém-nascidos que rapidamente pioram sem razão aparente depois de um período completamente livre de sintomas que pode durar horas ou até a primeira semana pós-nascimento. Os sintomas incluem problemas gastrointestinais, hepatomegalia, além de manifestações neurológicas que incluem postura e movimentos anormais, hipotonia generalizada, letargia e convulsões. Se não forem tratados rápida e adequadamente, os pacientes podem progredir até o coma com edema cerebral e morrerem dentro de poucos dias ou desenvolverem dano neurológico permanente (DEODATO *et al.*, 2006).

As mais frequentes manifestações laboratoriais são aumento do ânion gap, hiperuricemia, leucopenia, trombocitopenia, anemia e cetonúria. A hiperamonemia, sinal frequentemente encontrado, é resultante da inibição secundária da carbamilfosfato sintetase do ciclo da uréia pelo acúmulo de propionil-CoA, éster derivado do ácido propiônico (PA). Em alguns casos onde há hiperventilação e alcalose respiratória induzidas pela hiperamonemia, a acidose metabólica pode estar completamente ausente (FENTON *et al.*, 2001; WALTER *et al.*, 1995). Apesar de a maioria dos sinais clínicos e bioquímicos serem semelhantes nas acidúrias orgânicas de cadeia ramificada e nas desordens do ciclo da uréia, foi observado que a perda de peso ao nascer é mais comum nas acidúrias orgânicas, o que facilita o diagnóstico diferencial e permite um tratamento mais precoce e eficaz (DEODATO *et al.*, 2003).

Já nas formas tardias dessas doenças a apresentação clínica é mais variável, podendo ser na forma de encefalopatia aguda com alto risco de vida até sintomas intermitentes ou crônicos, tais como ataxia intermitente, distúrbios

comportamentais, alimentação anormal com recusa proteica, anorexia, vômitos recorrentes, dificuldade no crescimento e retardo no desenvolvimento. As crises recorrentes são normalmente desencadeadas por estresse metabólico (infecções, cirurgias, etc.) que estimulam o catabolismo endógeno ou por ingesta excessiva de proteínas. Similarmente à forma neonatal, esses sintomas são frequentemente relacionados a acidose metabólica, cetonúria e hiperamonemia. Anormalidades hematológicas, particularmente neutropenia, também são frequentes (DEODATO *et al.*, 2006).

Em ambas formas de apresentação, as acidúrias apresentam risco de vida, que é aumentado principalmente durante crises de descompensação metabólica. O início da descompensação deve ser prontamente reconhecido e geralmente inclui recusa alimentar, vômitos e cetonúria (DEODATO *et al.*, 2006).

O achados neuropatológicos das acidúrias metilmalônica e propiônica são similares e incluem desmielinização, atrofia cerebral, anormalidades na substância branca e nos gânglios basais (BRISMAR e OZAND, 1994; FENTON *et al.*, 2001; DEODATO *et al.*, 2006; HARTING *et al.*, 2008). As alterações nos gânglios basais são comumente encontradas no globo pálido, principalmente durante crises de descompensação metabólica onde há aumento acentuado dos níveis dos metabólitos tóxicos (BRISMAR e OZAND, 1994; DEODATO *et al.*, 2006; HARTING *et al.*, 2008).

#### **I.1.2.1.4. Diagnóstico**

As acidúrias metilmalônica e propiônica são diagnosticadas por seus perfis específicos de metabólitos excretados na urina. A análise dos ácidos orgânicos na urina é feita por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas, enquanto o perfil de acilcarnitinas é realizado por espectrometria de massas em *tandem* (JOHNSON *et al.*, 1996; BONAFE *et al.*, 2000; DEODATO *et al.*, 2006). Os pacientes portadores da acidúria propiônica apresentam aumento na excreção urinária dos ácidos propiônico, metilcítrico, 3-hidroxi propiônico e outros metabólitos, tais como propionilglicina, tigilglicina, 3-hidroxi-2-metilbutirato e 2-

metilacetoacetato. Já os pacientes com acidúria metilmalônica isolada apresentam aumento dos ácidos MMA, metilcítico, 3-hidroxi propiônico e outros derivados de propionil-CoA. A análise plasmática de acilcarnitinas detecta propionilcarnitina como o éster de carnitina predominante, além de redução de carnitina livre. Também são observadas anormalidades não específicas através da cromatografia, tais como hiperglicinemia e hiperalaninemia (OGIER DE BAULNY e SAUDUBRAY, 2002; DEODATO *et al.*, 2006). Além disso, em caso de risco durante a gravidez, o diagnóstico pré-natal rápido e confiável pode ser realizado pela medida direta dos metabólitos no líquido amniótico usando GLC-MS, técnicas de diluição de isótopos estáveis ou MS-MS no período gestacional de 3 a 4 meses (OGIER DE BAULNY e SAUDUBRAY, 2002).

Estudos enzimáticos em fibroblastos ou leucócitos periféricos são úteis para confirmação de diagnóstico, para um melhor delineamento do grupo enzimático e, combinado com análise molecular, para determinação da relação genótipo-fenótipo (OGIER DE BAULNY e SAUDUBRAY, 2002).

#### **I.1.2.1.5. Prognóstico e tratamento**

A disfunção neuronal em parte pode ser prevenida pelo diagnóstico precoce e tratamento emergencial seguido por observação e uma dieta restrita. A forma neonatal requer rápida remoção das toxinas e, portanto, a restrição alimentar padrão é utilizada para a sobrevivência neste período, já que limita a formação dos ácidos orgânicos e seus derivados. Além disso, a prevenção e o tratamento precoce de episódios recorrentes de desequilíbrio metabólico é crucial, já que, em qualquer idade, a crise metabólica pode causar sequelas neurológicas ou até mesmo ser fatal (OGIER DE BAULNY e SAUDUBRAY, 2002).

#### **I.1.2.1.6. Fisiopatologia**

A patogênese das acidúrias metilmalônica e propiônica não está bem estabelecida. No entanto, é sugerido que os metabólitos acumulados em tecidos e líquidos biológicos dos pacientes afetados sejam tóxicos e responsáveis por pelo

menos parte dos sintomas apresentados. Os mecanismos pelos quais esses ácidos orgânicos levam aos sintomas característicos dessas desordens ainda não foram totalmente desvendados, porém evidências *in vitro* e *in vivo* indicam alterações no metabolismo energético, nas oxidações biológicas e na neurotransmissão glutamatérgica.

#### **I.1.2.1.6.1. Acidúria metilmalônica**

No que se refere à acidúria metilmalônica, acredita-se que a acidose ocorra devido ao acúmulo de metilmalonil-CoA, que sequestra a CoA, diminuindo seus níveis e acarretando em dano no metabolismo de carboidratos com consequente acidose. Também foi sugerido que o metilmalonil-CoA, por inibir a enzima piruvato carboxilase, interfere na gliconeogênese, levando à hipoglicemia e ao catabolismo excessivo de lipídios com cetose e acidose. Além disso, Halperin e colaboradores (1971) sugeriram que uma inibição da lançadeira do malato causada pelo metilmalonato poderia estar envolvida na hipoglicemia a partir da inibição da gliconeogênese. Já a hiperglicinemia e hiperamonemia provavelmente são devido à inibição do sistema de clivagem da glicina e da carbamoil fosfato sintetase I, respectivamente, pelos ácidos orgânicos e seus ésteres acumulados. Ainda com relação à hiperamonemia, um estudo demonstrou que a administração de MMA em ratos causou diminuição na concentração hepática de *N*-acetilglutamato, provavelmente pela inibição da enzima *N*-acetilglutamato sintetase (COUDE *et al.*, 1979; FENTON *et al.*, 2001).

Também foi demonstrado o envolvimento de radicais livres na fisiopatologia da acidúria metilmalônica. Foi verificado que o MMA induz dano oxidativo lipídico e protéico e reduz as defesas antioxidantes não-enzimáticas *in vitro* e *in vivo* em cérebro de ratos (FONTELLA *et al.*, 2000; FIGHERA *et al.*, 2003; RIGO *et al.*, 2006; FURIAN *et al.*, 2007). Além disso, a administração *in vivo* de ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e creatina resultou em um decréscimo na duração de episódios convulsivos e no estresse oxidativo provocados pela injeção intraestriatal aguda de MMA em ratos (FIGHERA *et al.*, 1999; MALFATTI *et al.*,

2003; MARISCO *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2005; ROYES *et al.*, 2006). Também já foi observado um aumento nos níveis de MnSOD, diminuição de glutatona e anormalidades na morfologia de mitocôndrias de fígado de camundongos nocaute para o gene *mut* (CHANDLER *et al.*, 2009; MURPHY *et al.*, 2010), ao passo que em camundongos nocaute para a enzima iNOS foi observada uma diminuição de estresse oxidativo e de convulsões causadas pela administração de MMA, indicando o envolvimento de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio nos efeitos causados pelo metabólito (RIBEIRO *et al.*, 2009). Finalmente, foi observado que o MMA induz morte celular em culturas primárias de neurônios corticais e que esse efeito é atenuado pela adição de  $\alpha$ -tocoferol, glutatona reduzida (GSH), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no meio de incubação (McLAUGHIN *et al.*, 1998).

Já em fibroblastos de pacientes portadores desse distúrbio foi verificado um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e na expressão da MnSOD (RICHARD *et al.*, 2006, 2007 e 2009). Também foi encontrada uma diminuição de glutatona em plasma de pacientes (TREACY *et al.*, 1996). Estudos recentes evidenciaram que portadores das acidúrias metilmalônica e propiônica apresentam aumento no conteúdo de malondialdeído, na formação de carbonilas e uma diminuição no conteúdo de grupamentos sulfidríla no plasma (RIBAS *et al.*, 2010a,b), reforçando os achados *in vitro* que indicam o envolvimento do estresse oxidativo na acidúria metilmalônica.

Com relação ao metabolismo energético, existem relatos na literatura de que o MMA inibe as atividades das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em cérebro e fígado de ratos, bem como em culturas de células estriatais (DUTRA *et al.*, 1993; TOYOSHIMA *et al.*, 1995; WYSE *et al.*, 2000; BRUSQUE *et al.*, 2001; OKUN *et al.*, 2002). O MMA também causa diminuição na produção de  $\text{CO}_2$  e no consumo de  $\text{O}_2$  (TOYOSHIMA *et al.*, 1995), levando ao aumento na produção de lactato (WAJNER *et al.*, 1992; ROYES *et al.*, 2003) e à depleção de ATP (McLAUGHLIN *et al.*, 1998). Nesse contexto, de Keyzer e colaboradores (2009) demonstraram deficiências nos complexos da

cadeia respiratória em fígado, rins, coração e músculo esquelético de pacientes portadores da acidúria metilmalônica.

No que se refere a alterações da neurotransmissão glutamatérgica, foi observado que o MMA induz alterações comportamentais e convulsões *in vivo* em ratos (WAJNER e COELHO, 1997; FIGHERA *et al.*, 1999 e 2003; PETTENUZZO *et al.*, 2002 e 2003), sendo que esses episódios convulsivos foram totalmente prevenidos pela administração de MK-801, um antagonista NMDA, e atenuadas por succinato (DE MELLO *et al.*, 1996). Além disso, Brusque e colaboradores (2001) observaram aumento na liberação de glutamato e diminuição na captação desse neurotransmissor por vesículas sinaptossomais. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de que o MMA, atuando como um inibidor da cadeia respiratória, causaria uma depleção primária de ATP e, conseqüentemente, excitotoxicidade secundária (ALBIN e GREENAMYRE, 1992; WAJNER e COELHO, 1997; MCLAUGHLIN *et al.*, 1998; KÖLKER *et al.*, 2001; OKUN *et al.*, 2002; ROYES *et al.*, 2003, 2005).

#### **I.1.2.1.6.2. Acidúria propiônica**

Similarmente à acidúria metilmalônica, é sugerido que o acúmulo de metabólitos seja importante na fisiopatogenia da acidúria propiônica. A intolerância a proteínas apresentada pelos pacientes é explicada pelo defeito no catabolismo dos aminoácidos isoleucina, valina, treonina e metionina, ao passo que o acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa e ímpar no fígado reflete provavelmente o aumento na biossíntese desses compostos, já que o propionil-CoA acumulado pode ser usado como precursor desses ácidos graxos. A grande variação fenotípica encontrada nos pacientes pode ser explicada pelas diferenças no conteúdo protéico proveniente da dieta, na contribuição das bactérias do intestino para a geração de propionil-CoA e nas atividades das rotas alternativas responsáveis pela degradação do propionato. A hiperglicinemia parece ser devido à inibição do sistema de clivagem da glicina, enquanto a hiperamonemia é

resultante das inibições das enzimas carbamoil fosfato sintetase I e N-acetilglutamato sintetase (FENTON *et al.*, 2001).

Estudos prévios demonstraram o envolvimento de dano oxidativo nessa acidúria. Nesse contexto, foi verificado que o PA aumenta a produção de espécies reativas, induzindo estresse oxidativo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em homogeneizado de cérebro de ratos, culturas de células e em tecidos de animais submetidos a modelos da acidúria propiônica (FONTELLA *et al.*, 2000; BRUSQUE *et al.*, 2002; PETTENUZZO *et al.*, 2002; RIGO *et al.*, 2006; SCHWAB *et al.*, 2006). Nesse contexto, foi demonstrado que o PA estimula *in vitro* a produção de ânion superóxido em neutrófilos de seres humanos (NAKAO *et al.*, 1998). Já em pacientes portadores da acidúria propiônica foi observada uma diminuição nos níveis plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol (MOYANO *et al.*, 1997) e aumento na excreção urinária de isoprostanos (Mc GUIRE *et al.*, 2009).

Por outro lado, o PA também causa prejuízo do metabolismo energético. Estudos verificaram que o PA inibe as atividades da piruvato desidrogenase, da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e do complexo III da cadeia respiratória em partículas submitocondriais de coração bovino (SCHWAB *et al.*, 2006). Em pacientes com acidúria propiônica também foi encontrada disfunção mitocondrial caracterizada por deficiências na cadeia respiratória em diversos tecidos (CATHELINEAU *et al.*, 1979; STEWART e WALSER, 1980; SCHWAB *et al.*, 2006; de KEYZER *et al.*, 2009) e aumento de lactato no globo pálido (BURLINA *et al.*, 2003). Observou-se ainda que a administração crônica de PA inibe a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e altera parâmetros comportamentais em ratos (WYSE *et al.*, 1998; BRUSQUE *et al.*, 1999; PETTENUZZO *et al.*, 2002). Além disso, as anormalidades encontradas nos gânglios da base têm sido atribuídas à deficiência energética causada pelos ácidos orgânicos neurotóxicos acumulados nessa doença (CHEEMA-DHADLI *et al.*, 1975; BRUSQUE *et al.*, 2002; OKUN *et al.*, 2002).



### I.1.3. Radicais livres

Radicaís livres são moléculas ou átomos que contenham um ou mais elétrons desemparelhados e possuam a capacidade de existir de forma independente (SOUTHORN e POWIS, 1988; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O desemparelhamento de elétrons, situação energeticamente instável, é o que confere alta reatividade a essas espécies. Os radicaís livres podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical. Radicaís podem também ser formados em um processo de fissão homolítica, no qual uma ligação covalente é quebrada e cada elétron do par compartilhado permanece com cada um dos átomos envolvidos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Quando um radical livre reage com um composto não-radical, outro radical livre pode ser formado; assim, a presença de um único radical pode iniciar uma seqüência de reações em cadeia de transferência de elétrons (redox) (MAXWELL, 1995). Nas reações em cadeia induzidas pelos radicaís livres, um radical reativo leva à formação de um produto que também é um radical livre e que, por sua vez, reage produzindo um terceiro radical.

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água ( $H_2O$ ). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido a intermediários reativos como o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), e também o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (BOVERIS e CHANGE, 1973).

O termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para incluir não só os radicaís formados pela redução do  $O_2$  ( $O_2^{\bullet-}$  e  $OH^{\bullet}$ ), mas também alguns não-radicaís derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Além dessas, existem

ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) e o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) as principais representantes.

#### **I.1.3.1. Mecanismos de dano celular induzido por radicais livres**

As ERO e ERN ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos do organismo. Fisiologicamente essas espécies reativas apresentam diversas funções (BERGENDI *et al.*, 1999). Assim, um aumento da liberação local de radicais livres pode ser benéfico, como é o caso da liberação de espécies tóxicas oxidantes pelos neutrófilos, que podem atuar na defesa do hospedeiro contra uma infecção (DELANTY e DICHTER, 1998). Participam ainda de processos de sinalização celular e também estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas (WARD e PETERS, 1995).

Por outro lado, quando formadas em excesso, essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídios e DNA (MAXWELL, 1995). Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, os radicais livres podem promover lipoperoxidação; causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL); reagir com proteínas, levando à sua inativação e consequente alteração de sua função; e também reagir com o DNA e RNA, levando a mutações somáticas e a distúrbios de transcrição (DELANTY e DICHTER, 1998), entre outros efeitos.

##### **I.1.3.1.1. Lipoperoxidação**

Antes de ser vista como um mecanismo de dano oxidativo, a lipoperoxidação deve ser considerada como um processo fisiológico contínuo que ocorre normalmente nas membranas celulares. Além de ser um fator de renovação da membrana, este processo é essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose. No entanto, por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo. Assim, quando a produção de espécies reativas aumentar além da capacidade de detoxificação, esse processo

será exacerbado, e com isso, a lipoperoxidação poderá acarretar profundas alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Isso irá causar perda de seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (HNE), entre outros eventos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Sob pH fisiológico, o MDA ataca proteínas e bases do DNA, causando lesões mutagênicas (DRAPER e HADLEY, 1990). O HNE pode provocar dano no DNA mitocondrial, inibir a síntese protéica e induzir atividade quimiotáxica ou lise celular e morte (ESTERBAUER *et al.*, 1991). HNE parece ser particularmente citotóxico a células neurais (KARLHUBER *et al.*, 1997; MARK *et al.*, 1997; KELLER *et al.*, 1999). Nesse contexto, a formação de HNE precede a morte neuronal (ONG *et al.*, 2000) e concentrações desse produto lipídico aumentadas são encontradas em tecido cerebral de pacientes afetados por diversas doenças neurodegenerativas (JENNER, 2003). Por lesar proteínas de membranas, esses produtos de lipoperoxidação podem também inibir a atividade de importantes enzimas de membranas, como  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, glicerol-3-fosfato aciltransferase, glicose-6-fosfatase e  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase, e também canais de potássio (DUPRAT *et al.*, 1995; McCONNELL *et al.*, 1999).

A lipoperoxidação é representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A iniciação é causada pelo ataque a um lipídio de membrana por parte de qualquer espécie que tenha reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ). Nesse contexto, radicais hidroxila podem prontamente iniciar a lipoperoxidação. Já que o átomo de hidrogênio tem apenas um elétron, a abstração de  $\text{H}^\bullet$  de um grupo metileno deixa um elétron desemparelhado no carbono ( $-\dot{\text{C}}\text{H}-$ ). Esse radical formado é geralmente estabilizado por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. O destino mais provável desse radical é reagir com o  $\text{O}_2$ , formando um radical peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ). Os radicais peroxila, por sua vez, são capazes de abstrair um próton de outra molécula lipídica, sendo esta fase conhecida como a fase de propagação. O radical de carbono formado pode reagir com o  $\text{O}_2$  para formar outro radical

peroxila, e assim sucessivamente. A abstração de um hidrogênio de outro lipídio por parte do radical peroxila gerará um hidroperóxido lipídico (LOOH). O término da reação poderá ocorrer quando dois radicais produzidos nas etapas anteriores reagirem entre si, formando um produto estável (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

#### **I.1.4. Defesas antioxidantes**

Antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que reduzem a formação de radicais livres ou reagem com os mesmos, neutralizando-os. A célula pode se proteger contra o dano oxidativo através de antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos.

Embora diferindo na composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo e compreendem agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, entre outras; proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo), ao se ligarem aos mesmos como as transferrinas; proteínas que protegem biomoléculas de danos (incluindo dano oxidativo) por outros mecanismos; agentes de baixo peso molecular que aprisionam ERO e ERN, como glutatona,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

##### **I.1.4.1. Defesas antioxidantes não enzimáticas**

As defesas antioxidantes não enzimáticas podem ser separadas em dois grandes grupos: agentes hidrossolúveis e lipossolúveis. O primeiro grupo inclui glutatona reduzida (GSH), ácido ascórbico, ácido úrico, melatonina, os cofatores selênio e coenzima Q10 e proteínas plasmáticas. O tripeptídeo GSH é um dos mais efetivos e abundantes antioxidantes contra ROS, particularmente no cérebro onde as concentrações alcançam 1-10mmol/L (BAST, 1993). GSH mantém o equilíbrio redox na célula e inativa EROs. Ácido ascórbico também parece ser muito importante no cérebro porque células neurais têm um sistema de captação

altamente eficiente e os níveis de ácido ascórbico no LCR são muito mais altos do que no plasma (LONNROT *et al.*, 1996).

#### **I.1.4.2. Defesas antioxidantes enzimáticas**

A atividade de antioxidantes enzimáticos também é importante para a detoxificação de radicais livres. Exemplos desses são as izoenzimas da superóxido dismutase contendo cobre e zinco (Cu, Zn-SOD) ou magnésio (Mn-SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPx) e a glutatona redutase (GR). Qualquer desequilíbrio nesse sistema pode resultar em um aumento de radicais livres derivados do oxigênio. As isoformas Cu, Zn-SOD e Mn-SOD estão presentes no citosol e mitocôndria cerebrais, e juntos com a GSH, representam a linha de defesa mais importante contra a toxicidade do  $O_2^{\bullet-}$ . Isoformas da SOD geram  $H_2O_2$ , o qual é removido pela atividade da GPx combinada com GSH ou GR, ou pela CAT (CHANCE *et al.*, 1979; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), ou adicionalmente por outras peroxidases (CHAE *et al.*, 1999).

#### **I.1.5. Estresse oxidativo**

Espécies reativas são necessárias para a função normal da célula, servindo como moléculas de sinalização para importantes processos fisiológicos. Elas são continuamente produzidas e neutralizadas por sistemas de defesa antioxidante. No entanto, quando produzidas em altas concentrações ou quando defesas antioxidantes estão deficientes, elas podem causar dano celular. Se o aumento de espécies reativas é relativamente pequeno, a resposta antioxidante será suficiente para compensar esse aumento. No entanto, sob certas condições patológicas, a produção de espécies reativas está muito aumentada, e as defesas antioxidantes podem ser insuficientes para restabelecer a homeostase redox.

O rompimento entre o equilíbrio pró-oxidante e antioxidante é descrito como estresse oxidativo, e pode representar um mecanismo fundamental de doenças humanas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; SIES, 1985). Assim, o termo “Estresse Oxidativo” é usado para se referir à situação na qual a geração de

espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis. Pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a combinação de quaisquer desses fatores (HALLIWELL, 2001).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular. Quando ocorre adaptação, as células podem geralmente tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em ativação da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço oxidante/antioxidante. Apesar disso, nem sempre o estresse oxidativo precisa envolver defesas antioxidantes aumentadas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

No dano celular, o estresse oxidativo pode danificar todos os alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A resposta à injúria pode ser reversível: a célula entra em *steady state* alterado temporário ou prolongado que não leva à morte celular.

A morte celular pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose. Na morte celular por necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. Pode haver a liberação de antioxidantes, como a catalase e a glutatona, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e proteínas do grupo HEME, agentes esses que podem afetar as células adjacentes, podendo até mesmo impor a elas um estresse oxidativo. Já na apoptose, o mecanismo intrínseco de suicídio celular é ativado, e não há a liberação do conteúdo celular. A morte celular por apoptose pode ser acelerada em certas doenças, como as desordens neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Além da indução de necrose e apoptose, o estresse oxidativo pode levar a um aumento da lipoperoxidação, cujos produtos (MDA e HNE, entre outros) são altamente neurotóxicos, e a um dano oxidativo tanto às proteínas, inibindo a atividade de diversas enzimas e alterando a função celular, quanto ao DNA,

causando alteração de bases púricas e pirimídicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

#### **I.1.6. Suscetibilidade cerebral ao dano oxidativo**

O cérebro é altamente dependente de energia para o seu funcionamento normal e a mitocôndria é a estrutura intracelular responsável pela produção dessa energia. Para a produção eficiente de energia na forma de ATP, a mitocôndria possui uma alta demanda por oxigênio, já que utiliza uma grande quantidade de  $O_2$  em uma massa de tecido relativamente pequena, o que torna esse tecido altamente susceptível à ação de espécies reativas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

E a presença de membranas celulares ricas em ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada (PUFA), os quais são especialmente sensíveis ao ataque de radicais livres e consequente oxidação de lipídios pode levar ao dano por radicais livres no tecido cerebral. O alto conteúdo de ferro, o qual favorece a lipoperoxidação e autooxidação de neurotransmissores através do  $OH^\bullet$  formado na reação de Fenton (ZALESKA e FLOYD, 1985), a considerável quantidade de microglia, macrófagos residentes do sistema nervoso que podem produzir  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , sua modesta defesa antioxidante, sendo os níveis de catalase particularmente baixos em muitas regiões cerebrais (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1996; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), aumentam a suscetibilidade do cérebro ao dano causado por radicais livres.

Além disso, uma disfunção mitocondrial pode ocorrer por diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória com um consequente prejuízo no transporte de elétrons, o que leva a uma dispersão dos elétrons na forma de radicais livres potencialmente danosos à célula (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

### **I.1.7. Estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas**

Numerosas evidências sugerem que os radicais livres e o estresse oxidativo possam estar envolvidos na patogênese dos danos neurológicos de várias doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica. Como medida de parâmetros de estresse oxidativo, existe um considerável número de casos onde se relatou aumento nos níveis de MDA e HNE no cérebro de pacientes, além de produtos da oxidação protéica, como grupos carbonil e 3-nitrotirosina, e também produtos que resultam da oxidação de DNA, bem como concentrações reduzidas dos antioxidantes não enzimáticos GSH e ácido ascórbico e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx (JENNER e OLANOW 1996; LIU *et al.*, 1999; PERRY *et al.*, 2003).

Estudos demonstraram uma diminuição na atividade do complexo I da cadeia respiratória em cérebros *postmortem* de pacientes portadores de doença de Parkinson. Essa inibição do complexo I pode acarretar na geração de espécies reativas, tais como ânion superóxido, radicais hidroxila e peroxinitrito, as quais poderiam causar um prejuízo ainda maior na cadeia transportadora de elétrons. Dessa forma, é possível que o estresse oxidativo e as disfunções mitocondriais formem um ciclo vicioso na doença de Parkinson (SCHAPIRA *et al.*, 1989, 1990a,b; JANETSKY *et al.*, 1994; GU *et al.*, 1996).

Na doença de Alzheimer, a mais comum dentre as doenças neurodegenerativas, é possível que o estresse oxidativo tenha um papel chave na morte neuronal. Tem sido proposto que o peptídeo  $\beta$ -amilóide, o formador das chamadas placas senis, tenha a capacidade de gerar radicais livres espontaneamente. Estudos *in vivo* também evidenciaram um dano oxidativo em cérebros humanos *postmortem* com doença de Alzheimer através da observação de aumento de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdGA), produtos de oxidação de outras bases e de RNA, carbonilas de proteínas, nitrotirosina e marcadores de



peroxidação lipídica (SMITH *et al.*, 1991; MARKESBERY *et al.*, 1999; NOUROOZ-ZADEH *et al.*, 1999; LOVELL *et al.*, 2000).

## **I.2. OBJETIVOS**

### **I.2.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi investigar os efeitos *in vitro* e *ex vivo* dos ácidos propiônico (PA) e metilmalônico (MMA) sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos jovens, visando uma melhor compreensão dos mecanismos neurotóxicos das acidúrias metilmalônica e propiônica.

### **I.2.2. Objetivos específicos**

- Investigar os efeitos *in vitro* do MMA e do PA sobre o dano oxidativo lipídico, medido através dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), em sinaptossomas de cérebro total de ratos jovens.
- Investigar os efeitos *in vitro* do MMA e do PA sobre o dano oxidativo protéico, medido através da formação de carbonilas, em sinaptossomas de cérebro total de ratos jovens.
- Investigar os efeitos *in vitro* do MMA e do PA sobre a formação de espécies reativas de oxigênio, medida através da oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) em sinaptossomas de cérebro total de ratos jovens.
- Investigar os efeitos da administração intraestriatal do MMA e PA sobre o dano oxidativo lipídico, medido através dos níveis de TBA-RS, em estriado de ratos jovens sacrificados 30 min após a injeção.
- Investigar os efeitos da administração intraestriatal do MMA e PA sobre o dano oxidativo protéico, medido através do conteúdo de grupamentos sulfidrilas, em estriado de ratos jovens sacrificados 30 min após a injeção.
- Investigar os efeitos da administração intraestriatal do MMA e PA sobre as atividades das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em estriado de ratos jovens sacrificados 30 min após a injeção.

## **PARTE II**

### **ARTIGO CIENTÍFICO**

# Capítulo I

## **Experimental evidence that methylmalonic acid provokes oxidative damage and compromises antioxidant defences in nerve terminal and striatum of young rats**

Carolina Gonçalves Fernandes, Clarissa Günther Borges, Bianca Seminotti, Alexandre Umpierrez Amaral, Lisiane Aurélio Knebel, Paula Eichler, Anderson Büker de Oliveira, Guilhian Leipnitz<sup>1</sup> and Moacir Wajner.

Artigo científico submetido para publicação no periódico

Cellular and Molecular Neurobiology

**Experimental evidence that methylmalonic acid provokes oxidative damage  
and compromises antioxidant defenses in nerve terminal and striatum of  
young rats**

Carolina Gonçalves Fernandes<sup>a</sup>, Clarissa Günther Borges<sup>a</sup>, Bianca Seminotti<sup>a</sup>,  
Alexandre Umpierrez Amaral<sup>a</sup>, Lisiane Aurélio Knebel<sup>a</sup>, Paula Eichler<sup>a</sup>, Anderson  
Büker de Oliveira<sup>a,b</sup>, Guilhian Leipnitz<sup>a</sup> and Moacir Wajner<sup>a,b\*</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil.

<sup>b</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre –  
RS, Brazil.

**Short running title:** Methylmalonic acid elicits oxidative stress in rat brain

**\*Corresponding Author:** Moacir Wajner, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências  
Básicas da Saúde, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 –  
Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS – Brazil. Phone: +55 51 3308-5571, fax: +55 51 3308-  
5540, e-mail: [mwajner@ufrgs.br](mailto:mwajner@ufrgs.br)

## **Abstract**

Methylmalonic acidemia and propionic acidemia are organic acidemias biochemically characterized by predominant tissue accumulation of methylmalonic (MMA) and propionic (PA) acids, respectively. Affected patients present predominantly neurological symptoms, whose pathogenesis is not yet fully established. In the present study we investigated the *in vitro* effects of MMA and PA on important parameters of lipid and protein oxidative damage and on the production of reactive species in synaptosomes from cerebrum of developing rats. Synaptosomes correspond to nerve terminals that have been used to investigate toxic properties of compounds on neuronal cells. The *in vivo* effects of intrastriatal injection of MMA and PA on the same parameters and on enzymatic antioxidant defenses, were also studied. MMA induced *in vitro* and *in vivo* lipid peroxidation and protein oxidative damage. Furthermore, the lipid oxidative damage was attenuated or prevented, pending on the doses utilized, by the free radical scavengers  $\alpha$ -tocopherol, melatonin and by the NMDA glutamate receptor antagonist MK-801, implying the involvement of reactive species and glutamate receptor activation in these effects. In addition, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate oxidation was significantly increased in synaptosomes by MMA, reinforcing that reactive species generation is elicited by this organic acid. We also verified that glutathione peroxidase activity was inhibited by intrastriatal MMA injection. In contrast, PA did not induce any significant effect on all parameters examined *in vitro* and *in vivo*, implying a selective action for MMA. The present data demonstrate that oxidative stress is induced by MMA *in vitro* in nerve terminals and

*in vivo* in striatum, suggesting the participation of neuronal cells in MMA-elicited oxidative damage.

**Keywords:** Methylmalonic acidemia, propionic acidemia, methylmalonic acid, propionic acid, oxidative stress, brain synaptosomes, striatum

## Introduction

Methylmalonic acidemia and propionic acidemia are frequent organic acidurias caused by a severe deficiency of methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) and propionyl-CoA carboxylase activities (EC 6.4.1.3), respectively. They are biochemically characterized by predominant blood accumulation of methylmalonic acid (MMA) (1-2.5 mM) and propionic acid (PA) (5 mM), respectively, although the concentrations of 3-hydroxypropionic acid, methylcitric acid, propionylglycine and tiglylglycine are also increased. Other laboratory findings include ketoacidosis, hypoglycemia, hyperglycinemia, hyperammonemia, neutropenia and trombocitopenia (Fenton et al. 2001; Hörster et al. 2009). Affected patients usually present early in life lethargy, vomiting, dehydration, hepatomegaly, hypotonia and encephalopathy that may lead to coma and death (Deodato et al. 2006; Manoli and Venditti 2010). Other neurological abnormalities are psychomotor delay/mental retardation, focal and generalized convulsions, EEG alterations, delayed myelination (progressive cortical atrophy) and hypodensity of the basal ganglia (Brismar and Ozand 1994; Chemelli et al. 2000; Harting et al. 2008).

Clinical presentation of propionic acidemia usually occurs in the newborn period with severe metabolic acidosis, vomiting, hypotonia, lethargy, seizures and hepatomegaly, although in some patients symptoms may occur later, with acute encephalopathy, episodic ketoacidosis and developmental retardation (Wolf et al. 1981; Surtees et al. 1992; Manoli and Venditti 2010). Treatment of these patients is difficult usually leading to neurological sequelae, including dystonia, chorea, pyramidal signs, developmental delay, focal and general convulsions, cerebral atrophy and EEG abnormalities (Surtees et al. 1992).



Regarding methylmalonic acidemia, clinical presentation usually occurs in the first week of life and the most common signs and symptoms are lethargy, failure to thrive, recurrent vomiting, respiratory distress and hypotonia, although hepatomegaly and coma is relatively frequent (Shevell et al. 1993; Fenton et al. 2001). Neurological sequelae are similar to that of propionic acidemic patients.

On the other hand, although patients present severe neurological symptoms and cerebral abnormalities, the pathophysiology of brain damage in these disorders is only partly understood. In this context, it has been suggested that brain damage in methylmalonic and propionic acidemias is mainly driven by the accumulating metabolites since it appears that these endogenous compounds are produced and trapped in neural cells (Kölker et al. 2006; Stellmer et al. 2007; Sauer et al. 2006, 2010).

MMA has been demonstrated to provoke behavioral alterations, seizures and striatal lesions in rats after intrastriatal administration through activation of glutamate receptors, energy depletion and oxidative damage (de Mello et al. 1996; Wyse et al. 2000; Figuera et al. 2003; Malfatti et al. 2003; Ribeiro et al. 2005; Royes et al. 2003, 2005, 2006; Furian et al. 2007). Other experimental studies confirmed that impairment of brain mitochondrial energy metabolism, alterations of the redox status and glutamatergic neurotransmission may represent important pathomechanisms of MMA neurotoxicity (Wajner and Coelho 1997; McLaughlin et al. 1998; Fontella et al. 2000; Kölker et al. 2000; Brusque et al. 2001, 2002; Okun et al. 2002; Malfatti et al. 2003; Pettenuzzo et al. 2006).

Furthermore, there is solid evidence showing that oxidative stress and mitochondrial dysfunction play important roles as pathogenic mechanisms in

patients and mice models with methylmalonic acidemia (Treacy et al. 1996; Richard et al. 2005, 2007, 2009; Chandler et al. 2009; de Keyser et al. 2009; Ribas et al. 2010a,b).

Neurotoxic effects of PA have been also reported but to a lesser extent (Wyse et al. 1998; Brusque et al. 1999; de Mattos-Dutra et al. 2000; Fontella et al. 2000; Pettenuzzo et al. 2002; Trindade et al. 2002; Rigo et al. 2006; Ribas et al. 2010a,b). Thus, it has been observed that PA induces lipid peroxidation and decreases non-enzymatic antioxidant defenses *in vitro* (Fontella et al. 2000) and reduces tissue antioxidant defenses in the hippocampus *in vivo* (Pettenuzzo et al. 2002). In addition, Rigo et al. (2006) demonstrated that PA causes seizures and induces carbonyl formation in rat striatum after intrastriatal administration and that these effects are prevented by MK-801, a glutamatergic receptor antagonist, suggesting the involvement of glutamate receptors in these effects. Leukocyte DNA damage and induction of lipid and protein oxidative damage were also observed in plasma of patients affected by propionic acidemia and methylmalonic acidemia (Ribas et al. 2010a,b).

However, although oxidative stress was shown to occur in animal models and in humans with methylmalonic and propionic acidemia (Fontella et al. 2000; Furian et al. 2007; Richard et al. 2007, 2009; Mc Guire et al. 2009; Ribas et al. 2010a,b), the reported studies did not distinguish whether neurons or other neural cells are vulnerable to MMA and PA effects. Since synaptosomes are nerve terminals that have been used to investigate the functional consequences of neurotoxins on neurons (Nicholls 2003), our main goal here was to determine whether these neural cells are involved in MMA- and PA-elicited oxidative stress.

Therefore, we employed synaptosomal preparations from cerebrum of young rats to study the *in vitro* effects of MMA and PA on important parameters of lipid and protein oxidative damage and on the production of reactive species. We also investigated the *in vivo* effects of intrastriatal administration of MMA and PA to young rats on the same parameters and also on the enzymatic antioxidant defenses in the hope to better characterize the deleterious influence of these organic acids on the striatum that is particularly affected in methylmalonic and propionic acidemias.

## **Methods**

### *Animals and reagents*

Thirty-day-old Wistar rats obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brazil, were used. The animals were housed six per cage with food (protein commercial chow; SUPRA, Porto Alegre, RS, Brazil) and water available *ad libitum* and were maintained on a normal 12 h light/dark cycle (lights on 7:00–19:00 h) in air conditioned constant temperature ( $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) colony room. This study was performed in accordance with the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication no. 80-23, revised 1996) and with the approval of Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). MMA, PA and NaCl solutions were prepared on the day of the experiments in the incubation medium used for each technique and the pH was adjusted to 7.4.

#### *Synaptosomal preparation from brain*

For the *in vitro* studies, synaptosomal preparations were used. The animals were sacrificed by decapitation without anesthesia and the brain without the medulla, pons, olfactory bulb and cerebellum was cut into small pieces using surgical scissors, extensively washed and then manually homogenized in 15 mL of buffer containing 0.32 M sucrose, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA and 20 mM HEPES, pH 7.2. The homogenate was centrifuged at 450 x *g* for 10 min at 4°C and the supernatant transferred to a new tube. Then, the supernatant was centrifuged at 20,000 x *g* for 10 min at 4°C, and the resulting crude synaptosomal pellet was resuspended in 2 mL of Locke's buffer (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM glucose and 5 mM HEPES, at pH 7.2) (Springer et al., 1998). Synaptosomal preparations were incubated for 60 min at 37°C with MMA or PA at concentrations ranging from 0.2 to 10 mM. Controls did not contain these organic acids in the incubation medium. In some experiments, MK-801 (glutamatergic receptor antagonist) and antioxidants were added to the medium at the beginning of incubation together with MMA, at the following final concentrations: 500 or 1000 µM MK-801, 10 or 20 µM trolox (soluble α-tocopherol; TRO), 1000 or 2000 µM melatonin (MEL), combination of superoxide dismutase (SOD) plus catalase (CAT) (100 or 250 mU / mL each), 100 µM L-carnitine (CAR) or 750 µM N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). Thereafter, aliquots were

taken for the measurement of thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) (lipid peroxidation), sulfhydryl oxidation and carbonyl formation (protein oxidation) and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (reactive species production). The doses of the antioxidants employed in this investigation was those reported by other investigators as efficient for their scavenging properties (Guajardo et al. 2006; Halliwell and Gutteridge 2007; Gavazza and Catalá 2009; Stasiak et al. 2010; Stuss et al. 2010; Sadowska-Woda et al. 2010).

*Administration of methylmalonic acid (MMA) or propionic acid (PA) and striatum preparation*

For these studies MMA or PA was injected bilaterally into the striatum. Male Wistar rats of 30 days of life were anesthetized with ketamine and xylazine (75 and 10 mg / kg ip, respectively). Two small holes were drilled in the skull for microinjection and 1  $\mu$ L of 8 M MMA, 8 M PA or 8 M NaCl (each solution prepared in water and pH was adjusted to 7.4 with NaOH) was slowly injected over 3 min into each striatum via needles connected by a polyethylene tube to a 10  $\mu$ L Hamilton syringe. The needle was left in place for another 1 min before being softly removed, so that the total procedure lasted 4 min. The coordinates for injection were as follows: 0.6 mm posterior to the bregma, 2.6 mm lateral to the midline and 4.5 mm ventral from dura (Paxinos and Watson 1986). The correct position of the needle was tested by previous injection of 0.5  $\mu$ L of a methylene blue solution (4 % in saline) and further histological analysis.

Thirty minutes after injection the rats were sacrificed by decapitation, the brain was removed and the striatum isolated. The striatum was homogenized in 1:10 (w/v) in 20 mM sodium phosphate buffer with 140 mM KCl, pH 7.4. The homogenate was then centrifuged at 750 x g for 10 min at 4°C and the supernatant collected. Thereafter, aliquots were separated and used to measure TBA-RS levels (lipid peroxidation), sulfhydryl oxidation (protein oxidation) and the activities of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD).

#### *Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)*

TBA-RS levels were measured according to the method described by Yagi (1998) with slight modifications. Briefly, 200 µL of 10% trichloroacetic acid and 300 µL of 0.67% TBA in 7.1% sodium sulfate were added to 100 µL of tissue supernatant (0.3 mg of protein) and incubated for 2 h in a boiling water bath. The mixture was allowed to cool on running tap water for 5 min. The resulting pink-stained complex was extracted with 400 µL of butanol. Fluorescence of the organic phase was read at 515 nm and 553 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane and subjected to the same treatment as supernatants. TBA-RS levels were calculated as nmol TBA-RS / mg protein.

#### *Sulfhydryl content*

Total sulfhydryl group content was assessed according to the method of LoPachin et al. (2004), which is based on the reduction of 5,5'-ditio-bis-2-

nitrobenzoic acid (DTNB) by thiol groups present in the sample, forming a yellow derivate (TNB). Sixty hundred and fifty microliters of PBS containing 1 mM EDTA, pH 7.4, and 100  $\mu$ L of sodium dodecyl sulfate 1 % were added to 250  $\mu$ L of sample (0.3 mg of protein) and rested for 5 min. Soon after, 30  $\mu$ L of DTNB were added and after an incubation of 5 min the absorption was read at 412 nm. The absorbance due to the amount of TNB is proportional to the amount of reduced thiol groups present in the sample. The results were expressed as nmol TNB / mg protein.

#### *Protein carbonyl content*

Protein carbonyl formation was measured spectrophotometrically according to Levine et al. (1994). Two hundred microliters of sample (0.3 mg of protein) were treated with 100  $\mu$ L of 50 mM TRIS buffer and 200  $\mu$ L of a solution of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) prepared in 2.5 N HCl or 2.5 N HCl (blank) and left in the dark at 37°C for 1 hour. Samples were then precipitated with 325  $\mu$ L of 20 % trichloroacetic acid and centrifuged for 10 min at 3000 x g. The pellet was then washed with a mixture of ethanol: ethyl acetate (1:1, V/V) and suspended in 700  $\mu$ L of 6 M guanidine prepared in 2.5 N HCl at 37°C for 5 min. The difference between the DNPH-treated and HCl-treated samples (blank) was used to calculate the carbonyl content determined at 365 nm. The results were calculated as nmol of carbonyl groups / mg of protein.

### *2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) oxidation*

The production of reactive species was determined according to the method of LeBel et al. (1992) using DCF-DA. DCF-DA prepared in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl, was incubated with 80  $\mu$ L of synaptosomal preparation (1 mg of protein) in the presence of MMA or PA during 1 h at 37°C. Intracellular esterases cleave the acetate group of DCF-DA, generating the reduced form DCFH, which is then rapidly oxidized to form the highly fluorescent product DCF in the presence of reactive species. Fluorescence was measured using wavelengths of 480 nm (excitation) and 535 nm (emission). The calibration curve was performed with standard DCF (0-10 mM) and the concentration of reactive species was expressed as pmol DCF / mg protein.

### *Glutathione peroxidase (GPx) activity*

GPx activity was measured according to Wendel (1981) using tert-butylhydroperoxide as substrate. The enzyme activity was determined by monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium containing 600  $\mu$ L of buffer (100 mM potassium phosphate containing 1 mM EDTA, pH 7.0), 10  $\mu$ L of 40 mM sodium azide, 15  $\mu$ L of 100 mM glutathione, 15  $\mu$ L of 10 U / mL glutathione reductase, 10  $\mu$ L of 10 mM NADPH and 10  $\mu$ L of sample (3  $\mu$ g of protein). One GPx unit (U) is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute. The specific activity was calculated as U / mg protein.



### *Catalase (CAT) activity*

CAT activity was assayed according to Aebi (1984) by measuring the absorbance decrease at 240 nm at room temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) in a reaction medium containing 20 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.1 % Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and the supernatants containing approximately 1  $\mu\text{g}$  of protein. CAT activity was calculated as U / mg protein, using the extinction coefficient of  $43.6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  for  $\text{H}_2\text{O}_2$ . One unit (U) of the enzyme is defined as 1  $\mu\text{mol}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumed per minute.

### *Superoxide Dismutase (SOD) activity*

SOD activity was assayed according to Marklund (1985) and is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide anion, which is the substrate for SOD. The inhibition of the autoxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD and, therefore, is proportional to the activity of the SOD present in homogenates. The reaction medium contained 50 mM Tris buffer / 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8.2, 80 U / mL catalase, 0.38 mM pyrogallol and approximately 1  $\mu\text{g}$  of protein and the absorbance was read at 420 nm. A calibration curve was performed with purified SOD as standard, in order to calculate the activity of SOD present in the samples. The results were reported as U / mg protein.

### *Protein content*

The protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951) or Bradford (1976) using bovine albumin as standard.

### *Statistical analysis*

Data were expressed as means  $\pm$  SD for absolute values. Assays were performed in duplicate or triplicate and the mean was used for statistical analysis. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post-hoc Duncan multiple range test when  $F$  was significant (*in vitro*) or Student  $t$  test for unpaired samples (*in vivo*). Only significant  $F$  and  $t$  values are displayed in the text. Differences between groups were rated significant at  $P < 0.05$ . All analyses were carried out in an IBM-compatible PC computer using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software.

## **Results**

### *MMA induces lipid peroxidation in brain synaptosomes and striatum of young rats*

We first observed that TBA-RS levels were significantly increased by MMA in synaptosomal preparations (up to 60 %) [ $F_{(4,25)} = 59.2$ ;  $P < 0.001$ ] in a concentration-dependent manner ( $\beta = 0.921$ ;  $P < 0.001$ ) (Figure 1A), whereas PA did not alter this parameter (results not shown). We also evaluated the effect of 3-nitropropionic acid (3NPA), a known irreversible inhibitor of complex II activity of

the respiratory chain on TBA-RS levels and found that, similarly to PA, this acid had no effect on this parameter (results not shown). We also found that the NMDA receptor antagonist MK-801 (500  $\mu$ M) [ $F_{(5,30)} = 25.6$ ;  $P < 0.001$ ] and the free radical scavengers trolox (soluble  $\alpha$ -tocopherol, 10  $\mu$ M TRO) [ $F_{(3,20)} = 44.8$ ;  $P < 0.001$ ] and melatonin (MEL, 1000  $\mu$ M) [ $F_{(3,20)} = 93.7$ ;  $P < 0.001$ ] attenuated the MMA-induced lipid peroxidation (Figure 1B, C and D), whereas the combination of SOD plus CAT (100 mU / mL each), L-carnitine (100  $\mu$ M) and L-NAME (750  $\mu$ M) did not change this effect (data not shown). However, when increasing the amounts of these antioxidants in the medium, we observed that 2000  $\mu$ M MEL and 1000  $\mu$ M MK-801 totally prevented and 20  $\mu$ M TRO only attenuated MMA-induced increase of TBA-RS levels [ $F_{(5,18)} = 10.2$ ;  $P < 0.001$ ], suggesting that the hydroxyl radical was mainly responsible for this effect. In addition, the combination of SOD plus CAT at 250 mU / mL each had no effect on the increased TBA-RS values (Figure 1E). Similarly, MMA intrastriatal administration provoked a significant increase in TBA-RS levels in striatum of young rats (43 %) [ $t_{(8)} = 3.88$ ;  $P < 0.01$ ] (Figure 2). Taken together, these data indicate that lipid oxidative damage is markedly induced by MMA *in vitro* in rat brain synaptosomes and *in vivo* in striatum probably via reactive species generation.

*MMA induces protein oxidative damage in brain synaptosomes and striatum of young rats*

The next step of the present study was to evaluate the effect of MMA and PA on protein oxidative damage by measuring sulfhydryl oxidation and carbonyl formation in the brain. Our results show that MMA caused an increase of carbonyl

formation (up to 99 %) in synaptosomal preparations when supplemented to the incubation medium [ $F_{(4,15)} = 4.58$ ;  $P < 0.05$ ] (Figure 3A). Furthermore, MMA moderately but significantly induced sulfhydryl oxidation (10 %) in striatum after intrastriatal administration [ $t_{(8)} = 3.82$ ;  $P < 0.01$ ] (Figure 3B). In contrast, sulfhydryl oxidation was not altered by the exposition of synaptosomal preparations to MMA, whereas PA did not alter these parameters *in vivo* or *in vitro* (data not shown). These results indicate that MMA provokes protein oxidative damage in brain synaptosomes and striatum from young rats.

#### *MMA induces reactive species in brain synaptosomes from young rats*

The *in vitro* effect of MMA and PA on DCF-DA oxidation was also investigated in synaptosomal preparations from brain of young rats. We verified that MMA strongly induced DCF-DA oxidation (up to 177 %) [ $F_{(4,25)} = 65.3$ ;  $P < 0.001$ ] (Figure 4), indicating that this organic acid induces an increase of reactive species formation. In contrast, PA had no effect on this parameter (results not shown).

#### *MMA intrastriatal administration decreases GPx activity in striatum of young rats*

Finally, we investigated the effect of MMA and PA intrastriatal administration on the activities of the antioxidant enzymes GPx, CAT and SOD (Table I). MMA significantly decreased the activity of GPx [ $t_{(7)} = 9.00$ ;  $P < 0.001$ ] (37 %), but did not affect SOD and CAT activities. In addition, PA did not alter any of these activities (data not shown).

## Discussion

In the present work we evaluated the effects of MMA and PA on lipid and protein oxidative damage and on the production of reactive species using synaptosomal preparations from brain of young rats in order to assess whether oxidative damage is elicited by these metabolites in neuronal cells. We also tested the effect of *in vivo* intrastriatal administration of MMA and PA on lipid and protein oxidative damage and on the activities of antioxidant enzymes because the striatum is mainly affected in methylmalonic and propionic acidemias, especially during metabolic crises when the concentrations of the accumulating organic acids dramatically increase. We sacrificed the animals 30 min after NaCl, MMA or PA injection in order to investigate short-lived effects. It is emphasized that, to our mind, this is the first work that employed synaptosomes to investigate neurotoxic properties of MMA and PA and, besides, determine whether these organic acids are able to alter the enzymatic antioxidant defenses in the striatum.

We first verified that MMA, but not PA and 3NPA, another inhibitor of complex II of the respiratory chain, significantly increased TBA-RS levels *in vitro* and *in vivo* in rat brain. These results indicate a selective oxidative effect of MMA, rather than a nonspecific action of acidic compounds. Considering that TBA-RS measurement reflects the amount of malondialdehyde formation, an end product of membrane fatty acid peroxidation (Halliwell and Gutteridge 2007), the increased values of this parameter elicited by MMA strongly indicate that this metabolite causes lipid peroxidation. We also observed that the lipid oxidative damage induced by MMA in brain synaptosomal preparations (*in vitro*) was partially

prevented by MEL (1000  $\mu$ M), TRO (10  $\mu$ M) and MK-801 (500  $\mu$ M), but not by L-carnitine (100  $\mu$ M), L-NAME (750  $\mu$ M) or the combination of SOD and CAT (100 mU / mL each). Furthermore, higher doses of MEL (2000  $\mu$ M) and MK-801 (1000  $\mu$ M) fully prevented, whereas TRO (20  $\mu$ M) attenuated and the combination of SOD plus CAT (250 mU / mL each) did not change MMA-elicited effects. Since TRO and MEL scavenge preferentially peroxy and hydroxyl radicals, it may be suggested that these reactive oxygen species and especially the hydroxyl radical that is efficiently scavenged by MEL, were at least partly involved in MMA-induced lipid oxidation. It should be emphasized that the antioxidants were added simultaneously with MMA to the incubation medium so that they were able to scavenge reactive species before they could react with cell constituents. On the other hand, it is unlikely that reactive nitrogen species were responsible for the induction of lipid peroxidation in synaptosomes used in the present investigation since the classical inhibitor of nitric oxide synthase L-NAME did not reduce the increase of TBA-RS levels provoked by MMA. Furthermore, the protective effects of the NMDA antagonist MK-801 support the involvement of these glutamate receptors in MMA effects, as previously observed (de Mello et al. 1996; Kölker et al. 2000; Brusque et al. 2001; Malfatti et al. 2007). MMA also provoked a moderate protein oxidative damage, as observed by the increase of carbonyl formation in synaptosomes elicited at a high concentration and by the mild enhancement of sulfhydryl oxidation after intrastriatal administration. In contrast, PA did not affect these parameters. Carbonyl group generation is currently used as a marker of free radical-mediated protein oxidation (Levine et al. 1994), being the amino acid residues Pro, Arg, Lys, and Thr of the side chain of proteins the most vulnerable to

oxidative attack (Dalle-Donne et al. 2003). On the other hand, since approximately two thirds of sulfhydryl groups are bound to proteins, whereas one third is a component of small molecules such as glutathione (Requejo et al. 2010), oxidation of cellular protein-bound sulfhydryl groups from specific cysteine residues also reflects oxidative damage that may potentially lead to protein inactivation (Aksenov and Markesbery 2001; Davies 2003).

We also found that MMA markedly increased DCF-DA oxidation, which is converted to DCF, mainly by hydroxyl radicals, hydrogen peroxide and peroxynitrite (LeBel et al. 1992; Ischiropoulos et al. 1999; Ohashi et al. 2002; Myhre et al. 2003; Bonini et al. 2006). These data, allied to the findings showing that peroxyl and hydroxyl scavengers attenuated MMA-elicited lipid peroxidation, reinforce the presumption that these reactive species were involved in MMA-induced oxidative effects. Interestingly, it was recently demonstrated increased levels of reactive species in fibroblasts from patients with methylmalonic acidemia (Richard et al. 2005, 2007, 2009), supporting our present *in vitro* and *in vivo* findings.

With regard to the antioxidant defense system, MMA *in vivo* administration provoked a selective decrease of GPx activity, without altering the activities of CAT and SOD. The reduced activity of GPx caused by MMA in striatum may result from decreased de novo synthesis or from inactivation of the enzyme protein due to a direct binding of MMA to vulnerable groups of the enzyme or indirectly through increased reactive species that attack essential sulfhydryl or other vulnerable groups of the enzyme (Singh et al. 2004; Jafari et al. 2007). On the other hand,

reduction of GPx activity may lead to a diminished capacity of the striatum to scavenge hydrogen peroxide and fatty acid hydroperoxides that can generate other forms of carbon-, nitrogen- and oxygen-centered radicals, such as hydroxyl radicals via the Fenton reaction (Halliwell and Gutteridge 2007). In this context, it should be emphasized that hydroxyl radicals readily initiate the process of lipid peroxidation, which may be related to the lipid oxidative damage induced by MMA.

Since oxidative stress results from an imbalance between the total antioxidant defenses and the reactive species generated in a tissue (Halliwell and Gutteridge 2007), our present data strongly indicate that MMA induces oxidative stress in brain of young rats. At this point, it should be emphasized that the brain has low cerebral antioxidant defenses compared with other tissues. Besides, the high oxygen consumption and high iron and lipid contents, especially polyunsaturated fatty acids (Halliwell and Gutteridge 2007), contribute to make the brain more vulnerable to increased reactive species generation.

Taken together the various observations that oxidative damage occurs in patients affected by methylmalonic acidemia (Treacy et al. 1996; Richard et al. 2005, 2007, 2009; Ribas et al. 2010a,b) and the animal experimental studies demonstrating that MMA induces oxidative stress in the brain (McLaughlin et al. 1998; Brusque et al. 2001; Okun et al. 2002; Figuera et al. 2003; Royes et al. 2005, 2006, 2007; Furian et al. 2007; Richard et al. 2005, 2007, 2009; Ribeiro et al. 2005, 2009), it is presumed that alterations of the biological oxidations in the brain may possibly represent one of the mechanisms by which MMA is neurotoxic. However, to our knowledge, no previous study investigated which neural cells were



involved in MMA oxidative effects. Our present work was the first to demonstrate that MMA action inducing oxidative damage occurs in nerve terminals (synaptosomal preparations) used as a model to study the effects of neurotoxins in neuronal cells (Nicholls 2003). A great advantage of the utilization of synaptosomes, that correspond to mini-cell in which mitochondria exist in a physiological milieu and supply ATP to the cytoplasm and plasma membrane, is that these preparations can be made from animals of any age, in contrast to the neonatal requirement for virtually all primary neuronal cell cultures. Therefore, we assume that MMA affects biological oxidations in the central nervous system by acting on neuronal cells.

In contrast, PA had no effect on all parameters examined *in vitro* and *in vivo*, strongly indicating that this organic acid does not elicit oxidative stress in neuronal cells and in the striatum. However, a previous report showing that PA provokes lipid peroxidation and reduces the nonenzymatic antioxidant defenses in rat cerebral cortex homogenates, implying that oxidative damage may occur in this cerebral region (Fontella et al. 2000). Furthermore, oxidative stress markers were found to be increased in plasma of patients affected by propionic acidemia, although it was not investigated which accumulating organic acids were related to these findings (Ribas et al. 2010a,b). Therefore, it is possible that different approaches and tissue specific effects may possibly explain these apparently conflicting results.

It is difficult to determine the pathophysiological relevance of our present data since to our knowledge MMA brain concentrations are not yet established in

methylmalonic acidemia. However, it should be noted significant effects on some parameters of oxidative stress occurred at concentrations as low as 0.2mM and 1mM, concentrations that are within the levels found in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) (3.0 mM) (Fenton et al. 2001) of patients affected by this disorder. Furthermore, it is feasible that even higher brain MMA concentrations may take place in stress situations, such as occurs during episodes of metabolic decompensation characterized by intense catabolism and proteolysis. Under these circumstances, the levels of the accumulating metabolites within neural cells may predominate over those found in plasma and CSF (Hoffmann et al. 1993). We should also consider that MMA may be directly produced in the brain, being thereafter trapped in neural cells (Kölker et al. 2006; Sauer et al. 2006, 2010). This is in line with the data showing that patients suffering liver transplantation do not present a decrease in CSF MMA levels and remain with neurological manifestations after this procedure, which is in accordance with the trapping hypothesis (van't Hoff et al. 1999; Chakrapani et al. 2002; Nyhan et al. 2002; Kölker and Okun 2005; Nagarajan et al. 2005; Kaplan et al. 2006; Kölker et al. 2006; Sauer et al. 2006, 2010). However, we should also emphasize that the protein oxidative damage induced by MMA was only moderate and occurred at high concentrations of MMA, which may not be physiologically important.

In conclusion, we report for the first time that MMA induces lipid and protein oxidative damage by indirectly increasing the generation of free radicals and other reactive species in brain synaptosomes. Similar findings and a reduction of the enzymatic antioxidant defenses were found in rat striatum after MMA intrastriatal

injection, a brain structure that is severely compromised in methylmalonic acidemia (Brismar and Ozand 1994; Chemelli et al. 2000; Harting et al. 2008). In case the present findings are confirmed in human *postmortem* brain from methylmalonic acidemic patients, the stimulation of highly reactive radical production by MMA in the CNS will potentially lead to deleterious consequences to the brain. Based on the present findings and on previous evidence suggesting that oxidative stress plays a role in this disease and that antioxidants prevent the oxidative damage induced by MMA (Fontella et al. 2000; Malfatti et al. 2003; Royes et al. 2006, 2007; Furian et al. 2007), it is presumed that this pathomechanism may be relevant to explain at least in part the brain dysfunction and abnormalities observed in this disorder, particularly during crises of metabolic decompensation in which the concentrations of MMA dramatically increase. Finally, it is conceivable that administration of antioxidants as adjuvant agents to the usual therapy of methylmalonic acidemia may be useful, especially during these episodes.

## **Acknowledgements**

This work was supported by grants from CNPq, PRONEX II, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS, FINEP research grant Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00 and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCT-EN).

## References

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105:121-126.
- Aksenov, M. Y., and Markesbery, W. R. (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 302:141-145.
- Bonini, M. G., Rota, C., Tomasi, A., Mason, R. P. (2006). The oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy? *Free Radic. Biol. Med.* 40:968-975.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brismar, J., and Ozand, P. T. (1994). CT and MR of the brain in disorders of the propionate and methylmalonate metabolism. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 15:1459-1473.
- Brusque, A. M., Mello, C. F., Buchanan, D. N., Terracciano, S. T., Rocha, M. P., Vargas, C. R., Wannmacher, C. M., Wajner, M. (1999). Effect of chemically induced propionic acidemia on neurobehavioral development rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64:529-34.
- Brusque, A. M., Rotta, L. N., Tavares, R. G., Emanuelli, T., Schwarzbold, C. V., Dutra-Filho, C. S., de Souza Wyse, A. T., Duval Wannmacher, C. M., Gomes de

- Souza, D. O., Wajner, M. (2001). Effects of methylmalonic and propionic acids on glutamate uptake by synaptosomes and synaptic vesicles and on glutamate release by synaptosomes from cerebral cortex of rats. *Brain Res.* 920:194-201.
- Brusque, A. M., Borba Rosa, R., Schuck, P. F., Dalcin, K. B., Ribeiro, C. A., Silva, C. G., Wannmacher, C. M., Dutra-Filho, C. S., Wyse, A. T., Briones, P., Wajner, M. (2002). Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem. Int.* 40:593-601.
- Chakrapani, A., Sivakumar, P., McKiernan, P. J., Leonard, J. V. (2002). Metabolic stroke in methylmalonic acidemia five years after liver transplantation. *J. Pediatr.* 140:261-263.
- Chandler, R. J., Zervas, P. M., Shanske, S., Sloan, J., Hoffmann, V., DiMauro, S., Venditti, C. P. (2009). Mitochondrial dysfunction in *mut* methylmalonic acidemia. *FASEB J.* 1252-1261.
- Chemelli, A. P., Schocke, M., Sperl, W., Trieb, T., Aichner, F., Felber, S. (2000). Magnetic resonance spectroscopy (MRS) in five patients with treated propionic acidemia. *J. Magn. Reson. Imaging* 11:596-600.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* 9:169-176.
- Davies, M. J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:761-770.

de Keyzer, Y., Valayannopoulos, V., Benoist, J. F., Batteux, F., Lacaille, F., Hubert, L., Chrétien, D., Chadeveau-Vekemans, B., Niaudet, P., Touati, G., Munnich, A., de Lonlay, P. (2009). Multiple OXPHOS deficiency in the liver, kidney, heart, and skeletal muscle of patients with methylmalonic aciduria and propionic aciduria. *Pediatr. Res.* 66:91-95.

de Mattos-Dutra, A., Meirelles, R., Bevilaqua da Rocha, B., Kommers, T., Wofchuk, S. T., Wajner, M., Pessoa-Pureur, R. (2000). Methylmalonic and propionic acids increase the *in vitro* incorporation of <sup>32</sup>P into cytoskeletal proteins from cerebral cortex of young rats through NMDA glutamate receptors. *Brain Res.* 856:111-118.

de Mello, C. F., Beghini, J., Jimenez-Bernal, R. E., Rubin, M. A., de Bastiani, J., da Costa, E. Jr., Wajner, M. (1996). Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. *Brain Res.* 721:120-125.

Deodato, F., Boenzi, S., Santorelli, F. M., Dionisi-Vici, C. (2006). Methylmalonic and propionic aciduria. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 142:104-112.

Fenton, W. A., Gravel, R. A., Rosenblatt, D. S. (2001). In Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Valle, A. D., Sly, W. S. (eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill Inc., New York, pp. 2165-2193.

Figuera, M. R., Bonini, J. S., de Oliveira, T. G., Frussa-Filho, R., Dutra-Filho, C. S., Rubin, M. A., Mello, C. F. (2003). GM1 ganglioside attenuates convulsions and

thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 35:465-473.

Fontella, F. U., Pulrolnik, V., Gassen, E., Wannmacher, C. M., Klein, A. B., Wajner, M., Dutra-Filho, C. S. (2000). Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport.* 11:541-544.

Furian, A. F., Figuera, M. R., Oliveira, M. S., Ferreira, A. P., Fiorenza, N. G., de Carvalho Myskiw, J., Petry, J. C., Coelho, R. C., Mello, C. F., Royes, L. F. (2007). Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. *Neurochem. Int.* 50:164-171.

Gavazza, M. and Catalá, A. (2009). Relative efficacies of alpha-tocopherol, N-acetyl-serotonin, and melatonin in reducing non-enzymatic lipid peroxidation of rat testicular microsomes and mitochondria. *Mol. Cell. Biochem.* 321(1-2): 37-43.

Guajardo, M.H., Terrasa, A.M., Catalá, A. (2006). Lipid-protein modifications during ascorbate-Fe<sup>2+</sup> peroxidation of photoreceptor membranes: protective effect of melatonin. *J. Pineal Res.* 41(3): 201-210.

Halliwell, B., and Gutteridge. J. M. C. (2007). Measurement of reactive species. In Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (eds). *Free radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, Oxford, pp. 268-340.



- Harting, I., Seitz, A., Geb, S., Zwickler, T., Porto, L., Lindner, M., Kölker, S., Höster, F. (2008). Looking beyond the basal ganglia: the spectrum of MRI changes in methylmalonic acidaemia. *J. Inherit. Metab. Dis.* 31:368-378.
- Hoffmann, G. F., Meler-Augenstein, W., Stockler, S., Surtees, R., Rating, D., Nyhan, W. L. (1993). Physiology and pathophysiology of organic acids on cerebrospinal fluid. *J. Inherit. Metab. Dis.* 16:648-669.
- Hörster, F., Garbade, S. F., Zwickler, T., Aydin, H. I., Bodamer, O. A., Burlina, A. B., Das, A. M., de Klerk, J. B. C., Dionisi-Vici, C., Geb, S., Gökçay, Guffon, N., Maier, E. M., Morava, E., Walter, J. H., Schwahn, B., Wijburg, F. A., Lindner, M., Grünewald, S., Baumgartner, M. R., Kölker, S. (2009). Prediction of outcome in isolated methylmalonic acidurias: combined use of clinical and biochemical parameters. *J. Inherit. Metab. Dis.* 32:630-639.
- Ischiropoulos, H., Gow, A., Thom, S. R., Kooy, N. W., Royall, J. A., Crow, J. P. (1999). Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. *Methods Enzymol.* 301:367-373.
- Jafari, M. (2007). Dose- and time-dependent effects of sulfur mustard on antioxidant system in liver and brain of rat. *Toxicology* 231:30-39.
- Kaplan, P., Ficicioglu, C., Mazur, A. T., Palmieri, M. J., Berry, G. T. (2006). Liver transplantation is not curative for methylmalonic acidopathy caused by methylmalonyl-CoA mutase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 88:322-326.

- Kölker, S., and Okunm J. G. (2005). Methylmalonic acid-an endogenous toxin? *Cell. Mol. Life Sci.* 62:621-624.
- Kölker, S., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Hoffmann, G. F. (2000). Methylmalonic acid induces excitotoxic neuronal damage *in vitro*. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23:355-358.
- Kölker, S., Sauer, S. W., Surtees, R. A., Leonard, J. V. (2006). The aetiology of neurological of organic acidaemias – a role for the blood-brain barrier. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29:701-704.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy, S. C. (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5:227-231.
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadman, E. R., Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233:346-357.
- LoPachin, R. M., Schwarcz, A. I., Gaughan, C. L., Mansukhani, S., Das, S. (2004). *In vivo* and *in vitro* effects of acrylamide on synaptosomal neurotransmitter uptake and release. *Neurotoxicology* 25:349-363.
- Lowry, O. H., and Rosebrough, N. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-75.

- Malfatti, C. R. M., Royes, L. F. F., Francescato, L., Sanabria, E. R. G., Rubin, M. A., Cavalheiro, E. A., Mello, C. F. (2003). Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. *Epilepsia* 44:761-767.
- Malfatti, C. R., Perry, M. L., Schweigert, I. D., Muller, A. P., Paqueti, L., Rigo, F. K., Figuera, M. R., Garrido-Sanabria, E. R., Mello, C. F. (2007). Convulsions induced by methylmalonic acid are associated with glutamic acid decarboxylase inhibition in rats: a role for GABA in the seizures presented by methylmalonic acidemic patients? *Neuroscience* 146:1879-1887.
- Manoli, I., and Venditti, C. P. (2010). Methylmalonic acidemia. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2005 Aug 16 [updated 2010 Sep 28].
- Marklund, S. L. (1985). Pyrogallol autoxidation. In *Handbook for oxygen radical research*, Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 243–247.
- Mc Guire, P. J., Parikh, A., Diaz, G. A. (2009). Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Mol. Genet. Metab.* 98:173-180.
- McLaughlin, B. A., Nelson, D., Silver, J. A., Erecinska, M., Chesselet, M. F. (1998). Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 86:279-290.
- Myhre, O., Andersen, J. M., Aarnes, H., Fonnum, F. (2003). Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.* 65:1575-1582.

- Nagarajan, S., Enns, G. M., Millan, M. T., Winter, S., Sarwal, M. M. (2005). Management of methylmalonic acidaemia by combined liver-kidney transplantation. *J. Inherit. Metab. Dis.* 28:517-524.
- Nicholls, D. G. (2003). Bioenergetics and transmitter release in the isolated nerve terminal. *Neurochem. Res.* 28:1433-1441.
- Nyhan, W. L., Gargus, J. J., Boyle, K., Selby, R., Koch, R. (2002). Progressive neurologic disability in methylmalonic acidemia despite transplantation of the liver. *Eur. J. Pediatr.* 161:377-379.
- Ohashi, T., Mizutani, A., Murakami, A., Kojo, S., Ishii, T., Taketani, S. (2002). Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species. *FEBS Lett.* 511:21-27.
- Okun, J. G., Hörster, F., Farkas, L. M., Feyh, P., Hinz, A., Sauer, S., Hoffmann, G. F., Unsicker, K., Mayatepek, E., Kölker, S. (2002). Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. *J. Biol. Chem.* 277:14674-14680.
- Paxinos, G., and Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pettenuzzo, L. F., Schuck, P. F., Fontella, F., Wannmacher, C. M., Wyse, A. T., Dutra-Filho, C. S., Netto, C. A., Wajner, M. (2002). Ascorbic acid prevents

cognitive deficits caused by chronic administration of propionic acid to rats in the water maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73:623-629.

Pettenuzzo, L. F., Ferreira, G. C., Schmidt, A. L., Dutra-Filho, C. S., Wyse, A. T., Wajner, M. (2006). Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complex activities in rat tissues. *Int. J. Dev. Neurosci.* 24:45-52.

Requejo, R., Hurd, T.R., Costa, N.J., Murphy, M.P. (2010). Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *FEBS J.* 277:1465-1480.

Ribas, G. S., Manfredini, V., de Mari, J. F., Wayhs, C. Y., Vanzin, C. S., Biancini, G. B., Sitta, A., Deon, M., Wajner, M., Vargas, C.R. (2010a). Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28:127-132.

Ribas, G. S., Manfredini, V., de Marco, M. G., Wayhs, C. Y., Vanzin, C. S., Biancini, G. B., Wajner, M., Vargas, C. R. (2010b). Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes *in vitro*. *Mutat. Res.* 702:123-128.

Ribeiro, M. C., de Avila, D. S., Schneider, C. Y., Hermes, F. S., Furian, A. F., Oliveira, M. S., Rubin, M. A., Lehmann, M., Krieglstein, J., Mello, C. F. (2005).

Alpha-tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res.* 66:185-194.

Ribeiro, L. R., Figuera, M. R., Oliveira, M. S., Furian, A. F., Rambo, L. M., Ferreira, A. P., Saraiva, A. L., Souza, M. A., Lima, F. D., Magni, D. V., Dezengrini, R., Flores, E. F., Butterfield, D. A., Ferreira, J., dos Santos, A. R., Mello, C. F., Royes, L. F. (2009). Methylmalonate-induced seizures are attenuated in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27:157-163.

Richard, E., Monteoliva, L., Juarez, S., Pérez, B., Desviat, L. R., Ugarte, M., Albar, J. P. (2005). Quantitative analysis of mitochondrial protein expression in methylmalonic acidemia by two-dimensional difference gel electrophoresis. *J. Proteome Res.* 5:1602-1610.

Richard, E., Alvarez-Barrientos, A., Pérez, B., Desviat, L. R., Ugarte, M. (2007). Methylmalonic acidemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway. *J. Pathol.* 213:453-461.

Richard, E., Jorge-Finnigan, A., Garcia-Villoria, J., Merinero, B., Desviat, L. R., Gort, L., Briones, P., Leal, F., Pérez-Cerdá, C., Ribes, A., Ugarte, M., Pérez, B., and the MMACHC Working Group (Aguirre, A., Andrés, M., Badía, J., Baldellou, A., Couce, M. L., García-Carzola, A., García-Silva, M. T., Lama, R., Lopez-Mendoza, S., Martínez-Pardo, M., Olivares, J. L., Parini, R., Parraga, D., Pedrón, C., Peña, L., Pineda, M., Pintos, G., Porta, R., Roselló P., Ruiz, A., Toro, M., Urbón, A., Vernet, A., Vilaseca, M. A., Yoldi, M. E.) (2009). Genetic

and cellular studies of oxidative stress in methylmalonic aciduria (MMA) cobalamin deficiency type C (cblC) with homocystinuria (MMACHC). *Hum. Mutat.* 30:1558-1566.

Rigo, F. K., Pasquetti, L., Malfatti, C. R., Fighera, M. R., Coelho, R. C., Petri, C. Z., Mello, C. F. (2006). Propionic acid induces convulsions and protein carbonylation in rats. *Neurosci. Lett.* 408:151-154.

Royes, L. F., Fighera, M. R., Furian, A. F., Oliveira, M. S., da Silva, L. G., Malfatti, C. R., Schneider, P. H., Braga, A. L., Wajner, M., Mello, C. F. (2003). Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience* 118:1079-1090.

Royes, L. F., Fighera, M. R., Furian, A. F., Oliveira, M. S., Myskiw, J. de C., Fiorenza, N. G., Frussa-Filho, R., Mello, C. F. (2005). Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by intrastriatal injection of methylmalonate. *Neurosci Lett* 376:116-120.

Royes, L. F., Fighera, M. R., Furian, A. F., Oliveira, M. S., Myskiw, J. de C., Fiorenza, N. G., Petry, J. C., Coelho, R. C., Mello, C. F. (2006). Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83:136-144.

Royes, L. F., Fighera, M. R., Furian, A. F., Oliveira, M. S., Fiorenza, N. G., Petry, J. C., Coelho, R. C., Mello, C. F. (2007). The role of nitric oxide on the convulsive

behavior and oxidative stress induced by methylmalonate: an electroencephalographic and neurochemical study. *Epilepsy Res.* 73:228-237.

Sadowska-Woda, I., Wójcik, N., Karowicz-Bilińska, A., Bieszczad-Bedrejczuk, E. (2010). Effect of selected antioxidants in beta-cyfluthrin-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. *Toxicol. In Vitro* 24(3): 879-884.

Sauer, S. W., Okun, J. G., Fricker, G., Mahringer, A., Müller, I., Crnic, L. R., Mühlhausen, C., Hoffmann, G. F., Höster, F., Goodman, S. I., Harding, C. O., Koeller, D. M., Kölker, S. (2006). Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Neurochem.* 97:899-910.

Sauer, S. W., Opp, S., Mahringer, A., Kaminski, M. M., Thiel, C., Okun, J. G., Fricker, G., Morath, M. A., Kölker, S. (2010). Glutaric aciduria type I and methylmalonic aciduria: simulation of cerebral import models of the blood-brain barrier and the choroid plexus. *Biochim. Biophys. Acta* 1802:552-560.

Shevell, M. I., Matiaszuk, N., Ledley, F. D., Rosenblatt, D. S. (1993). Varying neurological phenotypes among *mut<sup>0</sup>* and *muf* patients with methylmalonyl-CoA mutase deficiency. *Am. J. Med. Genet.* 45:619-624.

Singh, P., Jain, A., Kaur, G. (2004). Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol. Cell. Biochem.* 260(1-2):153-159.

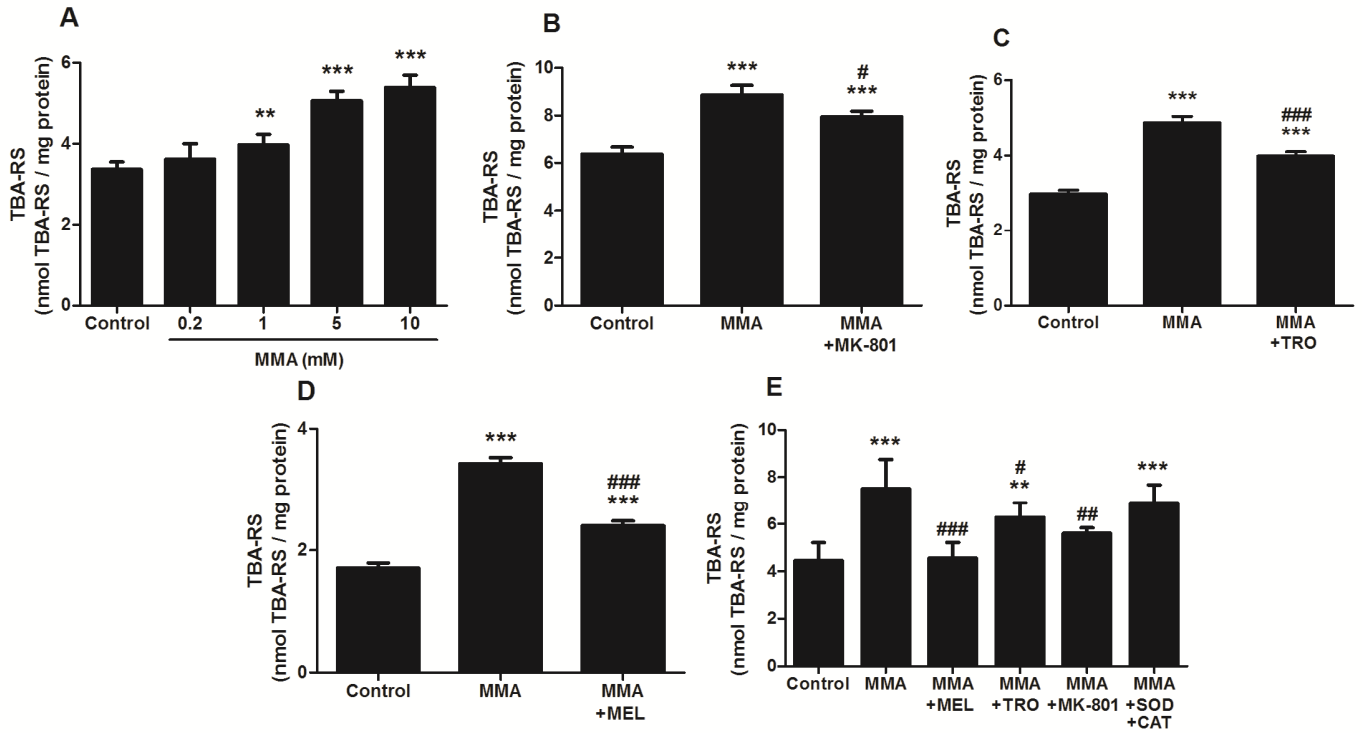


- Springer, J. E., Azbill, R. D., Carlson, S. L. (1998). A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 2:259-263.
- Stasiak, M., Zasada, K., Lewinski, A., Karbownik-Lewinska, M. (2010). Melatonin restores the basal level of lipid peroxidation in rat tissues exposed to potassium bromate in vitro. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 31(3):363-9.
- Stellmer, F., Keyser, B., Burckhardt, B. C., Koepsell, H., Streichert, T., Glatzel, M., Jabs, S., Thiem, J., Herdering, W., Koeller, D. M., Goodman, S. I., Lukacs, Z., Ullrich, K., Burckhardt, G., Braulke, T., Mühlhausen, C. (2007). 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3. *J. Mol. Med.* 85:763-770.
- Stuss, M., Wiktorska, J.A., Sewerynek, E. (2010). N-acetylserotonin reduces lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro more effectively than melatonin. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 31(4):489-496.
- Surtees, R. A. H., Matthews, E. E., Leonard J. V. (1992). Neurologic outcome of propionic acidemia. *Pediatr. Neurol.* 8:333-337.
- Treacy, E., Arbour, L., Chessex, P., Graham, G., Kasprzak, L., Casey, K., Bell, L., Mamer, O., Scriver, C. R. (1996). Glutathione deficiency as a complication of methylmalonic acidemia: response to high doses of ascorbate. *J. Pediatr.* 129:445-448.

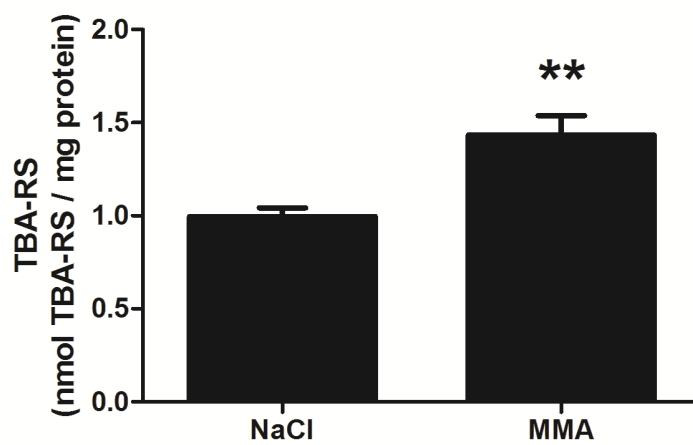
- Trindade, V. M., Brusque, A. M., Raasch, J. R., Pettenuzzo, L. F., Rocha, H. P., Wannmacher, C. M., Wajner, M. (2002). Ganglioside alterations in the central nervous system of rats chemically injected with methylmalonic and propionic acids. *Metab. Brain Dis.* 17:93-102.
- van't Hoff, W., McKiernan, P. J., Surtees, R. A., Leonard, J. V. (1999). Liver transplantation for methylmalonic acidaemia. *Eur. J. Pediatr.* 2:S70-S74.
- Wajner, M., and Coelho, J. C. (1997). Neurological dysfunction in methylmalonic acidaemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20:761-768.
- Wendel, A. (1981). Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77:325-332.
- Wolf, B., Hsia, Y. E., Sweetman, L., Gravel, R., Harris, D. J., Nyhan, W. L. (1981). Propionic acidemia: a clinical update. *J. Pediatr.* 99:835-846.
- Wyse, A. T., Brusque, A. M., Silva, C. G., Streck, E. L., Wajner, M., Wannmacher, C. M. (1998). Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *Neuroreport* 9:1719-1721.
- Wyse, A. T., Streck, E. L., Barros, S. V., Brusque, A. M., Zugno, A. I., Wajner, M. (2000). Methylmalonate administration decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11:2331-2334.
- Yagi, K. (1998). Simple procedure for especific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol. Biol.* 108:107-110.

## Figures

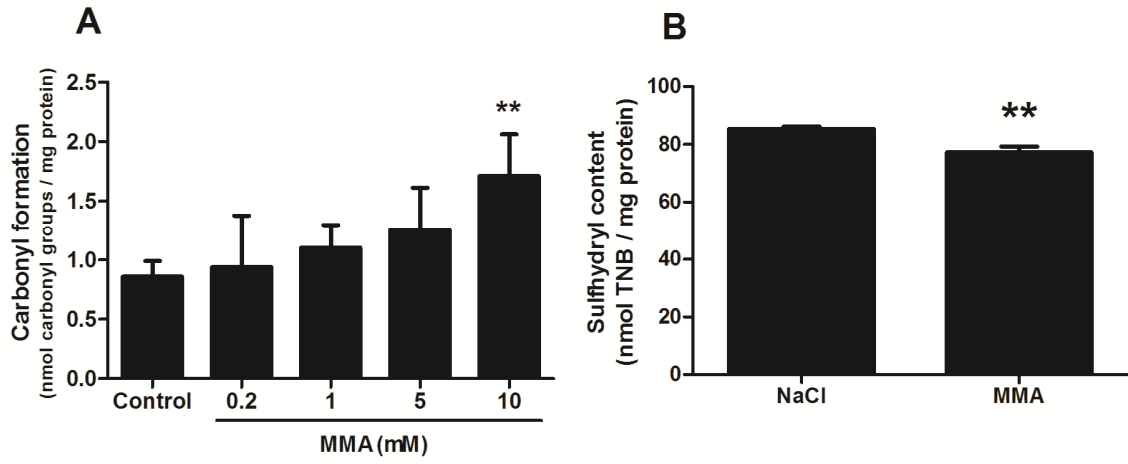
### Figure 1



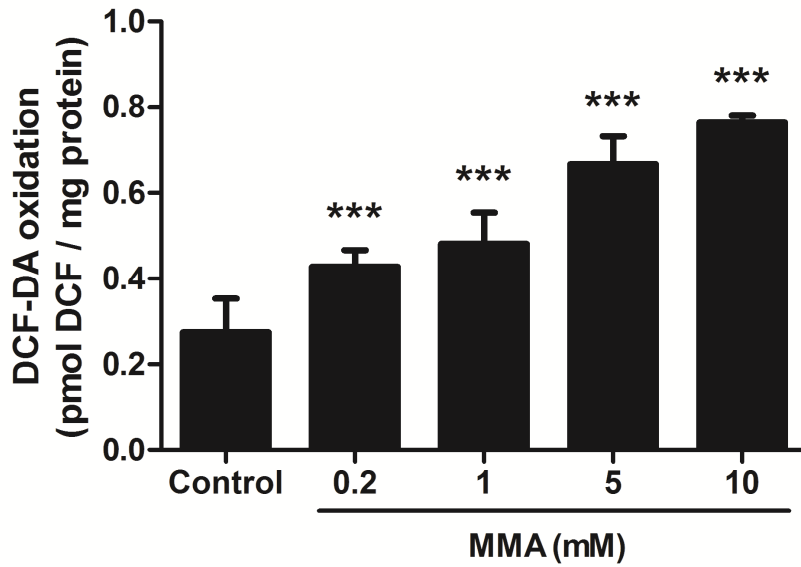
### Figure 2



**Figure 3**



**Figure 4**



## Tables

**Table I** - *In vivo* effect of intrastriatal administration of methylmalonic acid (MMA, 8  $\mu$ mol) on the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) in rat striatum.

Activities	NaCl	MMA
SOD	7.30 $\pm$ 0.51	8.25 $\pm$ 1.26
CAT	4.47 $\pm$ 0.72	3.96 $\pm$ 0.90
GPx	10.7 $\pm$ 0.54	6.68 $\pm$ 0.80 ***

Data are expressed as mean  $\pm$  SD for five to six independent experiments (animals) performed in triplicate. One SOD unit is defined as 50% inhibition of pyrogallol autoxidation; one CAT unit is defined as one  $\mu$ mol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed per minute; one GPx unit is defined as one  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute. Values are expressed as U/mg protein. \*\*\*  $P < 0.001$ , compared to NaCl (Student *t* test).

## Legends to figures

**Figure 1** – *In vitro* effect of methylmalonic acid (MMA) on thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) in brain synaptosomes. Synaptosomes were incubated during 1 h in the presence of MMA (A). In some experiments synaptosomes were co-incubated for 1 h with 10 mM MMA and either MK-801 (500 $\mu$ M, B),  $\alpha$ -tocopherol (TRO, 10  $\mu$ M, C) or melatonin (MEL, 1000  $\mu$ M, D). Higher concentrations of MK-801 (1000  $\mu$ M), MEL (2000  $\mu$ M), TRO (20  $\mu$ M), superoxide dismutase plus catalase (SOD+CAT, 250 mU/mL each) were also tested (Figure 1E). Controls did not contain MMA in the incubation medium, but rather the buffer used in the technique (20 mM sodium phosphate buffer with 140 mM KCl, pH 7.4). Values are means  $\pm$  standard deviation of six independent experiments (animals) performed in triplicate. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , compared to control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  compared to MMA (Duncan multiple range test).

**Figure 2** – *In vivo* effect of intrastriatal administration of methylmalonic acid (MMA) (8  $\mu$ mol) on thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) in rat striatum. Controls received intrastriatal administration of NaCl (8  $\mu$ mol). Values are means  $\pm$  standard deviation of five independent experiments (animals) performed in triplicate. \*\*  $P < 0.01$ , compared to control (Student t test).

**Figure 3** – Effects of methylmalonic acid (MMA) on carbonyl formation (A) and sulfhydryl content (B). Carbonyl formation was measured after exposing synaptosomal preparations to various concentrations of MMA (A), whereas

sulfhydryl content was measured after intrastriatal administration of MMA (8  $\mu$ mol) (B). In the in vitro experiments controls did not contain MMA in the incubation medium, but rather the buffer used in the technique (20 mM sodium phosphate buffer with 140 mM KCl, pH 7.4), whereas the controls in vivo received intrastriatal administration of NaCl (8  $\mu$ mol). Values are means  $\pm$  standard deviation of five to six independent experiments (animals) performed in triplicate. \*\*  $P < 0.01$ , compared to control (Duncan multiple range test and Student t test).

**Figure 4** – In vitro effect of methylmalonic acid (MMA) on 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) oxidation in brain synaptosomes. Controls did not contain MMA in the incubation medium, but rather the buffer used in the technique (20 mM sodium phosphate buffer with 140 mM KCl, pH 7.4). Values are means  $\pm$  standard deviation of six independent experiments (animals) performed in triplicate. \*\*\*  $P < 0.001$ , compared to control (Duncan multiple range test).

## **PARTE III**

# **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**



### III.1. DISCUSSÃO

As acidúrias metilmalônica e propiônica são doenças genéticas relativamente comuns entre o grupo das acidúrias orgânicas. Pacientes portadores desses distúrbios apresentam predominantemente manifestações neurológicas e acúmulo tecidual de MMA e PA, respectivamente (FENTON *et al.*, 2001; DEODATO *et al.*, 2006). Dentre os achados neuropatológicos, foram observadas anormalidades no globo pálido, no tálamo e no núcleo subtalâmico, bem como atrofia cerebral (cortical) e atraso de mielinização (BRISMAR e OZAND, 1994; FENTON *et al.*, 2001; HARTING *et al.*, 2008).

Apesar de os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no dano cerebral encontrado nas acidúrias metilmalônica e propiônica não estarem bem estabelecidos, estudos demonstraram que o acúmulo de MMA e PA causa disfunção mitocondrial *in vivo* e *in vitro* em cérebro de animais e em tecidos de pacientes afetados pelas acidúrias metilmalônica e propiônica (DUTRA *et al.*, 1993; SCHWAB *et al.*, 2006; MIRANDOLA *et al.*, 2008; PETTENUZZO *et al.*, 2006), bem como excitotoxicidade (DE MELLO *et al.*, 1996; BRUSQUE *et al.*, 2001; OKUN *et al.*, 2002; MALFATTI *et al.*, 2007) e estresse oxidativo (TREACY *et al.*, 1996; FONTELLA *et al.*, 2000; PETTENUZZO *et al.*, 2002; FIGHERA *et al.*, 2003; RICHARD *et al.*, 2006, 2007 e 2009; RIGO *et al.*, 2006; FURIAN *et al.*, 2007; CHANDLER *et al.*, 2009; RIBAS *et al.*, 2010a,b). No entanto, não encontramos na literatura estudos sobre o tipo de célula neural (neurônios, células gliais, etc) vulnerável aos efeitos deletérios do MMA e PA.

Esse é o primeiro relato sobre a avaliação dos efeitos *in vitro* do MMA e do PA sobre parâmetros de estresse oxidativo em preparações sinaptossomais de cérebro total. Assim, o presente estudo teve o objetivo de verificar o envolvimento de células neuronais na patogenia das acidúrias metilmalônica e propiônica, já que sinaptossomas são estruturas que correspondem a terminais nervosos, sendo essas preparações amplamente utilizadas para investigar os mecanismos de ação de neurotoxinas em neurônios (NICHOLLS, 2003; ELINOS-CALDERÓN *et al.*, 2009 e 2010). Foram analisados parâmetros de peroxidação lipídica (níveis de

TBA-RS), dano oxidativo protéico (formação de carbonilas) e produção de espécies reativas (oxidação do DCF-DA) em sinaptossomas expostos ao MMA ou PA (estudos *in vitro*). Em um segundo momento, os mesmos parâmetros foram avaliados *ex vivo* 30 min após uma única injeção intraestriatal de MMA ou PA, pois o estriado é predominantemente afetado nestas doenças, principalmente durante crises de descompensação metabólica quando as concentrações dos metabólitos acumulados aumentam acentuadamente. Nos experimentos *in vivo*, também foram avaliadas as atividades de enzimas antioxidantes.

Verificamos inicialmente um aumento significativo nos níveis de TBA-RS provocado pelo MMA, nas concentrações de 1, 5 e 10 mM, em sinaptossomas de ratos jovens. A medida de TBA-RS reflete a quantidade de malondialdeído (MDA) formado, um produto da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados de lipídios complexos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O MDA é altamente tóxico, já que reage com proteínas e bases do DNA, causando alterações nos resíduos de aminoácidos e provocando mutações (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Portanto, os níveis aumentados desse parâmetro provocados pelo MMA indicam que este ácido orgânico induz peroxidação lipídica *in vitro* em sinaptossomas. Observamos ainda que a peroxidação lipídica causada pelo MMA foi atenuada pelos antioxidantes trolox (TRO) e melatonina (MEL) e pelo MK-801, indicando o envolvimento dos radicais hidroxila e peroxila neste efeito, bem como dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Esse achado está de acordo com estudos anteriores que demonstram que o MMA induz excitotoxicidade em cérebro de ratos (DE MELLO *et al.*, 1996; KÖLKER *et al.*, 2000; BRUSQUE *et al.*, 2001; MALFATTI *et al.*, 2007). Contudo, esse efeito não foi prevenido por L-carnitina, N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) ou pela combinação das enzimas antioxidantes SOD e CAT. A administração intraestriatal *in vivo* de MMA também induziu peroxidação lipídica em estriado de ratos, reforçando nossos achados *in vitro*. Por outro lado, o PA não alterou os níveis de TBA-RS *in vitro* e *in vivo*.

A seguir investigamos os efeitos do MMA e PA sobre a oxidação do DCF-DA em sinaptossomas de cérebro total de ratos jovens. Observamos que o MMA aumentou significativamente a oxidação do DCF-DA, que é fundamentalmente

causada por espécies reativas. O PA não foi capaz de alterar esse parâmetro. Portanto, esses resultados, aliado ao fato de que os antioxidantes MEL e TRO preveniram a lipoperoxidação causada pelo MMA, reforçam o envolvimento de espécies reativas, especialmente de radicais peroxila e hidroxila, no dano oxidativo lipídico causado pelo MMA.

Além disso, o MMA, mas não o PA, induziu dano oxidativo protéico, determinado por um aumento na formação de carbonilas *in vitro* em sinaptossomas e por uma diminuição no conteúdo de grupamentos sulfidrilas (indica oxidação de sulfidrilas) *in vivo* em estriado de ratos. Grupos carbonilas (aldeídos e cetonas) são produzidos principalmente por oxidação de proteínas, por clivagem oxidativa ou então por reações com açúcares (DALLE-DONE *et al.*, 2003). Já com relação a grupamentos sulfidrilas, é importante salientar que cerca de 60-70 % desses grupos são ligados a proteínas, aos passo que 30-40% fazem parte de moléculas menores, tais como a glutatona (REQUEJO *et al.*, 2010), indicando que a diminuição no conteúdo desses grupos causada pelo MMA representa predominantemente dano oxidativo protéico. Embora o mecanismo exato pelo qual o MMA causa dano a proteínas ainda seja desconhecido, é concebível que o MMA ou a geração de espécies reativas causadas pelo mesmo possa interagir com grupos protéicos, finalmente levando à oxidação.

Observamos também que a administração intraestriatal de MMA diminuiu significativamente e seletivamente a atividade da GPx, sem alterar as atividades da SOD e da CAT. Esse achado está de acordo com o fato de que a combinação de SOD e CAT não previne a indução de peroxidação lipídica causada pelo MMA *in vitro* em sinaptossomas. Já a inibição da atividade da GPx causada pelo metabólito pode ser devido à inativação ou inibição da enzima pelo aumento na produção de espécies reativas causado pelo MMA, provocando uma modificação sítio-específica em resíduos de aminoácido da enzima principalmente da cisteína (SINGH *et al.*, 2004). Além disso, esses resultados indicam uma diminuição na capacidade do estriado em sequestrar peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos, os quais podem gerar outras formas de radicais, tais como radicais hidroxila através da reação de Fenton (SINGH *et al.*, 2004; HALLIWELL e

GUTTERIDGE, 2007). Nesse contexto, deve-se salientar que os radicais hidroxila prontamente iniciam o processo de peroxidação lipídica. Já a administração de PA não alterou as atividades das enzimas antioxidantes estudadas.

Tais resultados em seu conjunto mostram que o MMA induz oxidação lipídica e protéica, causa aumento na produção de espécies reativas e também diminuição de uma importante atividade enzimática antioxidante (GPx), sugerindo que este metabólito induz estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo* em cérebro de ratos jovens. Uma vez que o estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes totais e as espécies reativas geradas em um tecido, nossos resultados sugerem que o MMA induz estresse oxidativo em cérebro, uma condição deletéria à célula (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Neste ponto, deve ser enfatizado que o cérebro possui poucas defesas antioxidantes quando comparado com outros tecidos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1996), o que faz com que este tecido seja mais vulnerável ao aumento da produção de espécies reativas. De fato, o estresse oxidativo tem sido implicado na fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas comuns, tais como as doenças de Parkinson e de Alzheimer, bem como em epilepsia e na desmielinização (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1996; PEREZ-SEVERIANO *et al.*, 2000; BOGDANOV *et al.*, 2001; KARELSON *et al.*, 2001; MÉNDEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2001; BEHL e MOOSMANN, 2002a,b; STOY *et al.*, 2005; BERG e YODIM, 2006; MANCUSO *et al.*, 2006).

Já o PA não alterou nenhum dos parâmetros testados *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que esse metabólito não induz dano oxidativo em células neuronais e em estriado nas condições empregadas no presente trabalho. Contudo, Fontela e colaboradores (2000) demonstraram que o PA induz estresse oxidativo *in vitro* em homogenizado de córtex cerebral de ratos. Dessa forma, diferenças na metodologia utilizada e na estrutura cerebral estudada poderiam explicar os resultados aparentemente divergentes. Além disso, marcadores de estresse oxidativo foram verificados em plasma de pacientes portadores da acidúria propiônica, mas esses achados não apresentaram correlação com o acúmulo de metabólitos (RIBAS *et al.*, 2010a,b). Entretanto, não podemos excluir que outros

metabólitos derivados do PA possam estar envolvidos nas alterações encontradas no plasma desses pacientes.

A maioria dos efeitos causados pelo MMA foram alcançados em concentrações similares às encontradas em líquido e plasma de pacientes portadores de acidúria metilmalônica (FENTON *et al.*, 2001; MANOLI e VENDITTI, 2010). Além disso, é possível que níveis ainda maiores de MMA ocorram durante crises de descompensação metabólica. Também devemos considerar que estudos prévios sugeriram que o MMA possa ser produzido diretamente nas células neurais, não possuindo transportador para o seu efluxo e, portanto, é provável que esse ácido se acumule nessas células (KÖLKER *et al.*, 2006a,b; SAUER *et al.*, 2006 e 2010). Dessa forma, os efeitos pró-oxidantes do MMA demonstrados nesse estudo parecem ter relevância patológica.

Concluindo, relatamos pela primeira vez que o MMA induz dano oxidativo em sinaptossomas, indicando o envolvimento de neurônios na toxicidade provocada pelo MMA. Outro achado importante do presente estudo foi o fato de que o MMA induz dano oxidativo no estriado, uma estrutura cerebral altamente vulnerável nos pacientes acometidos pela acidúria metilmalônica. Por outro lado, nossos resultados devem ser interpretados com cautela, sendo necessária uma investigação mais completa dos efeitos do MMA e do PA e também de seus metabólitos derivados, bem como o estudo de outros parâmetros. O entendimento do possível envolvimento de espécies reativas no dano neurológico característico da acidúria metilmalônica pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a prevenção e tratamento dos pacientes afetados pela mesma, tais como o uso de antioxidantes, que foram capazes de prevenir o dano oxidativo lipídico em nosso presente trabalho.

### III.2. CONCLUSÕES

1. O MMA induziu peroxidação lipídica, refletida pelo aumento dos níveis de TBA-RS, em preparações sinaptossomais e em estriado de ratos quando injetado intraestriatalmente.
2. A indução de lipoperoxidação pelo MMA em sinaptossomas foi atenuada por MK-801, MEL e TRO, indicando o envolvimento de receptores glutamatérgicos e a ação de radicais hidroxila e peroxila neste efeito
3. O MMA induziu dano oxidativo protéico, demonstrado pelo aumento na formação de carbonilas em sinaptossomas e pela diminuição do conteúdo de sulfidrilas em estriado de ratos quando injetado estriatalmente.
4. O MMA aumentou a oxidação da DCF-DA em sinaptossomas, indicando que este ácido orgânico induz a formação de espécies reativas.
5. A administração intraestriatal de MMA diminuiu a atividade da importante enzima antioxidante GPx em estriado de ratos. Contudo, as atividades da CAT e da SOD não foram alteradas pelo metabólito.
6. O PA não alterou *in vitro* e *in vivo* os parâmetros avaliados.
7. Tais resultados indicam uma ação neurotóxica seletiva do MMA, provocando dano oxidativo e reduzindo as defesas antioxidantes enzimáticas em cérebro de ratos jovens, particularmente no estriado e em células neuronais.

### III.3. PERSPECTIVAS

1. Estudar o efeito dos ácidos MMA, PA, 2-metilcítrico e 3-hidroxiopropiônico sobre parâmetros de estresse oxidativo em células neuronais e gliais cultivadas;
2. Estudar o efeito MMA, PA, 2-metilcítrico e 3-hidroxiopropiônico sobre a viabilidade de células neuronais e gliais cultivadas;
3. Estudar as vias de sinalização responsáveis pelo dano oxidativo provocado pela injeção intraestriatal do MMA, bem como em células neurais cultivadas;
4. Estudar o efeito de um processo inflamatório (injeção de LPS) sobre a indução de estresse oxidativo provocado pelo MMA *in vivo* (injeção intraestriatal) e em culturas de células neurais;
5. Investigar a ação de compostos neuroprotetores sobre as alterações bioquímicas e de viabilidade provocadas pelo MMA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albin RL e Greenamyre JT, 1992. Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology*, 42:733-738.

Bast A. Oxidative stress and calcium homeostasis. In: Halliwell B, Aruoma OI, eds. *DNA and free radicals*. Chichester: Ellis Horwood 1993; 95-108.

Behl C e Moosmann B, 2002a. Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med*, 33:182-191.

Behl C e Moosmann B, 2002b. Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *J Biol Chem* 383:521-536.

Berg D e Youdim MB, 2006. Role of iron in neurodegenerative disorders. *Top Magn Reson Imaging* 17:5-17.

Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M, 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65:1865-1874.

Bogdanov MB, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante RJ, Beal MF, 2001. Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 79:1246-1249.

Bonafe L, Troxler H, Kuster T, Heizmann CW, Chamoles NA, Burlina AB, Blau N, 2000. Evaluation of urinary acylglycines by electrospray tandem mass



spectrometry in mitochondrial energy metabolism defects and organic acidurias.

Mol Gen Metab 69:302-311.

Boveris A e Chance B, 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.

Biochem J 134:707-716.

Brismar J e Ozand PT, 1994. CT and MR of the brain in disorders of the propionate and methylmalonate metabolism. AJNR Am J Neuroradiol, 15:1459-1473.

Brusque AM, Mello CF, Buchanan DN, Terracciano ST, Rocha MP, Vargas CR, Wannmacher CM, Wajner M, 1999. Effect of chemically induced propionic acidemia on neurobehavioral development rats. Pharmacol Biochem Behav, 64:529-34.

Brusque AM, Rotta LN, Tavares RG, Emanuelli T, Schwarzbald CV, Dutra-Filho CS, de Souza Wyse AT, Duval Wannmacher CM, Gomes de Souza DO, Wajner M, 2001. Effects of methylmalonic and propionic acids on glutamate uptake by synaptosomes and synaptic vesicles and on glutamate release by synaptosomes from cerebral cortex of rats. Brain Res, 920:194-201.

Brusque AM, Borba Rosa R, Schuck PF, Dalcin KB, Ribeiro CA, Silva CG, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Briones P, Wajner M, 2002. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. Neurochem Int 40:593-601.

- Burlina AP, Manara R, Calderone M, Catuogno S, Burlina AB, 2003. Diffusion-weighted imaging in the assessment of neurological damage in patients with methylmalonic aciduria. *J Inher Metab Dis*, 26:417-422.
- Burton BK, 1987. Inborn Errors of Metabolism: The clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics* 79, 359-369.
- Cathelineau L, Petit FP, Coude FX, Kamoun PP, 1979. Effect of propionate and pyruvate on citrulline synthesis and ATP content in rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 90:327-332.
- Chae HZ, Kang SW, Rhee SG, 1999. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol* 300:219-226.
- Chance B, Sies H, Boveris A, 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605.
- Chandler RJ, Zerfas PM, Shanske S, Sloan J, Hoffmann V, DiMauro S, Venditti CP, 2009. Mitochondrial dysfunction in *mut* methylmalonic acidemia. *FASEB J*, 1252-1261.
- Cheema-Dhadli S, Leznoff CC, Halperin ML, 1975. Effect of 2-methylcitrate on citrate metabolism: implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic aciduria. *Pediatr Res* 9:905-908.

- Choi JH, Cho YM, Suh KS, Yoon HR, Kim GH, Kim SS, Ko JM, Lee JH, Park YS, Yoo HW, 2008. Short-term efficacy of enzyme replacement therapy in Korean patients with Fabry disease. *J Korean Med Sci* 23, 243-250.
- Coude FX, Sweetman L, Nyhan WL, 1979. Inhibition by propionyl CoA of *N*-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. *J Clin Invest*, 64:1544-1551.
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A, 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 9:169-176.
- de Keyser Y, Valayannopoulos V, Benoist JF, Batteux F, Lacaille F, Hubert L, Chrétien D, Chadeffaux-Vekemans B, Niaudet P, Touati G, Munnich A, de Lonlay P, 2009. Multiple OXPHOS deficiency in the liver, kidney, heart, and skeletal muscle of patients with methylmalonic aciduria and propionic aciduria. *Pediatr Res*, 66:91-95.
- de Mello CF, Begnini J, Jimenez-Bernal RE, Rubin MA, de Bastiani J, da Costa E Jr., Wajner M, 1996. Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. *Brain Res* 721:120-125.
- Delanty N e Dichter MA, 1998. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand* 98:145-153.
- Deodato F, Dionisi-Vici C, Bartuli A, Rizzo C, Goffredo B, Sabetta G, Abeni D, 2003. Weight loss at admission may distinguish newborns with organic aciduria vs. urea cycle defects. *J Inherit Metab Dis*, 26:37.

Deodato F, Boenzi S, Santorelli FM, Dionisi-Vici C, 2006. Methylmalonic and propionic aciduria. *Am J med Genet Part C Semin Med Genet* 142:104-112.

Draper HH e Hadley M, 1990. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica* 20:901-907.

Duprat F, Guillrmare E, Romey G, Fink M, Lesage F, Lazdunski M, Honore E, 1995. Susceptibility of cloned K<sup>+</sup> channels to reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11796-11800.

Dutra JC, Dutra-Filho CS, Cardozo SE, Wannmacher CM, Sarkis JJ, Wajner M, 1993. Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. *J Inherit Metab Dis*, 16:147-153.

Elinos-Calderón D, Robledo-Arratia Y, Pérez-De La Cruz V, Pedraza-Chaverrí J, Ali SF, Santamaría A, 2009. Early nerve ending rescue from oxidative damage and energy failure by L-carnitine as post-treatment in two neurotoxic models in rat: recovery of antioxidant and reductive capacities. *Exp Brain Res* 197:287-296.

Elinos-Calderón D, Robledo-Arratia Y, Pérez-De La Cruz V, Maldonado PD, Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A, 2010. Antioxidant strategy to rescue synaptosomes from oxidative damage and energy failure in neurotoxic models in rats: protective role of S-allylcysteine. *J Neural Transm*, 117:35-44.

- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H, 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81-128.
- Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS, 2001. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver CR, Beaudet AL, Valle AD, Sly WS, eds.) pp. 2165-2193, McGraw-Hill Inc., New York.
- Ferreira ALA e Matsubara LS, 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 43:61-68.
- Figuera MR, Queiroz CM, Stracke MP, Brauer MC, González-Rodríguez LL, Frussa-Filho R, Wajner M, de Mello CF, 1999. Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. *Neuroreport* 13:2039-2043.
- Figuera MR, Bonini JS, de Oliveira TG, Frussa-Filho R, Dutra-Filho CS, Rubin MA, Mello CF, 2003. GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intraestriatal injection of methylmalonic acid. *Int J Biochem Cell Biol* 35:465-473.
- Fontella FU, Pulrolnik V, gassen E, Wannmacher CM, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS, 2000. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *NeuroReport* 11:541-544.

Furian AF, Figuera MR, Oliveira MS, Ferreira AP, Fiorenza NG, de Carvalho Myskiw J, Petry JC, Coelho RC, Mello CF, Royes LF, 2007. Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. *Neurochem Int*, 50:164-171.

Grabowski GA, 2008. Treatment perspectives for the lysosomal storage diseases. *Expert Opin Emerg Drugs* 13, 197-211.

Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH, 1996. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* 39:385-389.

Halliwell B e Gutteridge JMC, 1996. Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci* 8:22-26.

Halliwell B e Gutteridge JMC, 2007. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, pp 268-340.

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

Halperin ML, Schiller CM, Fritz IB, 1971. The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *J Clin Invest*, 50:2276-2282.

- Harting I, Seitz A, Geb S, Zwickler T, Porto L, Lindner M, Kölker S, Höster F, 2008. Looking beyond the basal ganglia: the spectrum of MRI changes in methylmalonic acidaemia. *J Inherit Metab Dis*, 31:368-378.
- Hoffmann GF, Meler-Augenstein W, Stockler S, Surtees R, Rating D, Nyhan WL, 1993. Physiology and pathophysiology of organic acids on cerebrospinal fluid. *J Inherit Metab Dis*, 16:648-669.
- Hughes DA, Milligan A, Mehta A, 2007. Home therapy for lysosomal storage disorders. *Br J Nutr* 16, 1386-1389.
- Janetzky B, Hauck S, Youdim MB, Riederer P, Jellinger K, Pantucek F, Zöchling R, Boissl KW, Reichmann H, 1994. Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 169:126-128.
- Jenner P e Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 1996; 47, 161-170.
- Jenner P, 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53:26-38.
- Johnson AW, Mills K, Clayton PT, 1996. The use of automated electrospray ionization tandem MS for the diagnosis of inborn errors of metabolism from dried blood spots. *Biochem Soc Trans* 24:932-938.
- Karelson E, Bogdanovic N, Garlind A, Winbland B, Zilmer K, Kullisaar T, Vihalemm T, Kairane C, Zilmer M, 2001. The cerebrocortical areas in normal brain aging

and Alzheimer's disease: noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem Res* 26:353-361.

Karlhuber GM, Bauer HC, Eckl PM, 1997. Cytotoxic and genotoxic effects of 4-hydroxynonenal in cerebral endothelial cells. *Mutat Res* 381:209-216.

58Keller JN, Hanni KB, Markerbery, WR, 1999. 4-Hydroxynonenal increases neuronal susceptibility to oxidative stress. *J Neurosci Res* 58:823-830.

Kölker S, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Hoffmann GF, 2000. Methylmalonic acid induces excitotoxic neuronal damage in vitro. *J Inheriy Metab Dis*, 23:355-358.

Kölker, S., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Hoffmann, G. F. (2001). Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr. Res.* 50:76-82.

Kölker S, Sauer SW, Okun JG, Hoffmann GF, Koeller DM, 2006a. Lysine intake and neurotoxicity in glutaric aciduria type I: towards a rationale for therapy? *Brain* 129:e54.

Kölker S, Sauer SW, Surtees RA, Leonard JV, 2006b. The aetiology of neurological of organic acidaemias – a role for the blood-brain barrier. *J Inherit Metab Dis* 29:701-704.

Liu D, Wen J, Liu J, Li L, 1999. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *FASEB J* 13:2318-2328.



- Lönnrot K, Metsä-Ketelä T, Molnár G, Ahonen JP, Latvala M, Peltola J, Pietilä T, Alho H, 1996. The effect of ascorbic acid and ubiquinone supplementation on plasma and CSF total antioxidant capacity. *Free Radic Biol Med* 21:211-217.
- Lovell MA, Xie C, Markesbery WR, 2000. Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 855:116-123.
- Malfatti CRM, Royes LFF, Francescato L, Sanabria ERG, Rubin MA, Cavalheiro EA, Mello CF, 2003. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. *Epilepsia* 44:761-767.
- Malfatti CR, Perry ML, Schweigert ID, Muller AP, Paquetti L, Rigo FK, Figuera MR, Garrido-Sanabria ER, Mello CF, 2007. Convulsions induced by methylmalonic acid are associated with glutamic acid decarboxylase inhibition in rats: a role for GABA in the seizures presented by methylmalonic acidemic patients? *Neuroscience*, 146:1879-1887.
- Mancuso C, Scapagini G, Currò D, Giuffrida Stella AM, de Marco C, Butterfield DA, Calabrese V, 2006. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci* 12:1107-1123.
- Manoli I e Venditti CP, 2010. Methylmalonic acidemia. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2005 Aug 16 [updated 2010 Sep 28].

- Marisco P da C, Ribeiro MC, Bonini JS, Lima TT, Mann KC, Brenner GM, Dutra-Filho CS, Mello CF, 2003. Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. *Exp Neurol*, 182:455-460.
- Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP, 1997. A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 68:255-264.
- Markesbery WR, Carney JM, 1999. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 9:133-146.
- Maxwell SR, 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49:345-361.
- Mc Guire PJ, Parikh A, Diaz GA, 2009. Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab*, 98:173-180.
- McConnell EJ, Bittelmeyer AM, Raess BU, 1999. Irreversible inhibition of plasma membrane (Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup>)-ATPase and Ca<sup>2+</sup> transport by 4-OH-2,3-trans-nonenal. *Arch Biochem Biophys* 361:252-256.
- McLaughlin BA, Nelson D, Silver JA, Erecinska M, Chesselet MF, 1998. Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience*, 86:279-290.
- Méndez-Alvarez E, Soto-Otero R, Herminda-Ameijeiras A, López-Martín ME, Labandeira-García JL, 2001. Effect of iron and manganese on hydroxyl radical

production by 6-hydroxydopamine: mediation of antioxidants. *Free radic Biol Med* 31:986-998.

Mirandola SR, Melo DR, Schuck PF, Ferreira GC, Wajner M, Castilho RF, 2008. Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. *J Inherit Metab Dis* 31:44-54.

Mitchell GA e Fukao TJC. Inborn Errors of Ketone Body Metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill p. 2340-2342, 2001.

Moyano D, Vilaseca MA, Pineda M, Campistol J, Vernet A, Póo P, Artuch R, Sierra C, 1997. Tocopherol in inborn errors of intermediary metabolism. *Clin Chim Acta* 263:147-155.

Murphy GE, Lowekamp BC, Zerfas PM, Chandler RJ, Narasimha R, Venditti CP, Subramaniam S, 2010. Ion-abrasion scanning electron microscopy reveals distorted liver mitochondrial morphology in murine methylmalonic acidemia. *J Struct Biol* 171:125-132.

Nakao S, Moriya Y, Furuyama S, Niederman R, Sugiya H, 1998. Propionic acid stimulates superoxide generation in human neutrophils. *Cell Biol Int* 22:331-337.

Nicholls DG, 2003. Bioenergetics and transmitter release in the isolated nerve terminal. *Neurochem Res* 28:1433-1441.

- Nourooz-Zadeh J, Liu EH, Yhlen B, Anggard EE, Halliwell B, 1999. F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72:734-740.
- Ogier de Baulny H e Saudubray JM, 2002. Branched-chain organic acidurias. *Semin Neonatol* 7:65-74.
- Okun JG, Hörster F, Farkas LM, Feyh P, Hinz A, Sauer S, Haffmann GF, Unsicker K, Mayatepek E, Kölker S, 2002. Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. *J Biol Chem* 277:14674-14680.
- Ong WY, Lu XR, Hu CY, Halliwell B, 2000. Distribution of hydroxynonenal-modified proteins in the kainate-lesioned rat hippocampus: evidence that hydroxynonenal formation precedes neuronal cell death. *Free Radic Biol Med* 28:1214-1221.
- Ortiz A, Oliveira JP, Wanner C, Brenner BM, Waldek S, Warnock DG, 2008. Recommendations and guidelines for the diagnosis and treatment of Fabry nephropathy in adults. *Nat Clin Pract Nephrol* 4, 327-336.
- Pérez-Severiano F, Rios C, Segovia J, 2000. Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Res* 862:234-237.
- Perry G, Taddeo MA, Petersen RB, Castellani RJ, Harris PL, Siedlak SL, Cash AD, Liu Q, Nunomura A, Atwood CS, Smith MA, 2003. Adventitiously-bound redox

active iron and copper are at the center of oxidative damage in Alzheimer disease. *Biometals* 16:77-81.

Pettenuzzo LF, Schuck PF, Fontella F, Wannmacher CM, Wyse AT, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wajner M, 2002. Ascorbic acid prevents cognitive deficits caused by chronic administration of propionic acid to rats in the water maze. *Pharmacol Biochem Behav* 73:623-629.

Pettenuzzo LF, Schuck PF, Wyse AT, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wajner M, 2003. Ascorbic acid prevents water maze behavioral deficits caused by early postnatal methylmalonic acid administration in the rat. *Brain Res*, 976:234-242.

Pettenuzzo LF, Ferreira G da C, Schmidt AL, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, 2006. Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complex activities in rat tissues. *Int J Dev Neurosci* 24:45-52.

Requejo R, Hurd TR, Costa NJ, Murphy MP, 2010. Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *FEBS J*, 277:1465-1480.

Ribas GS, Manfredini V, de Mari JF, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, Sitta A, Deon M, Wajner M, Vargas CR, 2010a. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int J Dev Neurosci*, 28:127-132.

Ribas GS, Manfredini V, de Marco MG, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, Wajner M, Vargas CR, 2010b. Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes *in vitro*. *Mutat Res* 702:123-128.

Ribeiro MC, de Avila DS, Schneider CY, Hermes FS, Furian AF, Oliveira MS, Rubin MA, Lehmann M, Krieglstein J, Mello CF, 2005. Alpha-tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res*, 66:185-194.

Ribeiro LR, Figuera MR, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ferreira AP, Saraiva AL, Souza MA, Lima FD, Magni DV, Dezengrini R, Flores EF, Butterfield DA, Ferreira J, dos Santos AR, Mello CF, Royes LF, 2009. Methylmalonate-induced seizures are attenuated in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Int J Dev Neurosci*, 27:157-163.

Richard E, Monteoliva L, Juarez S, Perez B, Desviat LR, Ugarte M, Albar JP, 2006. Quantitative analysis of mitochondrial protein expression in methylmalonic acidemia by two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteome Res*, 5:1602-1610.

Richard E, Alvarez-Barrientos A, Pérez B, Desviat LR, Ugarte M, 2007. Methylmalonic acidemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway. *J Pathol* 213:453-461.

Richard E, Jorge-Finnigan A, Garcia-Villoria J, Merinero B, Desviat LR, Gort L, Briones P, Leal F, Pérez-Cerdá C, Ribes A, Ugarte M, Pérez B, and the MMACHC Working Group (Aguirre A, Andrés M, Badía J, Baldellou A, Couce ML, García-Carzola A, García-Silva MT, Lama R, Lopez-Mendoza S, Martínez-Pardo M, Olivares JL, Parini R, Parraga D, Pedrón C, Peña L, Pineda M, Pintos G, Porta R, Roselló P, Ruiz A, Toro M, Urbón A, Vernet A, Vilaseca MA, Yoldi ME), 2009. Genetic and cellular studies of oxidative stress in methylmalonic aciduria (MMA) cobalamin deficiency type C (cb1C) with homocystinuria (MMACHC). *Hum Mutat* 30:1558-1566.

Rigo FK, Pasquetti L, Malfatti CR, Figuera MR, Coelho RC, Petri CZ, Mello CF, 2006. Propionic acid induces convulsions and protein carbonylation in rats. *Neurosci Lett* 408:151-154.

Royes LF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, da Silva LG, Malfatti CR, Schneider PH, Braga AL, Wajner M, Mello CF, 2003. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience* 118:1079-1090.

Royes, L. F., Figuera, M. R., Furian, A. F., Oliveira, M. S., Myskiw, J. de C., Fiorenza, N. G., Frussa-Filho, R., Mello, C. F. (2005). Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by intrastriatal injection of methylmalonate. *Neurosci Lett* 376:116-120.

Royes LFF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, Myskiw J de C, Fiorenza NG, Petry JC, Coelho Rc, Mello CF, 2006. Effectiveness of creatine monohydrate on

seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. *Pharmacol Biochem Behav* 83:136-144.

Sauer SW, Okun JG, Fricker G, Mahringer A, Müller I, Crnic LR, Mühlhausen C, Hoffmann GF, Hörster F, Goodman SI, Harding CO, Koeller DM, Kölker S, 2006. Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Neurochem*, 97:899-910.

Sauer SW, Opp S, Mahringer A, Kaminki MM, Thiel C, Okun JG, Fricker G, Morath MA, Kölker S, 2010. Glutaric aciduria type I and methylmalonic aciduria: simulation of cerebral import models of the blood-brain barrier and the choroid plexus. *Biochim Biophys Acta* 1802:552-560.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD, 1989. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1:1269.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD, 1990a. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54:823-827.

Schapira AHV, Mann VM, Cooper JM, Dexter D, Daniel SE, Jenner P, Clark JB, Marsden CD, 1990b. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 55:2142-2145.



Schwab MA, Sauer SW, Okun JG, Nijtmans LG, Rodenburg RJ, van den Heuvel LP, Dröse S, Brandt U, Hoffmann GF, Ter Laak H, Kölker S, Smeitink JA, 2006. Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *Biochem J*, 398:107-112.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, 2001. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8.ed. New York: McGraw-Hill Inc, p. 3-45.

Sies H, 1985. Oxidative stress: introductory remarks. In: SIES, H., ed. *Oxidative Stress*; London: Academic Press.

Simon G, Erdos M, Maródi L, Tóth J, 2008. Gaucher disease: The importance of early diagnosis and therapy. *Orv Hetl* 149, 743-750.

Sinclair LA, 1982. A new look at the inborn errors of metabolism. *Ann Clin Biochem*, 19:314-321.

Singh, P., Jain, A., Kaur, G. (2004). Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol. Cell. Biochem.* 260(1-2):153-159.

Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR, 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10540-10543.

- Southorn PA e Powis G, 1988. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin Proc* 63:381-389.
- Stewart PM e Walser M, 1980. Failure of the normal ureagenic response to amino acids in organic acid-loaded rats. *Eur J Clin Invest*, 66:484-492.
- Stoy N, Mackay GM, Forrest CM, Christofides J, Egerton M, Stone TW, Darlington LG, 2005. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurochem* 93:611-623.
- Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Miyatake K, Nakano Y, 1995. Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. *J Nutr*, 125:2846-2850.
- Treacy E, Arbour L, Chessex P, Graham G, Kasprzak L, Casey K, Bell L, Mamer O, Scriver CR, 1996. Glutathione deficiency as a complication of methylmalonic acidemia: response to high doses of ascorbate. *J Pediatr*, 129:445-448.
- Vedder AC, Breunig F, Donker-Koopman WE, Mills K, Young E, Winchester B, Ten Berge IJ, Groener JE, Aerts JM, Wanner C, Hollak CE, 2008. Treatment of Fabry disease with different dosing regimens of agalsidase: Effects on antibody formation and GL-3. *Mol Genet Metab* 94, p. 319-325.
- Wajner M and Coelho JC, 1997. Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production. *J Inheret Metab Dis*, 20:761-768.

- Wajner M, Dutra JC, Cardozo SE, Wannmacher CMD, Motta ER, 1992. Effect of methylmalonate on *in vitro* lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. *J Inher Metab Dis*, 15:92-96.
- Walter JH, Wraith JE, Cleary MA, 1995. Absence of acidosis in the initial presentation of propionic acidaemia. *Arch Dis Child* 72:197-199.
- Ward RJ e Peters TJ, 1995. Free Radicals. In: MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K. (Eds). *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. New York: Churchill Livingstone, 765-777.
- Wyse AT, Brusque AM, Silva CG, Streck EL, Wajner M, Wannmacher CM, 1998. Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from rat cortex by propionic acid. *Neuroreport*, 9:1719-1721.
- Wyse AT, Streck EL, Barros SV, Brusque AM, Zugno AI, Wajner M, 2000. Methylmalonate administration decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport*, 11:2331-2334.
- Zaleska MM e Floyd RA, 1985. Regional lipid peroxidation in rat brain in vitro: possible role of endogenous iron. *Neurochem Res*, 10:397-410.