

***DANIELA RODRIGUES DE MELO***

**ALTERAÇÕES DO METABOLISMO OXIDATIVO  
MITOCONDRIAL E NEURODEGENERAÇÃO POR  
METILMALONATO**

***CAMPINAS***

***2012***





**UNICAMP**

---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

ALTERAÇÕES DO METABOLISMO OXIDATIVO  
MITOCONDRIAL E NEURODEGENERAÇÃO POR  
METILMALONATO

Daniela Rodrigues de Melo

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Sob orientação do Prof. Dr. Roger Frigério Castilho.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

M491a      Melo, Daniela Rodrigues de, 1982 -  
                 Alterações do metabolismo oxidativo mitocondrial e  
                 neurodegeneração por metilmalonato / Daniela  
                 Rodrigues de Melo. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

                 Orientador: Roger Frigério Castilho.  
                 Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
                 Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

                 1. Ácido metilmalônico. 2. Glutamato. 3.  
                 Mitocôndria. 4. Metabolismo. 5. Neurodegeneração. I.  
                 Castilho, Roger Frigério. II. Universidade Estadual de  
                 Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Changes in mitochondrial oxidative metabolism and neurodegeneration by methymalonate.

**Palavras-chave em inglês:**

Methylmalonic acid

Glutamate

Mitochondria

Metabolism

Neurodegeneration

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Roger Frigério Castilho [Orientador]

Leonardo dos Reis Silveira

Mário Henrique de Barros

Marcondes Cavalcante França Junior

Rodrigo Ramos Catharino

**Data da defesa:** 17-02-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica



---

## Banca examinadora de Tese de Doutorado

---

Daniela Rodrigues de Melo

---

Orientador(a): Prof. Dr. Roger Frigério Castilho

---

| Membros:                                                    |                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Professor (a) Doutor (a) Roger Frigério Castilho            |   |
| Professor (a) Doutor (a) Leonardo dos Reis Silveira         |  |
| Professor (a) Doutor (a) Marcondes Cavalcante Franca Junior |  |
| Professor (a) Doutor (a) Mário Henrique de Barros           |   |
| Professor (a) Doutor (a) Rodrigo Ramos Catharino            |   |

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 17/02/2012

---

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Bioenergética e de Metabolismo Energético em Neurodegeneração, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a orientação do Prof. Dr. Roger Frigério Castilho, na vigência dos auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX, UNICAMP) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Obesidade e Diabetes.

## AGRADECIMENTOS

---

Ao meu orientador Prof. Dr. Roger Frigério Castilho, pela singular orientação, discussões científicas, valiosos aprendizados e contribuição para o meu desenvolvimento científico.

Ao Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi pela oportunidade de fazer parte da sua equipe e pelas discussões pertinentes à literatura.

Aos professores membros da pré-banca e banca Dr. Rodrigo Ramos Catharino, Dr. Rodrigo Miguel Marin, Dr. José Antônio Rocha Gontijo, Leonardo dos Reis Silveira, Marcondes Cavalcante França Júnior e Mário Henrique de Barros pelas revisões e sugestões.

Aos colegas dos Laboratórios de Bioenergética e Metabolismo Energético em Neurodegeneração pela maravilhosa convivência durante estes anos: Sandra, Karina, Luciane, Anna Maria, Natália, Bruno, Evelise, Renata, Fernando, Jiri, Márcia, Elisângela, Edilene, Kívia, Ana Catarina, Mariana, Fabiane, Rafael, Ângela, Juliana Ronchi, Paolo, Felipe, Rute, Roberto, Carina, Thiago, Carlos, Carol, Franco, Vinícius, Sílvia, Sônia, Guilherme, Fábio, Raffaella, Juliana Ruas e Ivan e especialmente àqueles que se tornaram amigos queridos e indispensáveis.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa para o desenvolvimento desta tese.

Agradeço especialmente à Sandra Mirandola e Edilene Santos pelo enorme auxílio prestado durante o período e também pela amizade.

Aos grandes amigos Carlão, Carol Gigli, Carol Marmo, Giselle, Emerson, Karina Degaki, Soraya, Mariana e Fernanda pelo apoio e amizade.

À Denise, Rafael e Patrícia pelo incentivo.

À minha maravilhosa família, minhas irmãs Ana Paula e Luciana, minha sobrinha Laís, às tias Adelina e Ivone, e especialmente à minha mãe, meu exemplo, e ao Diego, pessoas que sempre estiveram ao meu lado, incentivando e apoiando minhas escolhas, sempre com paciência e uma palavra de carinho.

Aos meus avós André, Lúcia e tio Modesto (*In Memoriam*).

*“O mundo e o universo são lugares extremamente belos, e quanto mais os  
compreendemos mais belos eles parecem.”*

*Richard Dawkins*

|                                                                                                                                   | <b>PÁG.</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Resumo</b> .....                                                                                                               | xvii        |
| <b>Abstract</b> .....                                                                                                             | xx          |
| <b>1. Introdução</b> .....                                                                                                        | 23          |
| 1.1 Função mitocondrial e estresse oxidativo. ....                                                                                | 24          |
| 1.2 Acidemia metilmalônica .....                                                                                                  | 29          |
| 1.2.1 Aspectos bioquímicos e genéticos .....                                                                                      | 31          |
| 1.2.2 Diagnóstico e valores de referência .....                                                                                   | 32          |
| 1.2.3 Epidemiologia e sintomatologia .....                                                                                        | 33          |
| 1.2.4 Tratamento.....                                                                                                             | 34          |
| 1.2.5 Aspectos neurológicos.....                                                                                                  | 35          |
| 1.3 Disfunção mitocondrial na acidemia metilmalônica.....                                                                         | 37          |
| 1.4 Toxicidade celular por metilmalonato .....                                                                                    | 41          |
| <b>2. Objetivos</b> .....                                                                                                         | 45          |
| <b>3. Materiais e Métodos</b> .....                                                                                               | 47          |
| 3.1 Reagentes.....                                                                                                                | 48          |
| 3.2 Animais de experimentação .....                                                                                               | 48          |
| 3.3 Isolamento das frações mitocondriais de cérebro de ratos .....                                                                | 48          |
| 3.4 Determinação de proteína .....                                                                                                | 49          |
| 3.5 Medida da respiração mitocondrial.....                                                                                        | 50          |
| 3.6 Medida do transporte mitocondrial de dicarboxilatos utilizando sais de<br>potássio .....                                      | 50          |
| 3.7 Medida do transporte mitocondrial de dicarboxilatos utilizando sais de<br>amônio.....                                         | 51          |
| 3.8 Medida do transporte mitocondrial de glutamato .....                                                                          | 51          |
| 3.9 Medida da atividade da glutamato desidrogenase .....                                                                          | 51          |
| 3.10 Medida da atividade da aspartato transaminase.....                                                                           | 51          |
| 3.11 Medida da atividade do complexo $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase .....                                                  | 52          |
| 3.12 Medida da atividade do complexo piruvato desidrogenase .....                                                                 | 52          |
| 3.13 Medida do efluxo mitocondrial de $\alpha$ -cetoglutarato por meio do<br>transportador de $\alpha$ -cetoglutarato (OGC) ..... | 53          |
| 3.14 Preparo de amostras de conteúdo intramitocondrial para avaliação<br>do acúmulo intramitocondrial de MMA.....                 | 53          |
| 3.15 Tratamento crônico de ratos jovens com MMA .....                                                                             | 54          |

|                                                                                                                                   |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.16 Medida da atividade de citrato sintase .....                                                                                 | 55         |
| 3.17 Medida do consumo de O <sub>2</sub> por fragmentos de tecido .....                                                           | 55         |
| 3.18 Cultura de células PC12 .....                                                                                                | 55         |
| 3.19 Medida da viabilidade celular por azul de Tripán .....                                                                       | 56         |
| 3.20 Determinação do potencial de membrana mitocondrial em células PC12 intactas .....                                            | 56         |
| 3.21 Determinação do potencial de membrana mitocondrial em células PC12 permeabilizadas .....                                     | 57         |
| 3.22 Medida do consumo de O <sub>2</sub> por células PC12 intactas .....                                                          | 58         |
| 3.23 Medida do consumo de O <sub>2</sub> por células PC12 permeabilizadas .....                                                   | 58         |
| 3.24 Cultura de células U-87MG .....                                                                                              | 59         |
| 3.25 Medida da viabilidade celular por MTT .....                                                                                  | 59         |
| 3.26 Cultura primária de astrócitos .....                                                                                         | 60         |
| 3.27 Imagens da cultura primária de astrócitos .....                                                                              | 61         |
| 3.28 Medida da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por mitocôndrias isoladas .....                                   | 61         |
| 3.29 Medidas da produção de EROs por células PC12 em suspensão .....                                                              | 62         |
| 3.30 Análise estatística .....                                                                                                    | 62         |
| <b>4. Resultados e Discussão .....</b>                                                                                            | <b>63</b>  |
| 4.1. Efeito de MMA na bioenergética mitocondrial: avaliação da respiração mitocondrial na presença de diferentes substratos ..... | 64         |
| 4.2. Caracterização da inibição do metabolismo oxidativo mitocondrial de succinato por MMA .....                                  | 68         |
| 4.3. Inibição por MMA do metabolismo oxidativo neuronal de glutamato .....                                                        | 72         |
| 4.4. Efeito do tratamento crônico in vivo com MMA em ratos jovens .....                                                           | 92         |
| 4.5. Inibição por MMA da respiração por fragmentos de cérebro de rato (modelo in situ) .....                                      | 95         |
| 4.6. Toxicidade de MMA em linhagem tumoral de células neuronais (PC12) .....                                                      | 98         |
| 4.7. Efeito de MMA na viabilidade e morfologia de células gliais .....                                                            | 112        |
| 4.8. Efeito de MMA na produção mitocondrial de EROs .....                                                                         | 117        |
| <b>5. Conclusões .....</b>                                                                                                        | <b>127</b> |
| <b>6. Referências Bibliográficas .....</b>                                                                                        | <b>131</b> |
| <b>7. Anexos .....</b>                                                                                                            | <b>145</b> |
| 7.1 Principais artigos relacionados à Tese .....                                                                                  | 146        |
| 7.2 Autorizações de “Copyright” .....                                                                                             | 165        |
| 7.3 Parecer de aprovação do Comitê de Ética .....                                                                                 | 167        |
| 7.4 Currículo .....                                                                                                               | 168        |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

|                                    |                                                           |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>AdoCbl</b>                      | 5'-Deoxiadenosilcobalamina                                |
| <b>ADP</b>                         | Adenosina difosfato                                       |
| <b>AGC</b>                         | Trocador glutamato-aspartato                              |
| <b>ANT</b>                         | Translocador de nucleotídeos de adenina                   |
| <b>AST</b>                         | Enzima aspartato transaminase                             |
| <b>ATP</b>                         | Adenosina 5'-trifosfato                                   |
| <b><math>\alpha</math>-KG</b>      | $\alpha$ -Cetoglutarato                                   |
| <b><math>\alpha</math>-KGDH</b>    | Enzima $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase              |
| <b>BM</b>                          | Mitocôndria de cérebro de rato                            |
| <b>BSA</b>                         | Albumina soro bovina                                      |
| <b><math>\text{Ca}^{2+}</math></b> | Íon cálcio                                                |
| <b>CAT</b>                         | Carboxiatractilosídeo                                     |
| <b>CCCP</b>                        | Carbonil cianeto 3-clorofenil hidrazona                   |
| <b>CS</b>                          | Enzima citrato sintase                                    |
| <b>DHE</b>                         | Dihidroetídina                                            |
| <b>DiOC<sub>6</sub>(3)</b>         | 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide                        |
| <b>DMEM</b>                        | Meio de Eagle modificado por Dulbecco                     |
| <b>DMSO</b>                        | Dimetilsulfóxido                                          |
| <b>DNase</b>                       | Deoxiribonuclease I                                       |
| <b>DTNB</b>                        | Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)                       |
| <b>DTT</b>                         | Ditiotreitol                                              |
| <b><math>\Delta F</math></b>       | Variação da fluorescência                                 |
| <b><math>\Delta LS</math></b>      | Variação do espalhamento de luz                           |
| <b><math>\Delta \Psi</math></b>    | Potencial elétrico de membrana mitocondrial               |
| <b>EDTA</b>                        | Ácido etilenodiaminotetracético                           |
| <b>EGTA</b>                        | Etilenoglicol bis (éter 2-aminoetil) N,N,N',N'tetracético |

|                                     |                                                               |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <b>EMA</b>                          | Etilmalonato                                                  |
| <b>EROs</b>                         | Espécies reativas de oxigênio                                 |
| <b>FAD</b>                          | Flavina Adenina Dinucleotídeo (flavoproteína)                 |
| <b>FADH<sub>2</sub></b>             | Flavina Adenina Dinucleotídeo Reduzido                        |
| <b>FCCP</b>                         | Carbonil cianeto-p-trifluormetoxifenilidrazona                |
| <b>GDH</b>                          | Enzima glutamato desidrogenase                                |
| <b>GLUT</b>                         | Glutamato                                                     |
| <b>GPx</b>                          | Glutationa peroxidase                                         |
| <b>GR</b>                           | Glutationa redutase                                           |
| <b>H<sub>2</sub>DCFDA</b>           | Diclorodihidrofluoresceína diacetato                          |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>   | Peróxido de hidrogênio                                        |
| <b>HBSS</b>                         | Solução salina balanceada de Hank                             |
| <b>HEPES</b>                        | Ácido etanossulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1            |
| <b>HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b> | Íon fosfato                                                   |
| <b>HRP</b>                          | Peroxidase de raiz forte                                      |
| <b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> | Fosfato de potássio dibásico                                  |
| <b>KCl</b>                          | Cloreto de potássio                                           |
| <b>K<sub>i</sub></b>                | Constante de inibição                                         |
| <b>K<sub>m</sub></b>                | Constante de Michaelis-Menten                                 |
| <b>LDH</b>                          | Enzima lactato desidrogenase                                  |
| <b>MA</b>                           | Malonato                                                      |
| <b>MCM</b>                          | Enzima metilmalonil-CoA mutase                                |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b>             | Cloreto de magnésio                                           |
| <b>MMA</b>                          | Metilmalonato                                                 |
| <b>MOPS</b>                         | Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico                        |
| <b>MTT</b>                          | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio |
| <b>NAD<sup>+</sup></b>              | Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado                    |
| <b>NADH</b>                         | Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido                   |
| <b>NADPH</b>                        | Nicotinamida adenina dinucleotídeo monofosfato                |



|                                   |                                                  |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>NEM</b>                        | <i>N</i> -etilmaleimida                          |
| <b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> | Íon amônio                                       |
| <b>NH<sub>4</sub>Cl</b>           | Cloreto de amônio                                |
| <b>NMDA</b>                       | Receptor ionotrópico <i>N</i> -metil-D-aspartato |
| <b>NO<sup>•</sup></b>             | Óxido nítrico                                    |
| <b>NOS</b>                        | Óxido nítrico sintase                            |
| <b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b> | Radical ânion superóxido                         |
| <b>OGC</b>                        | Transportador de α-cetoglutarato                 |
| <b>OH<sup>•</sup></b>             | Radical hidroxila                                |
| <b>OLIGO</b>                      | Oligomicina                                      |
| <b>PBS</b>                        | Tampão fosfato-salino                            |
| <b>PDH</b>                        | Enzima piruvato desidrogenase                    |
| <b>ROS</b>                        | Espécies reativas de oxigênio                    |
| <b>ROT</b>                        | Rotenona                                         |
| <b>SDH</b>                        | Enzima succinato desidrogenase                   |
| <b>SDS</b>                        | Dodecil sulfato de sódio                         |
| <b>SH-CoA</b>                     | Coenzima A-SH                                    |
| <b>SNC</b>                        | Sistema nervoso central                          |
| <b>TMPD</b>                       | <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-p-fenilendiamina    |
| <b>TNB</b>                        | Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico                      |
| <b>TPM</b>                        | Transição de permeabilidade mitocondrial         |
| <b>TPx</b>                        | Tioredoxina peroxidase                           |
| <b>TR</b>                         | Tioredoxina redutase                             |
| <b>Tris</b>                       | Tris(hidroximetil)aminometano                    |
| <b>UQ</b>                         | Coenzima Q                                       |
| <b>UQH<sup>•</sup></b>            | Semiquinona                                      |
| <b>UQH<sub>2</sub></b>            | Coenzima Q reduzida                              |

## ***LISTA DE TABELAS***

---

***PÁG.***

**Tabela I** - Algumas doenças metabólicas e suas incidências aproximadas..... 34

**Tabela II** - Acúmulo intramitocondrial de MMA após respiração mantida por  
diferentes substratos na presença de MMA ..... 90

|                                                                                                                                          | <b>PÁG.</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Figura 1</b> – Comprometimento do metabolismo na acidemia metilmalônica com produção de MMA .....                                     | 30          |
| <b>Figura 2</b> – Efeito de MMA no consumo de oxigênio por mitocôndrias de cérebro. ....                                                 | 66          |
| <b>Figura 3</b> – Inibição por MMA do transporte mitocondrial de succinato pelo carreador de dicarboxilatos.....                         | 70          |
| <b>Figura 4</b> – Inibição por MMA do consumo de oxigênio mantido por glutamato em mitocôndrias de cérebro de rato .....                 | 74          |
| <b>Figura 5</b> – Avaliação do efeito de MMA no transporte mitocondrial de glutamato.....                                                | 76          |
| <b>Figura 6</b> – Efeito de MMA na atividade das enzimas glutamato desidrogenase e aspartato transaminase .....                          | 78          |
| <b>Figura 7</b> – Estímulo por MMA do efluxo mitocondrial de $\alpha$ -cetoglutarato pelo transportador de $\alpha$ -cetoglutarato.....  | 81          |
| <b>Figura 8</b> – Inibição por MMA da atividade da enzima $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase ....                                     | 84          |
| <b>Figura 9</b> – Inibição por MMA da atividade da enzima piruvato desidrogenase .....                                                   | 86          |
| <b>Figura 10</b> – Inibição por MMA da respiração mitocondrial mantida por $\alpha$ -cetoglutarato em presença de malonato (MA) .....    | 88          |
| <b>Figura 11</b> – Efeito do tratamento crônico <i>in vivo</i> com MMA no consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de cérebro ..... | 93          |
| <b>Figura 12</b> – Inibição por MMA do consumo de oxigênio por fragmentos de tecido de cérebro de rato .....                             | 96          |
| <b>Figura 13</b> – Redução na viabilidade de células PC12 incubadas na presença de MMA.....                                              | 99          |
| <b>Figura 14</b> – Potencial de membrana mitocondrial de células PC12 intactas incubadas na presença de MMA .....                        | 101         |

|                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 15</b> – Avaliação do uso de safranina para a estimativa de potencial de membrana mitocondrial em células PC12 permeabilizadas.....                              | 104 |
| <b>Figura 16</b> – Potencial de membrana mitocondrial de células PC12 permeabilizadas incubadas na presença de MMA .....                                                   | 107 |
| <b>Figura 17</b> – Inibição por MMA da respiração mitocondrial de células PC12 intactas .....                                                                              | 109 |
| <b>Figura 18</b> – Efeito de MMA na respiração mitocondrial de células PC12 permeabilizadas .....                                                                          | 111 |
| <b>Figura 19</b> – Efeito de MMA na viabilidade de células U-87MG.....                                                                                                     | 113 |
| <b>Figura 20</b> – Inibição por MMA da viabilidade de astrócitos primários .....                                                                                           | 115 |
| <b>Figura 21</b> – Alteração da morfologia e área de astrócitos primários após incubação com MMA.....                                                                      | 116 |
| <b>Figura 22</b> – Efeito de MMA na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por mitocôndrias de cérebro na presença ou ausência de ADP .....                      | 120 |
| <b>Figura 23</b> – Efeito do tratamento crônico <i>in vivo</i> com MMA na produção de EROs por mitocôndrias de cérebro de ratos jovens na presença ou ausência de ADP..... | 122 |
| <b>Figura 24</b> – Efeito de MMA na liberação de EROs por células PC12 .....                                                                                               | 125 |

***Resumo***

A acidemia metilmalônica é uma desordem metabólica hereditária envolvendo uma deficiência na atividade da enzima metilmalonil-CoA mutase, com resultante acúmulo de ácido metilmalônico (MMA) no organismo dos pacientes. Há evidências de comprometimento do metabolismo energético mitocondrial por MMA levando à neurodegeneração. Neste estudo avaliou-se o efeito *in vitro* de MMA no consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de cérebro de rato na presença de diferentes substratos para a cadeia respiratória. MMA (1-10 mM) inibiu fortemente a respiração mantida por glutamato ou succinato. Nós confirmamos, por meio de experimentos sobre o transporte mitocondrial de succinato, que o efeito inibitório do MMA na respiração mantida por succinato deve-se à inibição do transportador mitocondrial de dicarboxilatos, impedindo a captação de succinato pela mitocôndria. Medidas do transporte mitocondrial de glutamato revelaram que o efeito do MMA na respiração mitocondrial mantida por glutamato não está relacionado à inibição da captação deste substrato pela mitocôndria. Enquanto o MMA mostrou um fraco efeito inibitório sobre a atividade das enzimas glutamato desidrogenase e aspartato transaminase, a atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase foi significativamente inibida por MMA ( $K_i = 3,65$  mM). Medidas do transporte mitocondrial de  $\alpha$ -cetoglutarato mostraram que o MMA extramitocondrial pode ser trocado pelo  $\alpha$ -cetoglutarato intramitocondrial, depletando este substrato da matriz mitocondrial, com consequente inibição da respiração mantida por glutamato. Nós observamos que organelas isoladas de cérebro podem acumular aproximadamente o triplo da concentração de MMA presente no meio extramitocondrial. Em adição, a inibição pelo MMA do consumo de oxigênio por fragmentos de cérebro de rato foi parcialmente prevenida pela presença de malato. Os efeitos *in vivo* do MMA foram estudados por meio das medidas de respiração e produção de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos jovens cronicamente tratados (ip, 15 d) com MMA. Nenhuma

diferença foi observada entre as amostras controle e tratadas com MMA, indicando que o tratamento *in vivo* com MMA não leva à disfunção mitocondrial permanente. Ainda, estudos sobre o efeito do MMA na viabilidade e metabolismo de células neuronais e gliais foram realizados. Na linhagem neuronal tumoral PC12, o MMA diminuiu a viabilidade celular após 24h de tratamento. Os parâmetros de potencial de membrana mitocondrial e respiração foram avaliados após 7h de tratamento com MMA. MMA inibiu a respiração nas células intactas, porém, não alterou a respiração nas células permeabilizadas, nas quais não há restrição de substratos. A viabilidade de células de glioblastoma humano, U-87MG, não foi afetada pelo tratamento com MMA. Já em astrócitos de cérebro de rato em cultura primária exposta ao MMA, a viabilidade e área celular foram reduzidas significativamente e alterações morfológicas também foram notadas. Tais observações nas células gliais primárias sugerem que as células tumorais sejam mais resistentes aos efeitos deletérios do MMA. Em conjunto, estes resultados indicam que o efeito inibitório de MMA no metabolismo oxidativo mitocondrial pode ser atribuído à inibição concomitante de enzimas específicas e transportadores, limitando a disponibilidade de substratos para as vias metabólicas mitocondriais.

***Abstract***



Methylmalonic acidemia is an inherited metabolic disorder involving a deficiency in the activity of the enzyme methylmalonyl-CoA mutase or its cofactor 5'-deoxyadenosylcobalamin that results in an accumulation of methylmalonate (MMA) in the body. There is evidence that MMA impairs mitochondrial oxidative metabolism, leading to neurodegeneration. In this study we evaluated the *in vitro* effect of MMA on oxygen consumption by isolated rat brain mitochondria in the presence of different respiratory chain substrates. MMA (1-10 mM) strongly inhibited glutamate-supported and succinate-supported respiration. We confirmed that the inhibitory effect of MMA on succinate-supported respiration is due to inhibition of the mitochondrial dicarboxylate transporter by MMA, blocking succinate uptake by mitochondria. Glutamate transport measurements revealed that the MMA effect on glutamate-supported respiration is not due to inhibition of mitochondrial uptake of this substrate. While MMA showed a weak inhibitory effect on glutamate dehydrogenase and aspartate transaminase,  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase activity was significantly inhibited by MMA ( $K_i = 3.65$  mM).  $\alpha$ -ketoglutarate transport measurements showed that an exchange can take place between extramitochondrial MMA and intramitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate, depleting this substrate and consequently causing inhibition of glutamate-supported respiration. We observed that isolated brain organelles can accumulate nearly three times the concentration of extramitochondrial MMA. In addition, MMA inhibition of respiration by diced rat brain tissue was partially prevented by malate. MMA effects *in vivo* were studied by measuring respiration and reactive oxygen species generation in isolated brain mitochondria from young rats chronically injected (ip, 15 d) with MMA. No differences were observed between control and MMA-treated samples, indicating that *in vivo* MMA treatment does not lead to permanent mitochondrial dysfunction. In addition, a study into the effect of MMA on the viability and metabolism of neuronal and glial cells was carried out. In the PC12 neuronal tumor cell line, MMA

decreased cell viability after 24 hours of treatment. Mitochondrial membrane potential and respiration were evaluated after 7 hours of MMA treatment. MMA inhibited respiration in intact cells but did not alter respiration in permeabilized cells, where there is no substrate deprivation. Cell viability of U-87MG human glioblastoma cells was not affected by MMA treatment. However, in cells from a primary culture of rat cerebral astrocytes, viability and cell area were significantly reduced and morphological alterations were also noted. The most evident effects of MMA were observed in primary cells, suggesting that tumor cells are more resistant to the deleterious effects of MMA. Taken together, these results indicate that the inhibitory effect of MMA on mitochondrial oxidative metabolism can be ascribed to the concurrent inhibition of specific enzymes and transporters, limiting the availability of substrates for mitochondrial metabolic pathways.

## ***1. Introdução***

As mitocôndrias são organelas intracelulares com dupla membrana que têm como função predominante a geração de ATP pela fosforilação oxidativa, sendo a fonte primária de compostos altamente energéticos na célula. Além disso, elas desempenham outras funções importantes como a biosíntese de aminoácidos e esteróides, a beta-oxidação de ácidos graxos, produção e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs), regulação do cálcio intramitocondrial e citoplasmático e transdução de sinais nas vias de sinalização intracelular em algumas formas de apoptose (Beal, 2005; Brand e Nicholls, 2011).

A fosforilação oxidativa utiliza a energia armazenada nos alimentos para gerar um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna, ao mesmo tempo em que transfere elétrons para o oxigênio molecular, produzindo água. A energia do gradiente de prótons conduz a síntese de ATP pela ATP-sintase (complexo V). Ao longo dos anos muitas desordens têm sido associadas a defeitos na fosforilação oxidativa. O requerimento de um tecido pela energia produzida na fosforilação oxidativa reflete sua dependência em relação à mitocôndria. Em humanos, a maior parte da energia produzida por neurônios é derivada da fosforilação oxidativa. Sendo assim, estas células são bastante dependentes das mitocôndrias, possuindo uma alta densidade destas e, conseqüentemente, apresentam-se muito mais vulneráveis ao comprometimento do metabolismo energético e à disfunção mitocondrial (Schapira, 2010; Schon e Przedborski, 2011).

### ***1.1 Função mitocondrial e estresse oxidativo***

O processo mitocondrial de produção de energia ocorre pela ação combinada entre o ciclo do ácido cítrico, a cadeia respiratória e o sistema de fosforilação oxidativa. A

acetil-CoA formada pela oxidação de combustíveis orgânicos entra no ciclo do ácido cítrico e tem seus grupamentos acetil oxidados a  $\text{CO}_2$ . A energia liberada no processo é armazenada pelas coenzimas derivadas respectivamente de nicotinamida e flavina, NADH e  $\text{FADH}_2$ . Ambas atuam como transportadores de elétrons em suas formas reduzidas até alcançarem a cadeia respiratória mitocondrial. Esta é constituída por um conjunto de complexos multienzimáticos bioquimicamente conectados (complexos I, II, III e IV) na membrana interna mitocondrial, os transportadores de elétrons: coenzima Q (UQ) e citocromo *c* e ainda as proteínas ferro-enxofre. Ao alcançarem a cadeia respiratória, o NADH e o succinato transferem seus elétrons para a coenzima Q numa reação catalisada respectivamente pelos complexos I e II. Por sua vez, o complexo III carrega os elétrons da coenzima Q reduzida ( $\text{UQH}_2$ ) para o citocromo *c*, e deste os elétrons chegam ao seu destino final, o oxigênio molecular na citocromo *c* oxidase (complexo IV) (Nelson e Cox, 2011).

A NADH desidrogenase (complexo I) catalisa a transferência de 1 hidreto proveniente do NADH e 1 próton da matriz para a coenzima Q e a transferência de 4 prótons da matriz para o espaço intermembrana. Com a saída dos prótons a matriz fica carregada negativamente e o espaço intermembrana torna-se carregado positivamente. Dessa forma, o complexo I atua bombeando prótons para o espaço intermembrana à custa de energia proveniente da transferência de elétrons sendo, portanto, processos obrigatoriamente acoplados. O ubiquinol ( $\text{UQH}_2$ ), forma totalmente reduzida da coenzima Q, deixa o complexo I e difunde-se pela membrana interna até a coenzima Q: citocromo *c* oxidoreductase (complexo III), onde é reoxidado. A UQ possui a propriedade de aceitar 1 elétron, tornando-se o radical aniônico semiquinona ( $\text{UQH}^\bullet$ ), ou aceitar 2 elétrons, gerando o ubiquinol. A coenzima Q tem a importante função de manter o acoplamento do

fluxo de elétrons ao movimento de prótons já que ela consegue transportar ambos (Nelson e Cox, 2011).

No caso da succinato desidrogenase (complexo II), os elétrons são primeiramente transferidos do succinato para o FAD, e em seguida seguem sequencialmente para a coenzima Q, e o complexo III acopla a transferência de elétrons da coenzima Q reduzida para o citocromo *c* com o bombeamento vetorial de prótons para o espaço intermembrana. Devido à sua solubilidade, o citocromo *c* consegue transferir o elétron para o complexo IV, e neste o elétron é doado ao oxigênio molecular, reduzindo-o à água (Rottenberg H, 1998; Nelson e Cox, 2011) concomitantemente ao bombeamento de prótons para o espaço intermembranas.

A energia livre gerada pela oxidação dos substratos com transferência de elétrons pela cadeia respiratória é utilizada para o bombeamento de prótons para o espaço intermembranas. Com isso ocorre uma diferença na concentração de prótons e uma separação de cargas nas duas regiões separadas pela membrana, formando um gradiente eletroquímico e a energia estocada temporariamente neste gradiente, contendo os componentes químico e elétrico é denominada força próton-motriz. O componente químico consiste no gradiente de pH através da membrana mitocondrial interna ( $\Delta\text{pH}$ ) e apresenta valor de 0-1 unidade de pH, enquanto o componente elétrico, estabelecido pela diferença no potencial elétrico entre o citoplasma e a matriz mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) possui o valor de aproximadamente 180 mV em situação de repouso. Nas mitocôndrias a energia eletroquímica do gradiente de prótons impulsiona a produção de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico ( $\text{P}_i$ ) a medida que os prótons fluem passivamente de volta à matriz através do poro para prótons na ATP-sintase (complexo V). Esta é constituída por duas unidades distintas denominadas  $\text{F}_1$ , solúvel e localizada na matriz mitocondrial, e  $\text{F}_o$ ,

hidrofóbica e mergulhada na membrana mitocondrial interna (Mitchell 1966; Nicholls e Ferguson, 2002).

Atualmente, o metabolismo energético mitocondrial é tido como a principal fonte de EROs na maior parte das células eucarióticas (Kowaltowski et al., 2009). No complexo IV, a redução completa de uma molécula de  $O_2$  em duas moléculas de água necessita de 4 elétrons. No entanto, como consequência de sua configuração eletrônica triplete, a molécula de  $O_2$  tem forte tendência em receber um elétron de cada vez e o oxigênio não é liberado antes da obtenção de sua redução total (Turrens, 1997), fazendo com que a produção de EROs através da redução monoeletrônica do  $O_2$  pelo complexo IV seja praticamente inexistente.

Portanto, a produção mitocondrial de EROs ocorre nos passos intermediários da cadeia respiratória, sendo os principais sítios de formação os complexos I e III (Boveris e Chance, 1973; Adam-Vizi e Chinopoulos, 2006; Kowaltowski et al., 2009). A passagem de elétrons do complexo I para a coenzima Q reduzida e desta para o complexo III pode fazer com que o radical Q passe um elétron diretamente ao  $O_2$ . Uma série de intermediários tóxicos e reativos pode ser formada (Boveris e Cadenas, 1975), tais como o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que pode ser convertido no radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), ainda mais reativo (Halliwell e Gutteridge, 1984). Estas espécies podem provocar sérios danos, reagindo com enzimas, lipídios de membrana e ácidos nucleicos, danificando suas estruturas. Ainda, fatores que diminuem a velocidade do fluxo de elétrons através da cadeia respiratória aumentam a formação de superóxido talvez por prolongarem o tempo de vida do radical no ciclo Q.

Para realizar a detoxificação dos radicais livres e evitar o acúmulo das EROs, as mitocôndrias contam com um eficiente sistema antioxidante, responsável pela remoção

destas espécies. A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a conversão do radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e  $\text{O}_2$ . A isoforma da SOD presente na matriz mitocondrial é dependente de manganês (MnSOD), enquanto a isoforma da SOD presente no citosol e no espaço intermembrana é dependente de cobre e zinco (CuZnSOD) (Fridovich, 1995; Okado-Matsumoto e Fridovich, 2001). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado, além de ser uma espécie química mais estável, é permeável pelas membranas e pode ser transportado por aquaporinas (Bienert et al., 2006). Assim, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  se difunde dentro da célula, podendo ser removido tanto por sistemas antioxidantes mitocondriais como citosólicos, como a catalase (Radi et al., 1991; Salvi et al., 2007), tioredoxina peroxidase (TPx) (Rhee et al., 1994), e glutathione peroxidase (GPx). Esta última possibilita a conversão do  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado em água, ao mesmo tempo em que oxida a glutathione, que é prontamente reduzida pela ação da glutathione redutase (GR).

A glutathione é importante também para manter os grupamentos sulfidril de proteínas em seu estado reduzido, impedindo de sofrerem os efeitos deletérios do estresse oxidativo. Quando as espécies não são metabolizadas pelos sistemas antioxidantes, elas podem gerar o radical  $\text{OH}^\bullet$ , altamente reativo e citotóxico, por meio da reação de Fenton, na qual o  $\text{H}_2\text{O}_2$  reage com íons cobre ( $\text{Cu}^+$ ) ou ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Halliwell e Gutteridge, 1997). Não há nenhum sistema enzimático de defesa contra o  $\text{OH}^\bullet$ . Assim, em condições em que ocorre um aumento da produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ou uma falha no sistema antioxidante, pode ocorrer uma maior produção de  $\text{OH}^\bullet$  com lesões oxidativas em biomoléculas. A mitocôndria é creditada ainda como uma possível fonte de espécies reativas de nitrogênio derivadas do óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), produzido por uma óxido nítrico sintase mitocondrial (mtNOS) (Giulivi et al., 1998).



Sabe-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  está envolvido na ativação de muitos processos metabólicos (atividade cardíaca, coagulação do sangue, manutenção das membranas celulares, adesão celular, transmissão de sinais às células nervosas, contração muscular) e a regulação de funções musculares e nervosas (Maack e O'Rourke, 2007), e é o gradiente eletroquímico formado entre os compartimentos intra e extracelulares que possibilita a transdução de sinais bioquímicos ao interior das células (Clapham, 2007). No entanto, em algumas situações ocorre um aumento exagerado na concentração intracelular deste íon, e a exposição prolongada das células a altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  pode causar danos pela ativação de diversas vias que sinalizam para a morte celular.

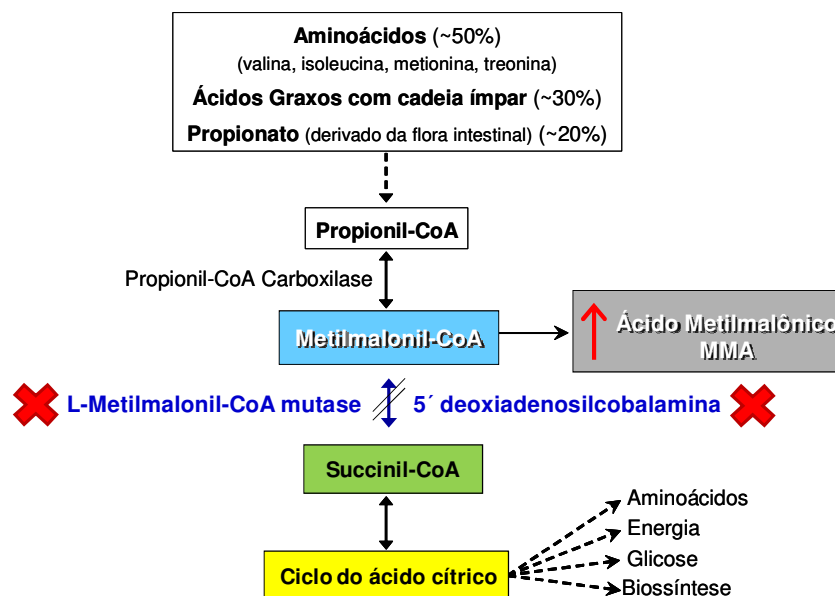
Em neurônios, a bioenergética mitocondrial e o estresse oxidativo, juntamente com o transporte mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  formam uma rede intimamente conectada. A geração deficiente de ATP na célula pode resultar em falha na atividade da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática e do retículo endoplasmático com sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por sua vez, o estresse oxidativo pode restringir a capacidade da mitocôndria em gerar ATP. Ainda, a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela célula e seu transporte para dentro da mitocôndria pode sobrecarregar o circuito de prótons mitocondrial, podendo levar à transição de permeabilidade mitocondrial e morte neuronal induzida pela crise energética (Nicholls, 2009).

## **1.2 Acidemia metilmalônica**

A acidemia metilmalônica consiste em um grupo de desordens genéticas autossômicas recessivas raras que afeta as vias catabólicas dos aminoácidos de cadeia ramificada isoleucina, valina, metionina e treonina, bem como da timina, ácidos graxos de cadeia ímpar de carbonos e ainda a via catabólica da cadeia lateral do colesterol. Estas desordens normalmente são causadas por mutações no gene *MUT* (609058), levando à

deficiência parcial (*mut*<sup>-</sup>) ou completa (*mut*<sup>o</sup>) na atividade da metilmalonil-CoA mutase (MCM, EC 5.4.99.2), uma enzima da matriz mitocondrial que catalisa a conversão de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA (**Fig. 1**). Em adição, defeitos na síntese de 5'-deoxiadenosilcobalamina (AdoCbl), derivada da vitamina B12, que atua como cofator para a atividade da MCM, ou mesmo falhas no metabolismo da própria cobalamina podem levar à deficiência funcional da enzima MCM, resultando também em acidemia metilmalônica (Fenton et al., 2001; Tanpaiboon, 2005; Venditti, 2005).

### VIA DE DEGRADAÇÃO



**Fig. 1** - Comprometimento do metabolismo na acidemia metilmalônica com produção de MMA.

A metilmalonil-CoA, dentre outros metabólitos intermediários, é acumulada na matriz mitocondrial como resultado da deficiência de MCM. A metilmalonil-CoA é subsequentemente hidrolizada a CoA e ácido metilmalônico (MMA). Este é considerado o principal metabólito acumulado nos fluidos corpóreos e tecidos dos pacientes com

acidemia metilmalônica, nos quais causa um efeito tóxico que parece estar associado à disfunção do metabolismo energético mitocondrial (Kovachy et al., 1983; Fenton et al., 2001; Chandler e Venditti, 2005).

### **1.2.1 Aspectos bioquímicos e genéticos**

Normalmente a metilmalonil-CoA é formada durante a conversão de propionil-CoA a succinil-CoA. Na primeira etapa da via a propionil-CoA carboxilase converte a propionil-CoA em D-metilmalonil-CoA. Em seguida, a D-metilmalonil-CoA é convertida em L-metilmalonil-CoA pela metilmalonil-CoA racemase e a L-metilmalonil-CoA é convertida numa reação de isomerização, catalisada pela L-metilmalonil-CoA mutase, em succinil-CoA (Fenton et al., 2001). As três reações são reversíveis, entretanto, a via prossegue na direção da formação de succinil-CoA. A enzima metilmalonil-CoA mutase constitui um homodímero. Cada subunidade é formada por dois domínios: um deles contém o sítio de ligação para o substrato e o outro contém o sítio de ligação para o cofator 5'-deoksiadenosilcobalamina (Ledley et al., 1988; Nham et al., 1990).

A falha na atividade desta enzima é atribuída a diferentes mutações no gene *MUT*, mapeado no cromossomo 6p21. Já a deficiência do cofator 5'-deoksiadenosilcobalamina está relacionada com mutações em 2 genes. O gene *MMAA* codifica uma proteína possivelmente relacionada com a translocação de cobalamina para dentro da mitocôndria (Dobson et al., 2002) enquanto o gene *MMAB* codifica a cobalamina ATP-transferase. Defeitos nas primeiras etapas de processamento da cobalamina resultam na combinação de acidemia metilmalônica e homocistinúria, enquanto falhas nas últimas etapas causam as mesmas desordens isoladamente. Os diferentes fenótipos resultantes destas mutações incluem: ausência da atividade da metilmalonil-CoA mutase, redução da atividade da metilmalonil-CoA mutase, deficiência

na síntese de 5'-deoxiadenosilcobalamina e falha do metabolismo de cobalamina (Sweetman e Williams, 2001).

### **1.2.2 Diagnóstico e valores de referência**

Muitos dos sintomas apresentados pelos pacientes acometidos pela acidemia metilmalônica são compartilhados por outras acidemias orgânicas. Deste modo, o diagnóstico preciso e definitivo baseia-se em teste bioquímico especializado, que consiste na análise dos ácidos orgânicos no plasma e/ou urina (Venditti, 2005). Por muitos anos a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi utilizada para determinação de MMA. Entretanto, esta técnica vem sendo substituída pela cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas devido à sua maior simplicidade metodológica (Carvalho e Kok, 2008). Além disso, já está disponível em alguns centros diagnósticos dos Estados Unidos a análise genética da acidemia metilmalônica, que consiste na detecção de mutações através do sequenciamento dos genes *MUT*, *MMAA* e *MMAB* do paciente (Venditti, 2005). O MMA pode alcançar altas concentrações no plasma e no líquido durante os períodos de descompensação metabólica (Fenton et al., 2001).

Os valores normais de referência para o MMA são: 4 mmol/mol de creatinina na urina, 0,27 µmol/L no sangue e 0,59 µmol/L no líquido. As concentrações de MMA nos indivíduos afetados severamente estão na faixa de 1.000–10.000 mmol/mol creatinina na urina e 220–2.900 µmol/L no sangue (Fenton et al., 2001; Venditti, 2005). Já nos pacientes responsivos à vitamina B12, o MMA varia de 10 a 100 mmol/mol de creatinina na urina e 5 a 100 µmol/L no sangue (Venditti, 2005). As concentrações de MMA no líquido dos pacientes são similares àsquelas encontradas no sangue, embora possam alcançar níveis ainda mais elevados (Rosenberg, 1978; Hoffmann et al., 1993).

### **1.2.3 Epidemiologia e sintomatologia**

É estimado que a acidemia metilmalônica afete 1 em cada 48.000 recém-nascidos nos Estados Unidos (Coulombe et al., 1981), enquanto as incidências na Itália e Alemanha são de 1:115.000 e 1:169.000, respectivamente (Deodato et al., 2006) (**Tabela I**). Os pacientes começam a apresentar os sintomas da doença logo nas primeiras semanas de vida, com o início da ingestão de proteínas. Algumas das manifestações clínicas agudas resultantes da descompensação metabólica compreendem: vômitos recorrentes, desidratação e dificuldade respiratória. As manifestações neurológicas envolvem retardo psicomotor, irritabilidade, letargia, hipotonia, convulsões e coma, enquanto os achados laboratoriais incluem cetoacidose, hiperamonemia leve a moderada, hiperglicinemia, acidemia láctica, hipoglicemia e neutropenia (Ogier de Bauny e Saudubray, 2002). Sem terapia específica, estes episódios implicam em severa incapacidade ou morte. A maior parte das crianças sobrevive à primeira crise metabólica aguda, mas desenvolve complicações a longo prazo, incluindo retardo no desenvolvimento, retardo psicomotor, déficit neurológico, insuficiência renal crônica, cardiomiopatia e pancreatite (Baumgarter e Viardot, 1995; Leonard, 1995; Kahler et al., 1994; Horster et al., 2007). O aumento na sobrevivência dos pacientes reflete o diagnóstico precoce da doença e uma rápida intervenção durante as crises agudas (Baumgarter e Viardot, 1995; Ogier de Bauny et al., 2005). Os pacientes que têm o diagnóstico atrasado em alguns dias apresentam quadro de séria desidratação, além de acidose e hiperamonemia severas.

| <b>Doença Metabólica</b>                                | <b>Deficiência Primária</b>                       | <b>Incidência</b> |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------|
| Deficiência da desidrogenase de cadeia média acetil-CoA | Desidrogenase de cadeia média acetil-CoA          | ~1:18.000         |
| Fenilcetonúria                                          | Fenilalanina hidroxilase                          | ~1:35.000         |
| <b>Acidemia Metilmalônica</b>                           | <b>Metilmalonil-CoA mutase</b>                    | <b>~1:48.000</b>  |
| Acidemia Propiônica                                     | Propionilcarboxilase                              | ~1:82.000         |
| Doença do xarope do bordo                               | Desidrogenase de $\alpha$ -cetoácidos ramificados | ~1:260.000        |

(Coulombe et al., 1981; Zytkevich et al., 2001)

**Tabela I** - Algumas doenças metabólicas e suas incidências aproximadas.

#### **1.2.4 Tratamento**

O tratamento dos pacientes de acidemia metilmalônica em descompensação metabólica consiste essencialmente na reidratação, que deve reestabelecer ainda o equilíbrio ácido-base. Caso o pH não seja normalizado pela reidratação, faz-se necessário o uso de infusão de bicarbonato (Ogier de Baulny et al., 2005). A redução ou eliminação dos metabólitos tóxicos tem como objetivo manter o equilíbrio bioquímico dos pacientes e é realizada por hemofiltração, pelo fato de que a hemodiálise não é bem tolerada hemodinamicamente pelos neonatos (Yannicelli, 2006).

Em relação à dieta, é realizada uma suplementação parenteral com 1-3 mg/dia de cobalamina (Ogier de Baulny et al., 2005). Normalmente os pacientes *mut<sup>-</sup>* e aqueles relacionados com defeitos na síntese de AdoCbl apresentam boas respostas clínicas quando suplementados com vitamina B12, enquanto os pacientes *mut<sup>o</sup>* não são

responsivos ao tratamento, constituindo o fenótipo mais severo da doença (Tanpaiboon, 2005; Deodato et al., 2006).

Além da vitamina B12, a terapia nutricional inclui uma dieta pobre em proteínas, se possível utilizando fórmulas comerciais livres de aminoácidos de cadeia ramificada, precursores de propionil-CoA, mas que seja rica em glicose e altamente energética, evitando o catabolismo de proteínas musculares e, conseqüentemente, o aumento na produção de metabólitos tóxicos. Pelos mesmos motivos, estados de jejum também devem ser evitados (Thompson e Chalmers, 1990). Além disso, o uso de metronidazol pode ser efetivo em diminuir a produção de propionato pela flora intestinal (Thompson et al., 1990), e a suplementação com 100 mg/kg/dia de carnitina pode prevenir uma deficiência secundária causada pela conjugação da carnitina com componentes acil-CoA que são perdidos e, ainda, permitir a detoxificação do organismo pela excreção de propionilcarnitina (Ogier de Baulny et al., 2005). Como opção para as complicações a longo prazo, o transplante combinado de fígado e rim tem sido bastante executado para a reposição da atividade enzimática. Embora nenhuma destas terapias pareça prevenir as complicações neurológicas nestes pacientes (Leonard et al., 2001), o recente estudo de Pinar-Sueiro et al. (2010) mostrou uma melhora significativa e a longo prazo na neuropatia óptica apresentada por um paciente com acidemia metilmalônica sob terapia com coenzima Q10 e alfa-tocoferol (vitamina E).

#### **1.2.5 Aspectos neurológicos**

O MMA é predominantemente produzido no fígado e nos rins, devido à alta atividade da metilmalonil-CoA mutase nestes órgãos, em condições fisiológicas (Fenton et al., 1982; Kennedy et al., 1990), podendo ser produzido também no músculo esquelético e no cérebro (Chandler et al., 2007). Neste último, embora pequenas quantidades de MMA

sejam geradas, ocorre um acúmulo intracerebral de MMA por conta da barreira hematoencefálica, que virtualmente impermeável aos ácidos dicarboxílicos como o MMA (Hoffmann et al., 1993), acaba por armazenar este metabólito dentro do sistema nervoso central (Kölker et al., 2006). Ainda que muitos sistemas de transporte tenham sido descritos para os ácidos monocarboxílicos e para aminoácidos (Tamai e Tsuji, 2000), o mesmo não ocorre com os ácidos dicarboxílicos, tendo fluxo limitado dentro e fora do sistema nervoso central (Hassel et al., 2002; Sauer et al., 2006; Sauer et al., 2010).

De fato, a neurodegeneração que acontece na acidemia metilmalônica é atribuída a este acúmulo intracerebral de MMA (Kölker et al., 2006), e embora os achados neuropatológicos no cérebro não sejam específicos, pode-se observar a ocorrência de lesão bilateral dos gânglios da base. Os pacientes normalmente desenvolvem sinais extrapiramidais agudos devido a esta neurodegeneração, que é atribuída ao acúmulo de metabólitos tóxicos (Heidenreich et al., 1988; Fenton et al., 2001; Harting et al., 2008).

Notavelmente, o globo pálido é altamente vulnerável ao dano hipóxico ou isquêmico, observado na intoxicação por monóxido de carbono ou cianeto, e também em outras acidemias orgânicas envolvendo comprometimento do metabolismo energético, como acidemia propiônica e encefalopatia mitocondrial (Burgeois et al., 1992; Brismar e Ozand, 1994; Haas et al., 1995; Albin, 2000).

Normalmente os pacientes apresentam também um relativo retardo na maturação cerebral, incluindo atraso de mielinização, além de modificações na substância branca e anormalidades no tronco cerebral e cerebelo (Harting et al., 2008). Ainda, em pacientes em crise metabólica foram encontrados níveis elevados de lactato no globo pálido e líquido (Hoffmann et al., 1993), e de modo interessante, pacientes submetidos ao transplante hepático-renal podem apresentar as lesões neurológicas agudas sem



apresentar descompensação metabólica (Leonard et al., 2001; Burlina et al., 2003), o que parece corroborar com a hipótese do aprisionamento intracerebral de MMA (Kölker et al., 2006).

### ***1.3 Disfunção mitocondrial na acidemia metilmalônica***

As manifestações sistêmicas e neurológicas, incluindo a neurodegeneração que ocorre na acidemia metilmalônica parecem estar associadas ao acúmulo de MMA e outros metabólitos tóxicos nos tecidos e fluidos corpóreos, resultando em comprometimento do metabolismo energético mitocondrial e desbalanço redox (Wajner and Coelho, 1997; Fenton et al., 2001; Morath et al., 2008; Chandler et al., 2009). De fato, é proposto que a disfunção da homeostase mitocondrial participe do mecanismo de dano tecidual em muitas das acidemias orgânicas como acidemia propiônica, acidúria glutárica tipo I, acidúria D-2-hidroxiglutárica e encefalopatia etilmalônica (Wajner e Goodman, 2011).

Os pacientes acometidos pela acidemia metilmalônica apresentam algumas evidências de comprometimento do metabolismo oxidativo mitocondrial como acúmulo no sangue e excreção na urina de grandes quantidades de ácido láctico e intermediários do ciclo do ácido cítrico (Fenton et al., 2001). Além disso, anormalidades mitocondriais, redução na captação de oxigênio e baixa atividade de citocromo c oxidase e de outras enzimas dos complexos da cadeia respiratória foram observadas em vários tecidos provenientes de pacientes (Hayasaka et al., 1982; Ostergaard et al., 2005; Chandler et al., 2009; de Keyzer et al., 2009).

Efeitos de MMA na inibição de atividades enzimáticas e de sistemas de transporte foram descritos (Halperin et al., 1971; Dutra et al., 1993; Toyoshima et al.,

1995; Wajner and Coelho, 1997; Brusque et al., 2002; Maciel et al., 2004; Schuck et al., 2004; Pettenuzzo et al., 2006; Morath et al. 2008), apresentando em sua maior parte características inibitórias competitivas. De modo interessante, as mitocôndrias de fígado têm a capacidade de captar e acumular MMA exógeno, elevando a concentração de MMA na matriz mitocondrial cerca de 3-9 vezes em relação ao ambiente extramitocondrial (Toyoshima et al., 1995), o que provavelmente faz com que estas organelas sejam mais propensas aos efeitos tóxicos do MMA.

Outros metabólitos intermediários como os ácidos propiônico, 3-hidroxiopropiônico, malônico e 2-metilcítrico são acumulados na acidemia metilmalônica (Fenton et al., 2001; Kölker e Okun, 2005). Atualmente é argumentado que parte da fisiopatologia desta doença estaria relacionada ao efeito tóxico resultante do acúmulo destes metabólitos secundários (Okun et al., 2002; Kölker et al., 2003; Kölker e Okun, 2005). Altos níveis de ácido malônico, inibidor competitivo da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, são encontrados nos pacientes, o que poderia explicar as lesões teciduais observadas na doença (Okun et al., 2002). Os ácidos 2-metilcítrico e propiônico, além da propionil-CoA também estão relacionados com a degeneração tecidual (Reszko et al., 2003). Ainda, é proposto que o acúmulo de metilmalonil-CoA seja tóxico tanto pela inibição competitiva por este metabólito da atividade da piruvato carboxilase, como mostrado por Utter et al. (1964), como também pelo armazenamento de CoA, sendo que ambos os processos podem prejudicar o metabolismo oxidativo (Fenton et al., 2001). Além disso, o comprometimento da clivagem intramitocondrial de glicina e a inibição da *N*-acetilglutamato sintase são responsáveis respectivamente pela hiperglicinemia e hiperamonemia apresentada pelos pacientes com acidemia metilmalônica (Tanpaiboon, 2005).

O trabalho de Oberholzer et al. (1967) foi o que primeiro propôs que a inibição da piruvato carboxilase pela metilmalonil-CoA poderia promover diminuição na gliconeogênese, resultando na incapacidade de manter os níveis sanguíneos de glicose. A hipoglicemia está presente em um número considerável de pacientes com acidemia metilmalônica. Pouco depois, resultados de Halperin et al. (1971) mostraram um sítio alternativo de inibição da gliconeogênese na acidemia metilmalônica, o qual envolve a inibição pelo MMA do transporte de malato através do carreador mitocondrial de dicarboxilatos. Notadamente, o MMA pode ser transportado através dos três sistemas existentes para o transporte de malato: os carreadores de dicarboxilatos, tricarboxilatos e de  $\alpha$ -cetoglutarato (Halperin et al., 1971). Em adição, o mesmo trabalho sugeriu um efeito inibitório do MMA na succinato desidrogenase (SDH), componente da cadeia respiratória mitocondrial e do ciclo do ácido cítrico. Outros experimentos sugerindo que o MMA seria um fraco inibidor competitivo da SDH foram conduzidos empregando-se mitocôndrias isoladas e partículas submitocondriais de cérebro e fígado de rato (Dutra et al., 1993; Toyoshima et al., 1995). Este efeito foi atribuído à similaridade estrutural entre o MMA, malonato (um inibidor clássico da SDH), e succinato. No entanto, o efeito inibitório de MMA na atividade da SDH não foi detectado em partículas submitocondriais purificadas (Okun et al., 2002; Kölker et al., 2003).

Adicionalmente, foi descrita uma redução dose-dependente pelo MMA na produção de  $\text{CO}_2$  no cérebro de ratos jovens a partir de glicose e acetato, e também um aumento na produção de lactato em fragmentos de cérebro de rato (Wajner et al., 1992). Estes efeitos do MMA foram seguidos por aumento na captação de glicose, indicando que a oxidação aeróbica da glicose é bloqueada por este metabólito. Estes experimentos suportam o conceito de que o MMA pode comprometer a atividade do ciclo do ácido cítrico devido à falta de intermediários incluindo o oxaloacetato (gerado pela piruvato

carboxilase), succinato intramitocondrial e malato. A ausência de succinil-CoA devido à falha primária da metilmalonil-CoA mutase pode também contribuir para a redução da atividade do ciclo do ácido cítrico na acidemia metilmalônica. O uso de substratos alternativos como corpos cetônicos e lactato pelas mitocôndrias de cérebro também pode ser inibido pelo MMA através da inibição competitiva da  $\beta$ -hidroxibutirato (Dutra et al., 1991, 1993) e lactato desidrogenases (Saad et al., 2006). O efeito inibitório de MMA na  $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase no fígado pode resultar em suprimento diminuído de corpos cetônicos para o cérebro e conseqüentemente prejuízo de sua utilização neste órgão.

Outra possibilidade de atuação do MMA nas mitocôndrias é como inibidor de componentes da cadeia respiratória mitocondrial. Embora as evidências apresentadas acima indiquem que o MMA não é inibidor da SDH (complexo II), ele pode levar a diferentes alterações nas atividades dos complexos respiratórios. Diminuição nas atividades dos complexos I + III e II + III foi observada em homogenatos de cérebro, fígado e rim após exposição ao MMA (Brusque et al., 2002; Pettenuzzo et al., 2006). No entanto, não houve efeito inibitório na atividade do complexo IV em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e homogenatos de diferentes tecidos de rato (Hayasaka et al., 1982; Brusque et al., 2002; Pettenuzzo et al., 2006). Notadamente, foram encontradas atividades deficientes dos complexos III e IV em extratos de fígado de pacientes com acidemia metilmalônica (Hayasaka et al., 1982; Chandler et al., 2009; de Keyzer et al., 2009; Valayannopoulos et al., 2009) e em dois modelos de roedores para a acidemia metilmalônica (Krahenbuhl et al., 1991; Chandler et al., 2009). Pelo fato da redução no fluxo de elétrons na cadeia respiratória estar associada com um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (Kowaltowski et al., 2009), o comprometimento da atividade de complexos respiratórios na acidemia metilmalônica parece responsável pela produção aumentada de oxidantes. Ainda, Schuck et al. (2004) observaram que o MMA inibe a

atividade da creatina quinase mitocondrial no córtex cerebral de ratos. Esta enzima é um importante componente do tamponamento de energia celular e do sistema de transporte, conectando a fosforilação oxidativa com o consumo de ATP (Schlatter et al., 2006). A atividade reduzida na atividade da creatina quinase pode levar a um declínio da razão celular ATP/ADP, como observado em cultura de células estriatais expostas ao MMA (McLaughlin et al., 1998).

Mudanças na morfologia mitocondrial, incluindo megamitocôndria, foram observadas no fígado, rim e pâncreas de um modelo de camundongo knockout estabelecido para acidemia metilmalônica (Chandler et al., 2009; Murphy et al., 2010).

#### ***1.4 Toxicidade celular por metilmalonato***

Trabalhos descrevendo os efeitos do MMA em cultura de células neuronais mostraram diminuição da razão ATP/ADP, colapso dos gradientes iônicos seguido por despolarização da membrana e aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , levando à morte celular por necrose e apoptose (McLaughlin et al., 1998; Okun et al., 2002; Maciel et al., 2004; Kowaltowski et al., 2006). Os antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato previnem a morte induzida pelo MMA sugerindo o envolvimento de mecanismos celulares excitotóxicos no dano celular (McLaughlin et al., 1998; Okun et al., 2002). Ainda, o envolvimento da excitotoxicidade também é evidenciado pela prevenção promovida pelo MK-801, antagonista do receptor de glutamato, no comportamento rotacional e nas convulsões induzidas pela administração intraestriatal de MMA (de Mello et al., 1996).

A excitotoxicidade é um processo do sistema nervoso central que pode estar associado com uma liberação aumentada de glutamato em resposta ao comprometimento

do metabolismo energético cerebral (excitotoxicidade secundária) (Albin e Greenamyre, 1992). A toxicidade de glutamato é promovida principalmente pela ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), com influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  (Choi 1987; Rothman e Olney, 1987). Sob condições excitotóxicas, as mitocôndrias são as principais organelas responsáveis pelo sequestro de  $\text{Ca}^{2+}$ , um evento associado com a morte celular neuronal (Nicholls e Budd, 2000). As concentrações aumentadas de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mitocondrial podem induzir a disfunção na organela por promover o processo de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), uma permeabilização não-seletiva da membrana mitocondrial interna (Kowaltowski et al., 2001). O envolvimento da TPM na neurotoxicidade mediada por glutamato foi evidenciado por experimentos que empregaram culturas de células PC12 e fatias de cérebro de ratos, nos quais uma importante inibição da morte celular induzida por MMA foi observada na presença de inibidores da TPM (Maciel et al., 2004; Kowaltowski et al., 2006). Desde que o desbalanço redox é um importante indutor da TPM (Castilho et al., 1995), o aumento na geração mitocondrial de EROs nas células de pacientes com acidemia metilmalônica, como observado por Richard et al. (2007), pode facilitar a ocorrência de TPM.

Foi também observado que a abertura do canal mitocondrial de  $\text{K}^+$  sensível a ATP (mitoK<sub>ATP</sub>) por diazóxido protege as células contra a morte celular induzida por MMA (Kowaltowski et al., 2006). A abertura do mitoK<sub>ATP</sub> resulta em decréscimo da produção mitocondrial de EROs (Facundo et al., 2005). Em adição, sob condições de privação energética, a abertura do mitoK<sub>ATP</sub> inibe a hidrólise mitocondrial de ATP pela ATP-sintase (Belisle e Kowaltowski, 2002; Kowaltowski et al., 2006), a qual ajuda a manter a razão ATP/ADP citosólica e também a limitar a captação mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , prevenindo a TPM indiretamente.

Embora os efeitos citotóxicos do MMA estejam documentados em culturas primárias ricas em neurônios e em linhagens celulares neuronais, o efeito tóxico do MMA em células gliais até o momento permanecia inexplorado.





## ***2. Objetivos***

## **2.1 Objetivo geral**

A acidemia metilmalônica é caracterizada pelo acúmulo de metilmalonato (MMA) nos tecidos e fluidos corpóreos. Há evidências relacionando o acúmulo deste metabólito com um comprometimento do metabolismo oxidativo mitocondrial, que implicaria por sua vez, na neurodegeneração que é observada nos pacientes. Deste modo, propusemos a caracterização do efeito de metilmalonato (MMA) na bioenergética mitocondrial para melhor entender o processo de disfunção mitocondrial que ocorre na acidemia metilmalônica, bem como sua importância na fisiopatologia desta doença.

## **2.2 Objetivos específicos:**

- a)** Caracterizar o efeito *in vitro* e *in vivo* de MMA na respiração de mitocôndrias isoladas de cérebro de rato.
- b)** Verificar a participação do MMA no comprometimento do metabolismo oxidativo neuronal em modelo constituído por tecido cerebral de rato.
- c)** Avaliar o efeito de MMA no metabolismo e viabilidade de linhagens de células neuronais e gliais.
- d)** Estudar o efeito de MMA na produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio.

### ***3. Materiais e Métodos***

**3.1 Reagentes** – A maioria dos produtos químicos, incluindo ADP, ácido  $\alpha$ -cetoglutarico, ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido L-glutâmico, ácido málico, ácido malônico, ácido metilmalônico, ácido pirúvico de sódio e ácido succínico foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). As soluções de ADP,  $\alpha$ -cetoglutarato, citrato, isocitrato, glutamato, malato, malonato, metilmalonato (MMA) e piruvato foram preparadas por dissolução dos respectivos ácidos em água e o pH foi ajustado para 7,2 com KOH. Para os tratamentos das células, o pH das soluções foi ajustado com NaOH. Para os tratamentos in vivo, soluções tamponadas de MMA foram preparadas dissolvendo-se o ácido em água e ajustando o pH para 7,4 com NaOH.

**3.2 Animais de experimentação** – Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)/UNICAMP, por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (protocolo nº 1142-1 de 2006). Ratos adultos da linhagem Wistar, fêmeas, pesando 250-300 g, foram utilizados para o isolamento de mitocôndrias. Para os experimentos de respiração utilizando fragmentos cerebrais, foram empregados ratos Wistar adultos machos. Os animais foram obtidos do biotério central da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), e foram alojados em gaiolas mantidas em sala climatizada a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo de 12 horas claro e escuro, com livre acesso a água e ração (Labina/Purina, Campinas, SP, Brasil).

**3.3 Isolamento das frações mitocondriais de cérebro de ratos** – Cérebros de dois animais foram rapidamente removidos (1 minuto), descartando-se cerebelo e medula. O tecido restante foi colocado num recipiente contendo 10 mL de meio de isolamento composto por manitol 225 mM, sacarose 75 mM, EGTA- $\text{K}^+$  1 mM, BSA 0,1% e HEPES- $\text{K}^+$

10 mM (pH 7,4). O tecido foi fragmentado em vários pedaços e extensivamente lavado para, em seguida, ser homogeneizado manualmente em homogeneizador tipo *Dounce* por aproximadamente 6 vezes com pistilo frouxo e 6 vezes com o pistilo apertado para provocar a lise celular e obtenção de uma suspensão homogênea. A suspensão foi centrifugada diferencialmente pelo método descrito por Rosenthal et al. (1987) com algumas modificações. Primeiramente, a suspensão foi centrifugada por 3 min a 2.000 *g* em rotor Beckman 25.50 JA (Beckman, Palo Alto, CA, USA) para precipitação de núcleos e resíduos celulares. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi novamente centrifugado por 8 minutos a 12.000 *g*. O sedimento resultante foi ressuspendido em 20 mL do mesmo meio com adição de 40  $\mu$ L de digitonina 10% e centrifugado durante 10 minutos a 12.000 *g*. O sobrenadante e o pellet mais externo e superior (parte clara) foram descartados e apenas o pellet central (escuro) foi ressuspendido em meio composto de manitol 225 mM, sacarose 75 mM e HEPES-K<sup>+</sup> 5 mM pH 7,2 e novamente centrifugado a 12.000 *g* por 10 min. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C. O sedimento foi ressuspendido no mesmo meio, ajustando-se a concentração de proteína para 30 - 40 mg/mL e mantido em banho de gelo.

**3.4 Determinação de proteína** – As concentrações de proteína das suspensões mitocondriais foram determinadas pelo método de Biureto (Gornall et al., 1949) na presença de colato 0,2%. O princípio do método baseia-se na formação de ligações peptídicas com íons cúpricos, em meio alcalino, dando origem a um complexo com tonalidade violeta, quantificado a 540 nm em espectrofotômetro. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada. Uma solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1% foi utilizada como padrão.

**3.5 Medida da respiração mitocondrial** – O consumo de oxigênio foi acompanhado polarograficamente em suspensões de mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) utilizando-se uma câmara com temperatura controlada, sob agitação magnética constante, acoplada a um eletrodo de oxigênio tipo Clark (Hansatech Instruments Ltd, Inglaterra). Considerou-se a solubilidade do oxigênio molecular ( $O_2$ ) em água como sendo de 200  $\mu\text{mol/L}$ , a 37°C e 1 atm (Robinson e Cooper, 1970). Os experimentos foram realizados em meio de reação padrão contendo KCl 130 mM, HEPES- $K^+$  10 mM (pH 7,2),  $K_2HPO_4$  2 mM,  $MgCl_2$  1 mM, EGTA 200  $\mu\text{M}$  e ADP 800  $\mu\text{M}$  em volume final de 1 mL. A qualidade das mitocôndrias (controle respiratório) foi testada pelo cálculo da razão entre as velocidades de consumo de  $O_2$  nos estados de fosforilação oxidativa (V3) e repouso (V4). A suspensão mitocondrial foi considerada adequada para o uso quando esta razão foi superior a 5,0 utilizando malato e glutamato como substratos respiratórios.

**3.6 Medida do transporte mitocondrial de dicarboxilatos utilizando sais de potássio** – O transporte de succinato foi estimado em suspensão mitocondrial de cérebro de rato (0,4 mg/mL) utilizando meio de reação contendo EGTA 0,1 mM ( $K^+$ ), EDTA 0,1 mM, MOPS 5 mM (pH 7,4), antimicina A 200  $\eta\text{M}$ , nigericina 0,7  $\mu\text{M}$  e substratos 36,7 mM ( $K^+$ ), com osmolaridade de aproximadamente 110 mOsm, a 37 °C. Foi utilizado um fluorímetro modelo F-4010 Hitachi spectrofluorometer (Hitachi Ltd, Tokyo, Japão) operando em comprimento de onda 540 nm para excitação e emissão. A metodologia é baseada na diminuição do espalhamento de luz devido ao inchamento mitocondrial que acompanha o transporte de sais para dentro das organelas (Liu et al., 1996) e o estímulo do inchamento mitocondrial por  $HPO_4^{2-}$  2 mM reflete a atividade do carreador de dicarboxilatos. As velocidades de inchamento mitocondrial entre 5 e 35 segundos, após adição de  $HPO_4^{2-}$ , foram utilizadas para quantificar as medidas.

### **3.7 Medida do transporte mitocondrial de dicarboxilatos utilizando sais de**

**amônio** – O transporte de succinato utilizando sais de amônio foi estimado em suspensão mitocondrial de cérebro de rato (0,4 mg/mL) em meio de reação contendo Tris 20 mM, EGTA 1 mM (pH 7,4), substratos ( $\text{NH}_4^+$ ) 100 mM e antimicina A 2  $\mu\text{M}$  a 30°C (Halperin et al., 1971). O inchamento mitocondrial foi estimado em fluorímetro operando em comprimento de onda 540 nm para excitação e emissão.

### **3.8 Medida do transporte mitocondrial de glutamato**

– A metodologia que utiliza sais de amônio também foi empregada na avaliação do transporte mitocondrial de glutamato, a 37 °C. A estimativa foi realizada na presença de antimicina A 2  $\mu\text{M}$  e rotenona 2,5  $\mu\text{M}$ , sem adição de fosfato inorgânico. A concentração protéica utilizada foi de 0,1 mg/mL para mitocôndrias de cérebro e fígado.

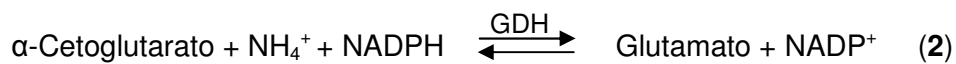
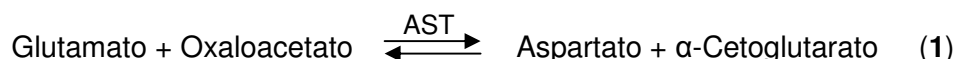
### **3.9 Medida da atividade da glutamato desidrogenase**

– A reação de conversão de glutamato e  $\text{NAD}^+$  a  $\alpha$ -cetoglutarato,  $\text{NH}_4^+$  e NADH, catalisada pela glutamato desidrogenase foi acompanhada medindo-se fluorimetricamente o NADH produzido em comprimentos de onda 340 e 460 nm, para excitação e emissão, respectivamente (Zhang et al., 2004). A suspensão mitocondrial (0,15 mg/mL) foi incubada a 37 °C em meio de reação padrão (pH 7,2), contendo triton X-100 0,1%, ADP 250  $\mu\text{M}$ ,  $\text{NAD}^+$  1 mM e concentrações crescentes de glutamato (0,3; 1; 3 e 10 mM) na ausência ou presença de concentrações variáveis de MMA (1-10 mM).

### **3.10 Medida da atividade da aspartato transaminase (AST)**

– A reação de conversão de glutamato e oxaloacetato em aspartato e  $\alpha$ -cetoglutarato catalisada pela AST (1), foi acompanhada no sentido da formação destes últimos através de uma metodologia acoplada a atividade da glutamato desidrogenase (2) (Dennis et al., 1976; Cheeseman e Clarck, 1988). Mitocôndrias de cérebro de rato (0,25 mg/mL) foram

incubadas a 37 °C em meio de reação composto por K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM (pH 7,4) contendo triton X-100 0,17%, glutamato 2 mM, oxaloacetato 1 mM, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, NADPH 100 µM e glutamato desidrogenase purificada 4 U/mL na ausência ou presença de concentrações variáveis de MMA (1-10 mM). O consumo de NADPH durante a reação, representado pelo correspondente decréscimo na fluorescência foi acompanhado utilizando-se comprimentos de onda 340 e 460 nm para excitação e emissão, respectivamente.



### **3.11 Medida da atividade do complexo $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase –**

Mitocôndrias de cérebro de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio de reação composto por K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM (pH 7,35), contendo pirofosfato de tiamina 0,2 mM, DTT 0,3 mM, EGTA 100 µM, coenzima A-SH 50 µM, triton X-100 0.1%, antimicina A 1 µM, rotenona 2.5 µM,  $\alpha$ -cetogluturato 250 µM, NAD<sup>+</sup> 2 mM, e diferentes concentrações de MMA (0; 1; 5 e 10 mM) a 37 °C. A reação de conversão de  $\alpha$ -cetogluturato, NAD<sup>+</sup> e coenzima A em succinil-CoA, NADH e CO<sub>2</sub>, catalisada pelo complexo  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase foi acompanhada medindo-se fluorimetricamente o NADH produzido em comprimentos de onda 340 e 466 nm, para excitação e emissão, respectivamente.

### **3.12 Medida da atividade do complexo piruvato desidrogenase –**

O ensaio enzimático da conversão de piruvato em acetil-CoA foi realizado utilizando-se o mesmo meio de reação e parâmetros descritos para a medida da atividade da  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase. Foram incubadas diferentes concentrações de piruvato (25, 50, 100 e 250



$\mu\text{M}$ ), e de MMA (0; 1; 5 e 10 mM), na presença de piruvato desidrogenase purificada na concentração de 32,25  $\mu\text{g/mL}$ , além de  $\text{NAD}^+$  2 mM, a 37 °C.

**3.13 Medida do efluxo mitocondrial de  $\alpha$ -cetoglutarato por meio do transportador de  $\alpha$ -cetoglutarato (OGC)** – O transporte de  $\alpha$ -cetoglutarato foi estimado em suspensão mitocondrial de cérebro de rato (0,5 mg/mL), a 37 °C utilizando meio de reação composto por manitol 75 mM, sacarose 25 mM, fosfato de potássio 5 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 0,5 mM, KCl 100 mM, BSA 0,1% (pH 7,4), sulfato de amônio 3 mM, ADP 0,5 mM, GDH purificada 10 U/mL, NADH 66  $\mu\text{M}$  e glutamato 3 mM, na presença ou ausência de malato 0,5 mM, MMA 0,5 mM ou da própria GDH. Foi utilizado um fluorímetro modelo F-4010 Hitachi (Hitachi Ltd, Tokyo, Japão) operando em comprimento de onda 340 nm para excitação e 465 para emissão. A metodologia (Contreras e Satrústegui, 2009) é baseada na diminuição da fluorescência do NADH devido à sua conversão em  $\text{NAD}^+$  não-fluorescente. Ao entrar na mitocôndria via trocador glutamato/aspartato (AGC), o glutamato é prontamente convertido em  $\alpha$ -cetoglutarato pela aspartato transaminase (AST) e deixa a mitocôndria via transportador de  $\alpha$ -cetoglutarato (OGC). O  $\alpha$ -cetoglutarato transportado para fora da mitocôndria é reconvertido em glutamato pela glutamato desidrogenase exógena (GDH), com consumo de NADH, permitindo a quantificação do transporte de  $\alpha$ -cetoglutarato.

**3.14 Preparo de amostras de conteúdo intramitocondrial para avaliação do acúmulo intramitocondrial de MMA** – O preparo das amostras consistiu na incubação de 2 mg/mL de mitocôndrias de cérebro de rato em meio de reação padrão na presença de substratos endógenos ou dos substratos exógenos, glutamato 3 mM e  $\alpha$ -cetoglutarato 1,5 mM separadamente, na presença de MMA 2 mM por aproximadamente 8 minutos. ADP 800  $\mu\text{M}$  foi adicionado para estimular a respiração pela fosforilação oxidativa.

Imediatamente após o consumo de oxigênio, a suspensão mitocondrial foi centrifugada a 20.800 *g* por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o sedimento foi lavado com meio de reação padrão (1x), para em seguida ser ressuspendido em 200  $\mu$ L de solução hipotônica constituída por HEPES 10 mM (pH 7,2). Posteriormente, a suspensão mitocondrial foi congelada/descongelada em nitrogênio líquido (4x) para promover a lise mitocondrial. A amostra foi centrifugada mais uma vez a 20.800 *g* por 5 minutos, o sedimento resultante foi desprezado e o sobrenadante, correspondente ao conteúdo intramitocondrial foi estocado a -80 °C até o momento da estimativa do acúmulo intramitocondrial de MMA. A metodologia de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (CL-EM/EM) foi empregada para detecção e quantificação de metilmalonato, posteriormente à extração alquilativa do analito, de acordo com Carvalho e Kok (2008), no Instituto Fleury – Medicina e Saúde.

**3.15 Tratamento crônico de ratos jovens com MMA** – Dois grupos de ratos com idade de cinco dias, cada grupo com 6 animais, foram colocados em gaiolas separadas, juntamente com suas respectivas mães. Um dos grupos recebeu administração intraperitoneal de MMA (pH 7,4), duas vezes ao dia com intervalo de 8 horas, durante 16 dias. O MMA foi administrado em concentrações crescentes de acordo com a idade do animal para se alcançar concentrações plasmáticas de 2-2,5 mM (Dutra et al., 1991). Nos 8 primeiros dias de tratamento, os animais foram injetados com um volume de 9  $\mu$ L/g do animal (0,72  $\mu$ mol MMA/g) de solução MMA 1%. Nos cinco dias seguintes de tratamento eles foram injetados com 8  $\mu$ L/g (0,89  $\mu$ mol MMA/g) de solução MMA 1,5% e nos três últimos dias foram injetados com 11  $\mu$ L/g (1,67  $\mu$ mol MMA/g) de solução MMA 2%. O grupo controle foi injetado com solução salina (NaCl 0,9%) nos volumes equivalentes aos do grupo tratado. No dia seguinte ao último dia de tratamento (21º dia de

vida), após 16h da última administração de MMA, os animais foram sacrificados para o isolamento de mitocôndrias de cérebro.

**3.16 Medida da atividade de citrato sintase** – A reação de conversão de oxaloacetato e acetil-CoA a citrato e SH-CoA, catalisada pela citrato sintase foi acompanhada medindo-se espectrofotometricamente o produto de reação, ácido tionitrobenzóico (TNB) (Shepherd e Garland, 1969). As diferentes suspensões foram incubadas a 37°C em meio de reação tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo triton X-100 0,1%, oxaloacetato 250 µM, acetil-CoA 50 µM, e ácido ditionitrobenzóico (DTNB) 100 µM. O intenso aumento na absorbância a 412 nm foi registrado durante 8 minutos.

**3.17 Medida do consumo de O<sub>2</sub> por fragmentos de tecido** – O consumo de oxigênio por fragmentos de cérebro de rato foi estimado em oxígrafo de alta resolução (Oroboros Oxygraph-2K). Fragmentos de cérebro (1 mm<sup>3</sup>) obtidos empregando-se um fatiador de tecidos (McIlwain, Inglaterra) foram mantidos em banho de gelo em meio composto por solução balanceada de Hank e HEPES 20 mM, previamente à incubação do tecido (3 mg/mL) a 37°C, sob agitação de 200 rpm no aparelho. Após 10 min do início do experimento, MMA 10 mM foi adicionado a uma das cubas e, ao longo do período de 100 min, o consumo de oxigênio foi determinado simultaneamente nas amostras controle e tratada com MMA. A fração de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória mitocondrial foi estimada pela sensibilidade ao inibidor do complexo III, antimicina A. Para aquisição e análise dos dados foi empregado o software DatLab 4 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria).

**3.18 Cultura de células PC12** – As células PC12, derivadas de feocromocitoma de rato foram continuamente mantidas a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5% em frascos de cultura de 150 cm<sup>2</sup> de superfície em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (4,5 g/L de

glicose), suplementado com 10% de soro eqüino, 5% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). A manutenção das células foi realizada a cada dois dias por meio da passagem das células ( $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) para novas garrafas. As células aderidas foram previamente lavadas com PBS e em seguida foi utilizada uma solução de tripsina/EDTA 50 µg/cm<sup>2</sup> a 37°C para dissociar as células da superfície. A ação da tripsina foi inativada pela adição de meio DMEM suplementado. A passagem das células para novas garrafas foi realizada após a centrifugação da suspensão a 2.800 g por 3 min e ressuspensão do sedimento resultante em 5 mL de DMEM suplementado.

**3.19 Medida da viabilidade celular por azul de Tripan** – Primeiramente foi realizado o plaqueamento das células PC12 (100.000 células/cm<sup>2</sup>) em placas individuais de 9,2 cm<sup>2</sup> e estas foram mantidas em DMEM suplementado a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5% durante 24h para aderência das células na superfície das placas. Posteriormente, este meio foi substituído por DMEM suplementado apenas com HEPES 20 mM (pH 7,2) na ausência ou presença de MMA 10 mM, e as células permaneceram incubadas a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5% durante 3, 7, 15 e 24h. Posteriormente, as células foram ressuspensas e a estimativa da viabilidade celular foi realizada por meio da contagem das células em câmara de *Neubauer* após a diluição da suspensão celular em azul de tripan 0,1% em PBS.

**3.20 Determinação do potencial de membrana mitocondrial em células PC12 intactas** – As células PC12 ( $0,5 \times 10^6$  /mL) mantidas em placas de 9,2 cm<sup>2</sup> foram incubadas em meio DMEM suplementado com HEPES 20 mM (pH 7,2) na ausência ou presença de MMA 10 mM durante 15 horas a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5%. Posteriormente, as células ( $1 \times 10^6$  /mL) foram incubadas em 400 µL de meio contendo DiOC<sub>6</sub>(3) 3 nM e 80 U/mL de DNase na ausência ou presença de oligomicina 2 µg/mL; CCCP 50 µM ou

oligomicina juntamente com CCCP nas situações controle e tratada com MMA 10 mM. As suspensões celulares foram mantidas sob agitação constante, a 25°C e protegidas da luz durante 40 minutos. Após a incubação, a positividade das células para o marcador DiOC<sub>6</sub>(3) foi imediatamente analisada por meio da leitura da fluorescência do composto no canal FL-1 de um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) coletando-se 40.000 eventos de cada tubo, em duplicata (Rottenberg e Wu, 1998). Os dados resultantes foram normalizados utilizando-se o software CellQuest Pro software.

**3.21 Determinação do potencial de membrana mitocondrial em células PC12 permeabilizadas** – Células PC12 ( $1 \times 10^6$  /mL) mantidas em placas de 22,1 cm<sup>2</sup> foram incubadas em meio DMEM suplementado com HEPES 20 mM (pH 7,2) em situações controle e tratada com MMA 10 mM durante 7 horas. Após a incubação, as suspensões celulares foram centrifugadas a 1.500 g durante 3 minutos, seguindo-se a substituição do meio de manutenção celular por 1 mL do meio de reação livre de K<sup>+</sup> constituído por sacarose 250 mM, EGTA 200 µM, BSA 1 mg/mL, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM e HEPES-Na<sup>+</sup> 10 mM (pH 7,2) após lavagem do pellet (1x). As células foram então incubadas com digitonina 40 µM, a 28°C durante 5 minutos. A digitonina foi utilizada para permeabilizar seletivamente a membrana plasmática. Em seguida, para a remoção do K<sup>+</sup> liberado pela permeabilização celular, as células foram centrifugadas novamente, o pellet foi lavado com meio de reação (1x) e ressuspensionado em 50 µL do mesmo. Para os experimentos de estabelecimento do método para determinação do potencial de membrana mitocondrial em células PC12 permeabilizadas, foram empregadas diferentes concentrações celulares (0,5; 1; 4 e  $12 \times 10^6$  células/mL) durante as medidas de fluorescência de safranina. Posteriormente, para os experimentos na presença de MMA, a concentração ideal de células encontrada ( $4 \times 10^6$  /mL) foi incubada a 28°C em 1,7 mL de meio de reação na presença de safranina 5 µM, digitonina 40 µM e de coquetel de substratos para o

complexo I (malato 3,4 mM, glutamato 2,1 mM, piruvato 2,1 mM e  $\alpha$ -cetoglutarato 1,86 mM) totalizando 9,46 mM. Durante o experimento, valinomicina 40 ng/mL,  $K^+$  (3 adições de 375  $\mu$ M, 4 adições de 500  $\mu$ M e 3 adições de 1,5 mM) e FCCP 1  $\mu$ M foram adicionados ao meio de reação. As medidas foram realizadas em fluorímetro (Hitachi F-4010, Tokyo, Japan) equipado com agitação magnética constante e operando em comprimentos de onda de 495 e 586 nm para excitação e emissão, respectivamente (Åkerman and Wikström, 1976) e slits de 5 nm para excitação e emissão.

**3.22 Medida do consumo de  $O_2$  por células PC12 intactas** – Células PC12 ( $1 \times 10^6$ /mL) mantidas em placas de 22,1 cm<sup>2</sup> foram incubadas em meio DMEM suplementado com HEPES 20 mM (pH 7,2) na ausência ou presença de MMA 10 mM durante 7 horas. Após o tratamento, as suspensões celulares foram centrifugadas a 1.500 g durante 3 minutos, seguindo-se a substituição do meio de manutenção celular por 1 mL de meio de reação (mesmo meio utilizado para a determinação do potencial de membrana) para lavagem (1x) do pellet, que foi em seguida ressuspensionado em 50  $\mu$ L do meio. Posteriormente, o consumo de oxigênio foi monitorado em oxígrafo de alta resolução (Oroboros Oxygraph-2K). As células ( $4 \times 10^6$ /mL) foram incubadas em câmara fechada, contendo 2 mL de meio de reação, a 37°C sob agitação de 200 rpm, na presença de coquetel de substratos para o complexo I. Após a respiração basal, foi adicionada 1  $\mu$ g/mL de oligomicina, seguida pela adição de FCCP 20 nM após 5 min para estimular ao máximo o fluxo de oxigênio. O software DatLab 4 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) foi empregado para aquisição e análise dos dados.

**3.23 Medida do consumo de  $O_2$  por células PC12 permeabilizadas** – Células PC12 ( $1 \times 10^6$ /mL) mantidas e preparadas de acordo com os mesmos parâmetros utilizados para o preparo das amostras para os experimentos de potencial de membrana.

O consumo de oxigênio foi monitorado em oxígrafo de alta resolução (Oroboros Oxygraph-2K). Após tratamento das células nas mesmas condições realizadas para os experimentos de potencial de membrana, estas foram incubadas em câmara fechada, contendo 2 mL de meio de reação na presença de coquetel de substratos para o complexo I e digitonina 40  $\mu\text{M}$ . ADP 400  $\mu\text{M}$  foi adicionado aos 15 minutos do experimento para estimular a respiração pela fosforilação oxidativa e FCCP 80  $\eta\text{M}$  no tempo de 25 minutos, para estimular ao máximo o fluxo de oxigênio. O software DatLab 4 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) foi empregado para aquisição e análise dos dados.

**3.24 Cultura de células U-87MG** – As células U-87MG, derivadas de glioblastoma humano foram continuamente mantidas a 37 °C e  $\text{CO}_2$  a 5% em frascos de cultura de 150  $\text{cm}^2$  de superfície em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (2 g/L de glicose), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina). A manutenção das células foi realizada a cada dois dias por meio da passagem das células ( $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) para novas garrafas. As células aderidas foram previamente lavadas com PBS e em seguida foi utilizada uma solução de tripsina/EDTA 50  $\mu\text{g/cm}^2$  a 37°C para dissociar as células. A ação da tripsina foi inativada pela adição de meio DMEM suplementado. A passagem das células para novas garrafas foi realizada após a centrifugação da suspensão a 2.800  $g$  por 3 min e ressuspensão do pellet resultante em 5 mL de DMEM suplementado.

**3.25 Medida da viabilidade celular por MTT** – Primeiramente foi realizado o plaqueamento das células PC12 ( $5 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ ) em placas individuais de 9,2  $\text{cm}^2$  e estas foram mantidas em DMEM suplementado a 37°C e  $\text{CO}_2$  a 5% durante 24h para aderência das células na superfície das placas. Posteriormente, este meio foi renovado e,

ainda, suplementado com HEPES 20 mM (pH 7,2) na ausência ou presença de MMA 10 mM, e as células permaneceram incubadas a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5% durante 3, 24 e 48h. Posteriormente, as células foram lavadas em PBS 1X e foi adicionado 1 mL da solução de MTT 2,98 mM. Após 90 min, 1 mL da solução ácida SDS 10% - HCl 10 mM foi adicionado para solubilização dos cristais de formazan. A viabilidade celular foi determinada pela leitura da absorbância em leitor de placas operando em comprimento de onda 570 nm.

**3.26 Cultura primária de astrócitos** – A cultura primária de astrócitos foi obtida a partir de ratos Wistar com idade de 2 dias, utilizando o método de Mecha et al. (2011), com modificações. Primeiramente os neonatos foram higienizados com etanol 70% e em seguida decapitados dentro do fluxo laminar. Utilizando materiais esterilizados, os cérebros foram dissecados em DMEM sem fenol suplementado com 1% de antibiótico. O cerebelo, tronco encefálico e bulbos foram descartados, assim como as meninges. Em seguida, o tecido foi picotado, tratado com tripsina 30 µM e incubado a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> para dissociação. Após 20 min, DMEM suplementado foi adicionado para inativação da tripsina na presença de 1 mg/mL de DNase. O tecido foi então dissociado mecanicamente com pipeta sorológica previamente revestida com soro fetal bovino, e o homogenato celular resultante foi filtrado em malha de 100 µm para retirada de resíduos celulares. Na sequência, a suspensão foi centrifugada a 1.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi novamente centrifugado em solução de BSA 4% para impedir contaminação por bactérias. Finalmente, o pellet foi ressuspensionado em DMEM suplementado e mantido em garrafas com superfície de 75 cm<sup>2</sup> próprias para culturas celulares primárias. Após três dias, as garrafas foram mantidas sob agitação constante de 240 rpm, durante 6h para descolamento dos oligodendrócitos e outros tipos celulares. Após este período, as garrafas foram extensamente lavadas com PBS e os astrócitos que permaneceram aderidos passaram pelo procedimento usual de manutenção das culturas



celulares e permaneceram viáveis por até 4 passagens. Para confirmar a predominância dos astrócitos na cultura primária foi realizada a imunohistoquímica para avaliar a imureatividade das células à proteína glial fibrilar ácida (GFAP).

**3.27 Imagens da cultura primária de astrócitos** – As fotomicrografias das células primária de astrócitos foram capturadas através de microscópio Leica DMLB operando com sistema digital de imagem Leica DC 300F acoplado ao software de aquisição “Image Manager 50 1.2” (Leica Microsystems, Bannockburn, IL). Para captura das fotos foi empregado o modo de contraste de fase óptico. As imagens foram previamente analisadas utilizando-se o Software MetaFluor Fluorescence 4.6.5 (Universal Imaging, Downingtown, PA) e posteriormente a área dos astrócitos foi calculada pelo uso do software ImageJ (NIH, USA).

**3.28 Medida da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em mitocôndrias isoladas** – A produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial foi estimada seguindo-se a reação de formação do composto fluorescente resorufin a partir do marcador não-fluorescente Amplex Red 10  $\mu$ M na presença de 1 U/mL de HRP (peroxidase de raiz forte, tipo VI-A) (Zhou et al., 1997). A medida da produção de EROs foi acompanhada em suspensões de mitocôndrias isoladas de cérebro de rato, utilizando-se um fluorímetro modelo F-4010 Hitachi spectrofluorometer (Hitachi Ltd, Tokyo, Japão), com temperatura controlada de 37°C, sob agitação magnética constante, operando em comprimentos de onda de 566 nm para excitação e 587 nm para emissão. Os experimentos foram realizados em meio de reação padrão contendo KCl 130 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM (pH 7,2), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 200  $\mu$ M em volume final de 2 mL.

**3.29 Medidas da produção de EROs por células PC12 em suspensão** – Após tratamento com MMA, a produção de espécies reativas foi medida em células PC12 em suspensão. Foi utilizado meio de reação constituído por solução salina balanceada de Hank (HBSS) e HEPES 20 mM (pH 7,2), no qual as células (plaqueamento inicial de 100.000 células/cm<sup>2</sup>) de cada placa de 9,2 cm<sup>2</sup> foram ressuspensas para o volume final de 2 mL. Os experimentos foram conduzidos a 37°C, sob agitação magnética constante, utilizando-se um fluorímetro modelo F-4010 Hitachi (Hitachi Ltd, Tokyo, Japão), operando em comprimentos de onda de 566 nm para excitação e 587 nm para emissão no caso do marcador não-fluorescente Amplex Red 10 µM na presença de 1 U/mL de HRP (peroxidase de raiz forte, tipo VI-A). Para o 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA) 5 µM, foram empregados os comprimentos de onda de 488 e 525 nm para excitação e emissão, respectivamente, e para a dihidroetidina (DHE) 5 µM, foram utilizados os seguintes comprimentos: 470 nm para excitação e 590 nm para emissão.

**3.30 Análise estatística** – Os dados experimentais foram analisados utilizando-se os softwares GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA) e OriginPro versão 8.0. A média dos valores  $\pm$  erro padrão da média (média  $\pm$  e.p.m) foram submetidos à análise de variância simples (ANOVA), seguida por teste Tukey, quando realizadas comparações múltiplas. Quando um único parâmetro foi comparado entre dois grupos diferentes, o teste *t* Student foi empregado. Os dados estão representados como a média  $\pm$  erro padrão ( $\pm$  SEM) de pelo menos quatro experimentos independentes.  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  foram considerados significativos.

#### ***4. Resultados e Discussão***

O metilmalonato (MMA) é possivelmente o principal metabólito acumulado na acidemia metilmalônica (Fenton et al., 2001). De acordo com a literatura, ele estaria associado à inibição de enzimas mitocondriais (Dutra et al., 1993; Brusque et al., 2002; Okun et al., 2002; Schuck et al., 2004), levando a uma diminuição na produção de CO<sub>2</sub> (Wajner et al., 1992) e dos níveis de ATP (McLaughlin et al., 1998), além de uma maior produção de lactato *ex vivo* e *in vitro* (Wajner et al., 1992; Royes et al., 2003). Isto evidencia claramente um comprometimento da função mitocondrial na acidemia metilmalônica. De fato, foi previamente descrito, inclusive pelo nosso grupo, o efeito inibitório de concentrações milimolares de MMA no consumo de oxigênio mitocondrial mantido por succinato (Toyoshima et al., 1995; Maciel et al., 2004; Kowaltowski et al., 2006). Tais resultados serviram de base para este estudo sobre o efeito de MMA no metabolismo oxidativo mitocondrial.

#### **4.1. Efeito de MMA na bioenergética mitocondrial: avaliação da respiração mitocondrial na presença de diferentes substratos**

Primeiramente, avaliou-se a respiração mitocondrial num modelo *in vitro* constituído por mitocôndrias isoladas de cérebro de rato, na presença de diferentes substratos respiratórios para os complexos I e II da cadeia respiratória. Estes substratos foram empregados isoladamente ou combinados, na presença ou ausência de concentrações crescentes de MMA (1-10 mM). Todos os experimentos foram conduzidos na presença de ADP 800 µM, para se obter estímulo da respiração pela fosforilação oxidativa. Os **painéis 2a** e **2b** mostram respectivamente as velocidades absolutas e relativas de consumo de oxigênio nas diferentes condições propostas. Nota-se que o MMA inibiu fortemente a respiração mantida por glutamato, enquanto apresentou um efeito inibitório mais sutil quando utilizados malato, ou glutamato juntamente com malato

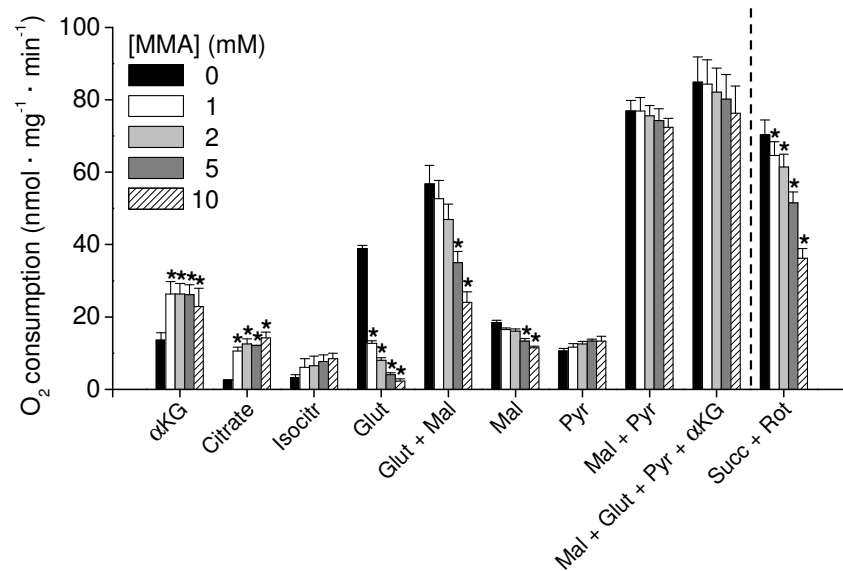
como substratos. Em adição, o MMA também inibiu significativamente a respiração mitocondrial mantida por succinato, atingindo em torno de 45% de inibição quando utilizado MMA 10 mM (**Fig 2b**). O estudo dos mecanismos envolvidos no efeito inibitório de MMA na respiração mantida por glutamato ou succinato será apresentado nos próximos tópicos de Resultados e Discussão desta Tese. O MMA não apresentou efeito inibitório algum na respiração mitocondrial quando o TMPD foi utilizado como substrato respiratório para o complexo IV, na presença de ascorbato e antimicina A (resultado não mostrado). O mesmo ocorreu quando um coquetel de substratos para o complexo I (malato, glutamato, piruvato e  $\alpha$ -cetoglutarato) foi utilizado como doador de elétrons.

A ausência de qualquer efeito do MMA na respiração mitocondrial mantida pelo coquetel de substratos para o complexo I da cadeia respiratória indica que o efeito inibitório do MMA no consumo de oxigênio sob certas condições está relacionado a defeitos que antecedem os complexos da cadeia respiratória, como inibição da atividade de enzimas do ciclo do ácido cítrico ou do transporte mitocondrial de substratos.

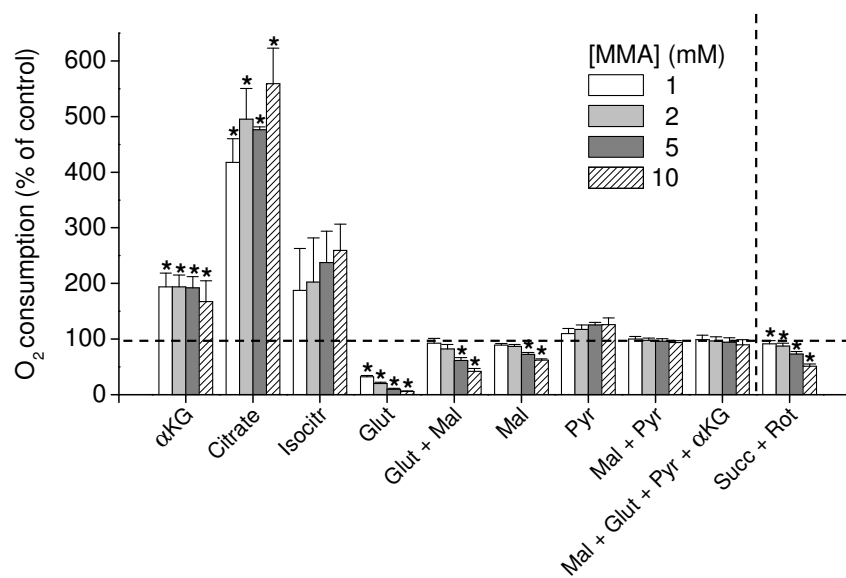
Os resultados da **figura 2a** mostram também que, na presença de outros substratos para o complexo I, como  $\alpha$ -cetoglutarato e citrato, o MMA estimulou o consumo de  $O_2$ . Nota-se que tal efeito foi acentuado, ultrapassando 300% em relação ao respectivo controle, quando utilizado citrato juntamente com a mínima concentração (1 mM) de MMA (**Fig 2b**). Os efeitos estimulatórios de MMA no consumo mitocondrial de oxigênio estão provavelmente associados com o influxo mitocondrial de substratos promovido pelo MMA. De acordo com Halperin et al. (1971), o MMA pode ser transportado pelos três diferentes sistemas mitocondriais existentes para o transporte de malato: os transportadores de dicarboxilatos, tricarboxilatos e de  $\alpha$ -cetoglutarato. O MMA pode entrar na mitocôndria pelo transportador de dicarboxilatos em troca de fosfato e pode sair em troca de  $\alpha$ -

cetoglutarato ou citrato, o que pode explicar o efeito estimulatório de MMA na respiração mantida por estes substratos.

**a**



**b**



**Fig. 2 - Efeito de MMA no consumo de oxigênio por mitocôndrias de cérebro.**

Mitocôndrias isoladas de cérebro total de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas a 37 °C em meio de reação padrão (KCl 130 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 200 µM, pH 7,2) contendo diferentes substratos do complexo I [ $\alpha$ -cetogluturato, citrato, isocitrato, glutamato, malato ou piruvato ( $\alpha$ KG, Citrate, Isocitr, Glut, Mal ou Pyr)]; 5 mM de cada. Estes substratos estiveram presentes na concentração de 5 mM quando isolados, ou em concentrações equimolares quando associados a outros, totalizando 5 mM. Outros experimentos foram realizados na presença de succinato 5 mM + rotenona 2 µM (Succ + Rot). Todos os ensaios foram conduzidos na presença de ADP 800 µM. **Painel a:** Valores absolutos de consumo de oxigênio na presença de diferentes substratos da cadeia respiratória e concentrações variáveis de MMA (1-10 mM), como indicado na figura. **Painel b:** Velocidades relativas de consumo de O<sub>2</sub>. Dados mostrados como porcentagens de suas respectivas velocidades na ausência de MMA. Dados dos **painéis a e b** representam a média  $\pm$  S.E.M. de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em duplicata. \*Significativamente diferente de seu respectivo controle, p<0,01.

#### **4.2. Caracterização da inibição do metabolismo oxidativo mitocondrial de succinato por MMA**

Até recentemente, o MMA era tido como inibidor competitivo da atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) em cérebro e fígado de rato, provavelmente devido à sua semelhança estrutural com malonato (MA), inibidor clássico da SDH e análogo estrutural do succinato, substrato da enzima (Dutra et al., 1993; Toyoshima et al., 1995; Brusque et al., 2002; Marisco et al., 2003; Fleck et al., 2004; Pettenuzzo et al., 2006). Entretanto, algumas publicações (Okun et al., 2002; Kolker et al., 2003; Mirandola, Melo et al., 2008) mostram que, em concentrações milimolares, o MMA não inibe a atividade da SDH em partículas submitocondriais invertidas. Além disso, Halperin et al. (1971) já haviam descrito o MMA como inibidor do efluxo mitocondrial do dicarboxilato malato. De acordo com estas evidências, hipotetizamos que o efeito inibitório de MMA, encontrado em nossos resultados de respiração mantida por succinato, seria causado pela inibição do transporte deste substrato através do carreador de dicarboxilatos presente na membrana mitocondrial interna.

Para estudarmos se o MMA inibiria o transporte mitocondrial de succinato através do carreador de dicarboxilatos, foram realizados experimentos de inchamento mitocondrial em meio hiposmótico, de acordo com dois protocolos diferentes: um baseado na incubação de mitocôndrias na presença de sais de potássio e nigericina, ionóforo que permite a troca entre  $K^+$  e  $H^+$  (Liu et al., 1996), e outro em sais de amônio (Halperin et al., 1971). Sob estas condições experimentais, a adição de fosfato inorgânico ( $HPO_4^{2-}$ ) promove o transporte de dicarboxilatos para dentro da matriz mitocondrial, ocasionando o inchamento mitocondrial.



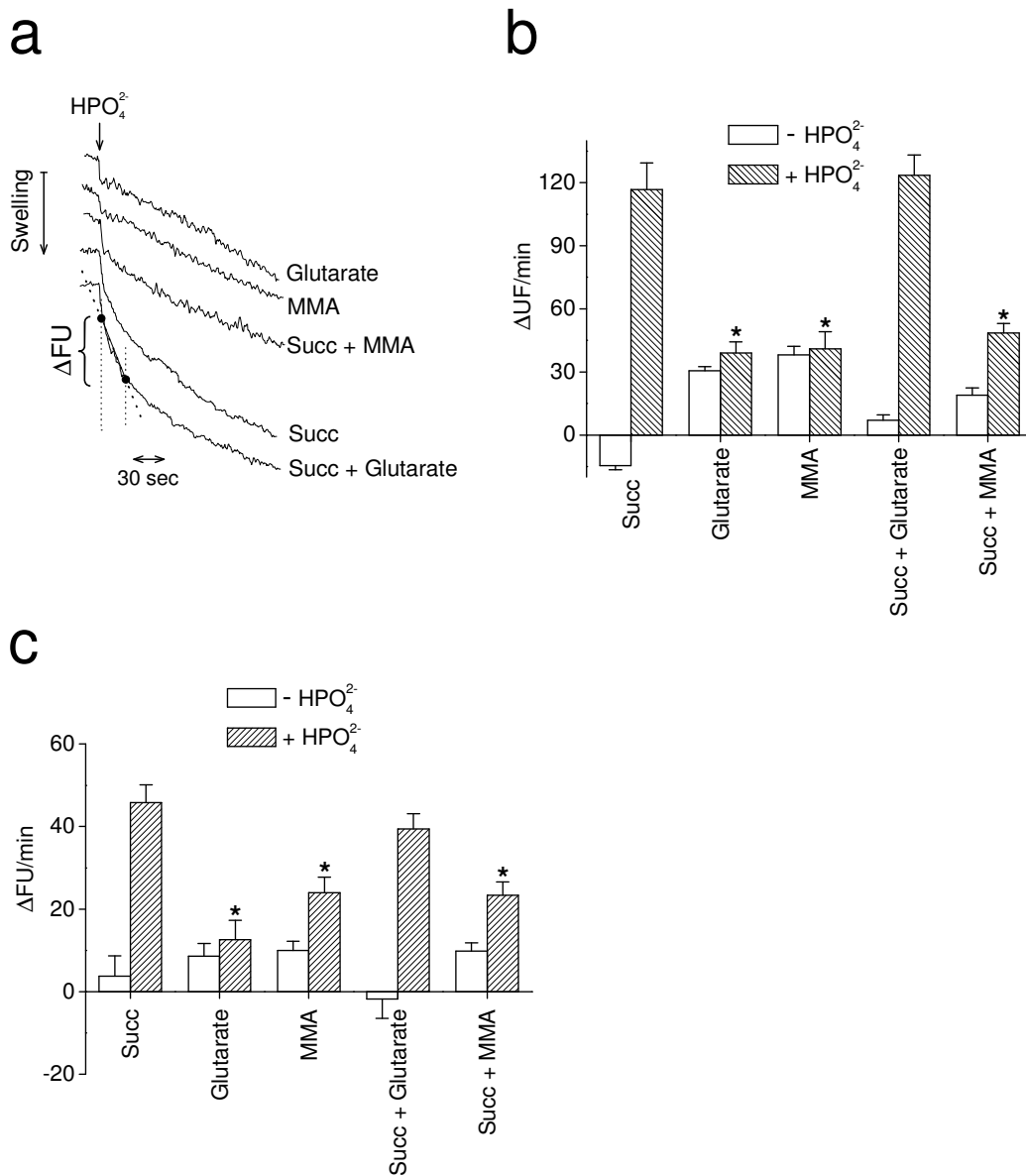
A **figura 3a** representa o monitoramento da diminuição no espalhamento de luz, correspondendo ao inchamento mitocondrial. Conforme ocorre o influxo mitocondrial dos dicarboxilatos com formação de sais dentro da mitocôndria, a entrada de água tende a acompanhar o transporte, causando o inchamento mitocondrial. Um significativo inchamento foi promovido pela adição de  $\text{HPO}_4^{2-}$  à suspensão mitocondrial incubada com succinato (**Fig 3b**). Entretanto, quando succinato esteve presente juntamente com MMA, o inchamento induzido por  $\text{HPO}_4^{2-}$  foi inibido quase completamente.

O substrato glutarato, que não é transportado pelo carreador de dicarboxilatos, foi empregado como ânion controle, e não inibiu o inchamento mitocondrial quando presente juntamente com succinato. As velocidades de inchamento mitocondrial utilizando substratos na forma de sais de amônio (**Fig 3c**) confirmaram a ação inibitória do MMA no transporte mitocondrial de succinato. Nota-se ainda que a adição de  $\text{HPO}_4^{2-}$  às mitocôndrias incubadas em presença de MMA, causou um pequeno estímulo do inchamento mitocondrial (**Fig 3c**), indicando que o MMA pode ser transportado pelo transportador de dicarboxilatos.

Estes resultados (**Figs 2 e 3**) indicam que o MMA inibe o consumo mitocondrial de oxigênio mantido pela oxidação de succinato por inibir a captação mitocondrial deste substrato através da membrana mitocondrial interna, provavelmente por competir com o transporte de succinato pelo carreador de dicarboxilatos.

Estes resultados, sobre a caracterização do MMA como um inibidor do transporte mitocondrial, fazem parte do artigo ***“Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake”***, de autoria de S.R. Mirandola, D.R. Melo, P.F. Schuck, G.C. Ferreira, M. Wajner e R.F. Castilho,

publicado na revista *Journal of Inherited Metabolic Disease* (volume 31, páginas 44-54, 2008).



**Fig. 3 - Efeito inibitório de MMA no transporte mitocondrial de succinato pelo carreador de dicarboxilatos.**

Para os experimentos dos painéis a e b, mitocôndrias de cérebro total de rato (0,4 mg/mL) foram incubadas a 37 °C em meio de reação contendo EGTA-K<sup>+</sup> 0,1 mM, EDTA-K<sup>+</sup> 0,1 mM, MOPS-K<sup>+</sup> 5 mM (pH 7,0), antimicina A 0,2 mM, nigericina 0,7 mM e um total de 36,7 mM de sais (K<sup>+</sup>) de succinato (Succ), glutarato e/ou MMA. Quando dois sais diferentes estiveram presentes, estes foram adicionados em igual concentração (18,35 mM). Para os experimentos do painel c, mitocôndrias foram incubadas a 30 °C em meio de reação contendo Tris 20 mM (pH 7,4), EGTA-(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 1 mM e antimicina A 2 µM. O meio conteve um total de 100 mM de sais de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de succinato (Succ), glutarato e/ou MMA. Quando dois sais estiveram presentes, estes foram adicionados em igual concentração (50 mM). **Painel a:** Figura representativa do inchamento mitocondrial na presença de diferentes dicarboxilatos. Onde indicado pela seta, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 2 mM (sal de K<sup>+</sup>) foi adicionado ao meio de reação. **Painéis b e c:** Taxas de inchamento mitocondrial na presença ou ausência de HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 2 mM. Dados representam a média ± S.E.M de pelo menos 5 experimentos independentes realizados em duplicata. FU: Unidades de fluorescência. \*Significativamente diferente de "Succ + HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>", p<0,01.

Em fígado e rim, o carreador mitocondrial de dicarboxilatos é importante para a gliconeogênese, promovendo o transporte de malato da mitocôndria para o citosol. Embora o papel do transportador mitocondrial de dicarboxilatos ainda seja pouco entendido nas mitocôndrias de cérebro, provavelmente ele está associado ao suprimento de intermediários para o ciclo do ácido cítrico, já que estes são gastos durante a síntese *de novo* de glutamato (Hertz, 2004). Em adição, em neurônios a síntese *de novo* de oxaloacetato é insuficiente, pois requer a carboxilação de piruvato, que é mínima nestas células (Hassel, 2002). Portanto, o metabolismo energético neuronal e a neurotransmissão glutamatérgica podem estar comprometidos por altas concentrações de MMA. A inibição do transportador de dicarboxilatos mitocondrial pelo MMA pode também inibir o transporte de glutatona para dentro das mitocôndrias (Lash, 2006; Morath et al., 2008), levando à depleção das defesas antioxidantes e ao desbalanço redox, que pode ser relacionado com a deficiência de glutatona observada na acidemia metilmalônica (Treacy et al., 1996).

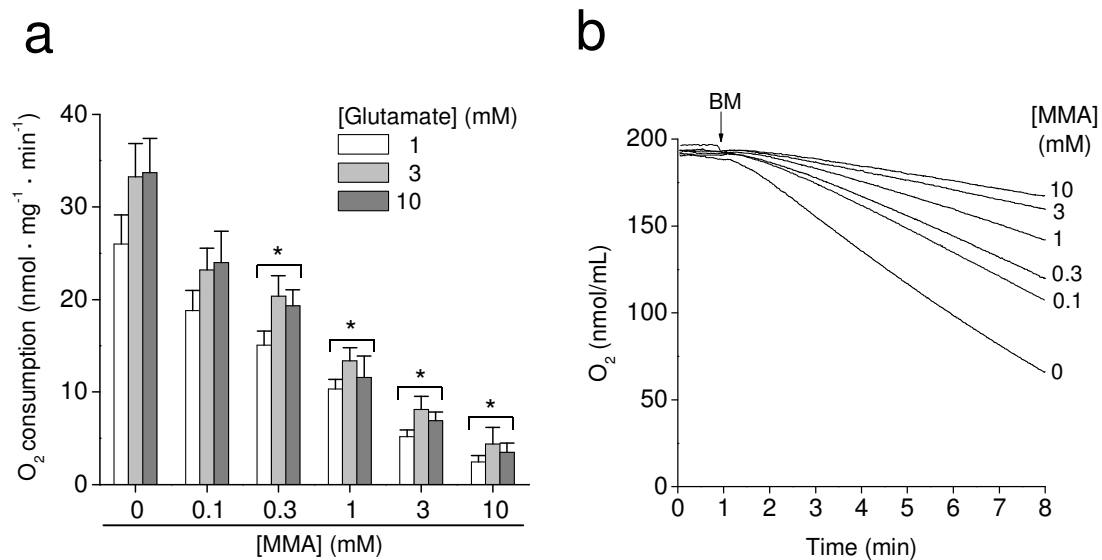
Em um estudo colaborativo recente com o grupo do Prof. Moacir Wajner (UFRGS), mostramos que o etilmalonato (EMA), metabólito acumulado na encefalopatia etilmalônica e na deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia curta, também possui a propriedade de inibir o transporte dos dicarboxilatos malato e succinato através da membrana mitocondrial interna. Estes resultados fazem parte do artigo ***“Ethylmalonic acid impairs brain mitochondrial succinate and malate transport”***, de autoria de A.U. Amaral, C. Cecatto, E.N. Busanello, C.A. Ribeiro, D.R. Melo, G. Leipnitz, R.F. Castilho e M. Wajner, publicado na revista *Molecular Genetics and Metabolism* (volume 105, páginas 84-90, 2012).

#### **4.3. Inibição por MMA do metabolismo oxidativo neuronal de glutamato**

O aminoácido glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e importante constituinte estrutural das proteínas em mamíferos (Foster et al., 1984; Mayer et al., 1997). Além destas funções ele pode também ser oxidado na mitocôndria para atuar como fonte de intermediários para o ciclo do ácido cítrico (Daikhin and Yudkoff, 2000; McKenna, 2007), sendo particularmente importante no cérebro. Neste, a oxidação de glutamato chega a ser tão intensa que este aminoácido poderia, teoricamente, substituir a glicose como combustível (Yu et al. 1982; Erecinska et al. 1988). Aditivamente, um comprometimento na sua homeostase pode constituir um fator determinante na patogênese de certas doenças neurológicas (Santos et al., 2006).

Sustentado na proposta de que o MMA compromete o metabolismo oxidativo de glutamato, o estudo prévio de Toyoshima et al. (1996) mostrou que o MMA reduz significativamente a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de glutamato marcado com  $^{14}\text{C}$  em mitocôndrias de fígado de rato. Aditivamente, nossos resultados (ver **Fig 2**) mostram que o MMA inibiu extensamente a respiração de mitocôndrias de cérebro mantida por

glutamato, e que isto poderia estar relacionado ao comprometimento do metabolismo energético neuronal pelo MMA. Propusemos então, a caracterização do efeito inibitório de MMA no consumo mitocondrial de  $O_2$  quando glutamato é utilizado como substrato respiratório, testando diversas concentrações deste e de MMA. Na **figura 4a** o consumo mitocondrial de  $O_2$  atinge sua velocidade máxima na presença de glutamato 3 mM, mantendo-se semelhante com glutamato 10 mM. As diferentes concentrações de MMA testadas inibiram a respiração mantida por glutamato de maneira dose-dependente. Foi obtida uma inibição de 75% do consumo de  $O_2$  na presença de MMA 3 mM (**Fig 4a**). A **figura 4b** mostra um perfil inibitório linear e dose-dependente do MMA sobre a respiração mantida por glutamato 3 mM. Pode-se notar que a concentração mínima de MMA (0,1 mM) é suficiente para inibir cerca de 25% do consumo de  $O_2$ .

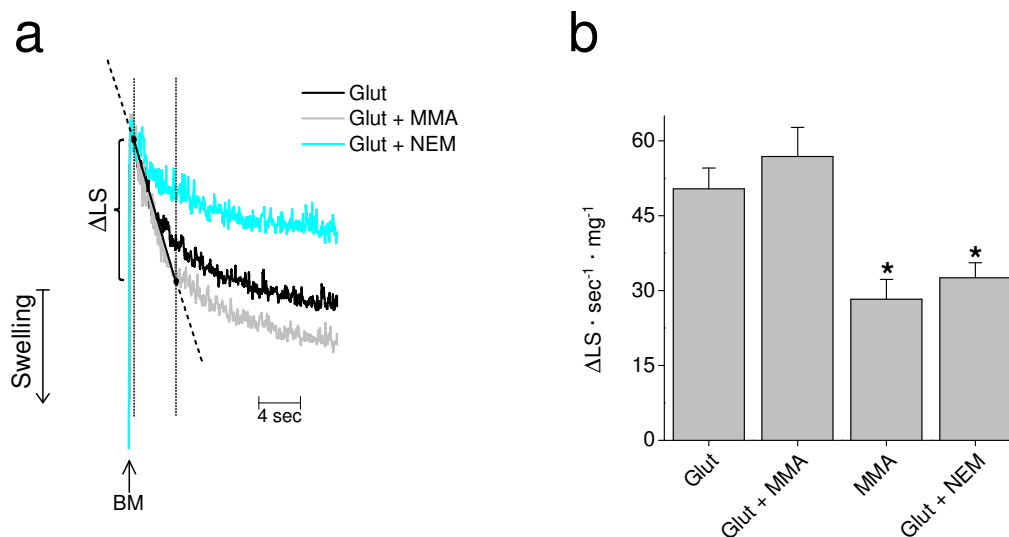


**Fig. 4 - Efeito de MMA no consumo de oxigênio mantido por glutamato em mitocôndrias de cérebro de rato.**

Mitocôndrias isoladas de cérebro total de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas a 37 °C em meio de reação padrão (pH 7,2) contendo glutamato nas concentrações 1, 3 ou 10 mM na presença ou ausência de concentrações variadas de MMA (0,1-10 mM) e ADP 800  $\mu\text{M}$ . **Painel a:** Valores absolutos de consumo de oxigênio. **Painel b:** Representação do consumo mitocondrial de oxigênio mantido por glutamato 3 mM na presença de concentrações variáveis de MMA (0,1-10 mM). \*Significativamente diferente de seu respectivo controle,  $p < 0,01$ .

Para avaliarmos se o efeito inibitório do MMA na respiração mantida por glutamato estaria associado à inibição do transporte deste substrato para dentro da mitocôndria, como ocorreu no caso do succinato, foram realizados experimentos de inchamento mitocondrial, empregando-se a metodologia baseada no transporte de sais de amônio (**Fig 5**). Sob estas condições, o inchamento mitocondrial constitui uma função do influxo de glutamato pelos trocadores glutamato/aspartato e glutamato/OH<sup>-</sup> (McKenna 2007).

Quando incubado sozinho, o glutamato foi transportado para dentro das mitocôndrias, o que pode ser evidenciado pelo extenso inchamento mitocondrial. Na presença de *N*-etilmaleimida (NEM), conhecido inibidor do trocador glutamato/OH<sup>-</sup> (Njogu e Hoek, 1983), o transporte foi inibido em aproximadamente 35% (**Fig 5a**). Quando o glutamato foi substituído por MMA, o inchamento foi significativamente mais lento (**Fig 5b**). Já a presença de MMA juntamente com glutamato não afetou significativamente o influxo deste para dentro da mitocôndria (**Fig 5b**), indicando que a inibição pelo MMA da respiração mantida por glutamato não se deve à inibição do transporte mitocondrial deste substrato.



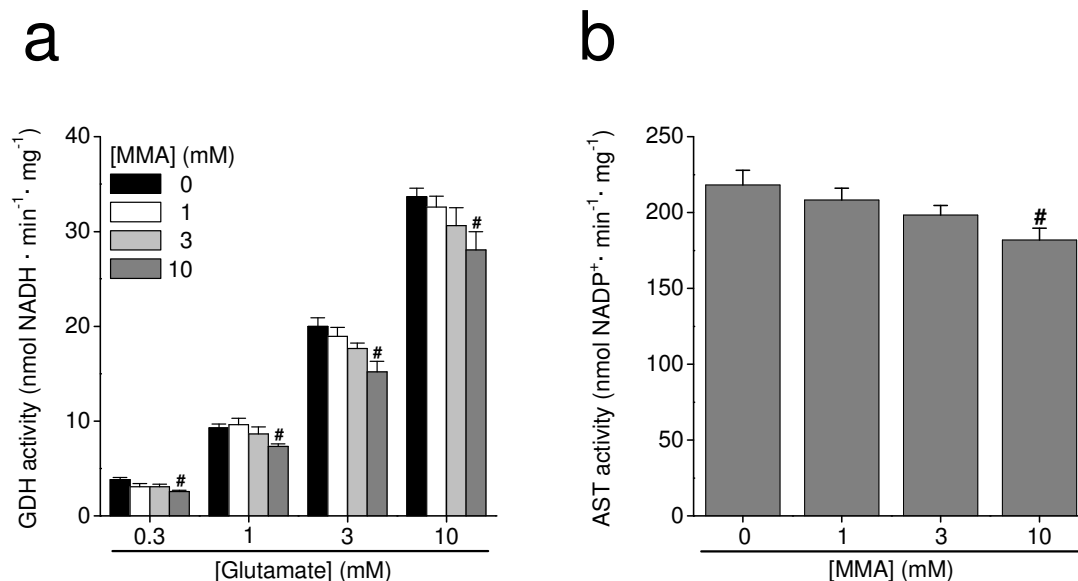
**Fig. 5 - Avaliação do efeito de MMA no transporte mitocondrial de glutamato.**

Mitocôndrias de cérebro total de rato (0,1 mg/mL) foram incubadas a 37 °C em meio de reação contendo Tris (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 20 mM/EGTA 1 mM (pH 7,4), antimicina A 2 μM e rotenona 2,5 μM. O meio conteve um total de 100 mM de sais de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de glutamato (Glut) ou MMA. Quando os dois sais diferentes estiveram presentes, estes foram adicionados em igual concentração (50 mM). O inibidor do transporte de glutamato *N*-etilmaleimida (NEM) 2 mM esteve presente onde indicado na figura. **Painel a:** Figura representativa do inchamento de mitocôndrias de cérebro na presença de diferentes dicarboxilatos. Onde indicado pela seta, 0,1 mg/mL de suspensão mitocondrial (BM) foi adicionada ao meio de reação. **Painel b:** Variação do espalhamento de luz correspondendo às taxas de inchamento na presença de sais de amônio em mitocôndrias de cérebro em diferentes condições. Dados representam a média ± S.E.M de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em duplicata. \*Significativamente diferente de “Glut”, p<0,01.



Em neurônios, há uma baixa atividade da piruvato carboxilase (Morath et al., 2007), enzima que em outras células e tecidos é responsável pela regeneração de oxaloacetato, diretamente, a partir de piruvato. Esta deficiência causa uma limitação na capacidade anaplerótica neuronal. No entanto, dentro da mitocôndria, o glutamato pode servir como fonte de carbonos para o ciclo do ácido cítrico, sendo convertido por duas rotas principais: desaminação pela glutamato desidrogenase (GDH) ou transaminação pela aspartato transaminase (AST), gerando  $\alpha$ -cetoglutarato (Balazs, 1965; Nicklas et al., 1971). Em neurônios há uma alta atividade destas enzimas (Balazs, 1965; Lai et al., 1975) e estas vias de produção de  $\alpha$ -cetoglutarato a partir de glutamato parecem contribuir significativamente para o metabolismo energético oxidativo (Zhang et al., 2004). Assim, a sua inibição por MMA poderia explicar, pelo menos em parte, o quadro de privação energética na acidemia metilmalônica.

Primeiramente, foi testada a atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH) utilizando diferentes concentrações de glutamato (0,3; 1; 3; 10 mM) na presença de concentrações variadas de MMA (1-10 mM). Na **figura 6a**, nota-se uma atividade enzimática concentração-dependente de glutamato representada pelo NADH produzido na reação. Houve uma pequena inibição da atividade de glutamato desidrogenase somente quando empregada a concentração mais alta de MMA (10 mM), alcançando inibição de 33% e 16% quando utilizado glutamato 0,3 e 10 mM, respectivamente. Este resultado indica que a enzima glutamato desidrogenase é pouco inibida por MMA.



**Fig. 6 - Efeito de MMA na atividade das enzimas glutamato desidrogenase (GDH) e aspartato transaminase (AST).**

Para o experimento do painel a, mitocôndrias de cérebro total de rato (0,15 mg/mL) foram incubadas a 37 °C em meio de reação padrão (pH 7,2) contendo triton X-100 0,1%, ADP 250 µM, NAD<sup>+</sup> 1 mM, diferentes concentrações de glutamato (0,3; 1; 3 e 10 mM) na ausência ou presença de concentrações variáveis de MMA (1-10 mM). Para o experimento do painel b, mitocôndrias de cérebro de rato (0,25 mg/mL) foram incubadas a 37 °C em meio de reação composto por K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM (pH 7,4) contendo triton X-100 0,17%, glutamato 2 mM, oxaloacetato 1 mM, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, NADPH 100 µM e glutamato desidrogenase purificada 4 U/mL na ausência ou presença de concentrações variáveis de MMA (1-10 mM). **Painel a:** Atividade da glutamato desidrogenase representada pelos valores absolutos de NADH produzido na reação. **Painel b:** Valores absolutos de NADP<sup>+</sup> produzido pela atividade da aspartato transaminase. Dados representam a média ± S.E.M de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em duplicata. <sup>#</sup>Significativamente diferente de seu respectivo controle, p<0,05.

Em seguida, avaliou-se a atividade da aspartato transaminase (AST) utilizando uma metodologia acoplada à atividade da glutamato desidrogenase (Dennis et al., 1976; Cheeseman e Clarck, 1988). Foi empregada uma única concentração de substratos para a reação (oxaloacetato 1 mM + glutamato 2 mM), e o uso de diversas concentrações de MMA (1-10 mM). A atividade enzimática representada pela produção de  $\text{NADP}^+$  foi pouco alterada por MMA, sendo que a inibição significativa de 17% foi percebida apenas na presença de MMA 10 mM (**Fig 6b**). Como o ensaio da AST foi determinado pela reação acoplada a oxidação de NADPH pela GDH, a possibilidade de que o efeito inibitório de MMA observado na atividade da AST seja resultado de efeito deste ácido orgânico na GDH não pode ser descartada.

Portanto, o MMA parece apresentar um efeito inibitório bastante sutil e de pouca relevância, na atividade das enzimas glutamato desidrogenase e aspartato transaminase.

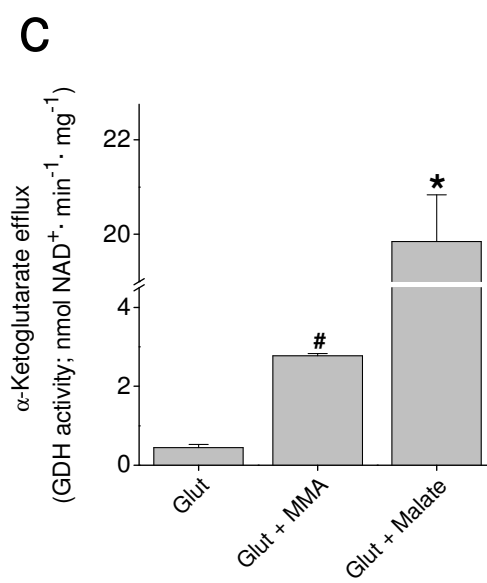
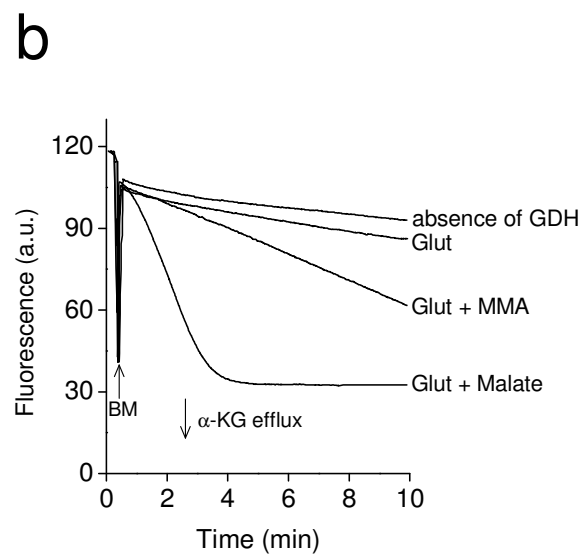
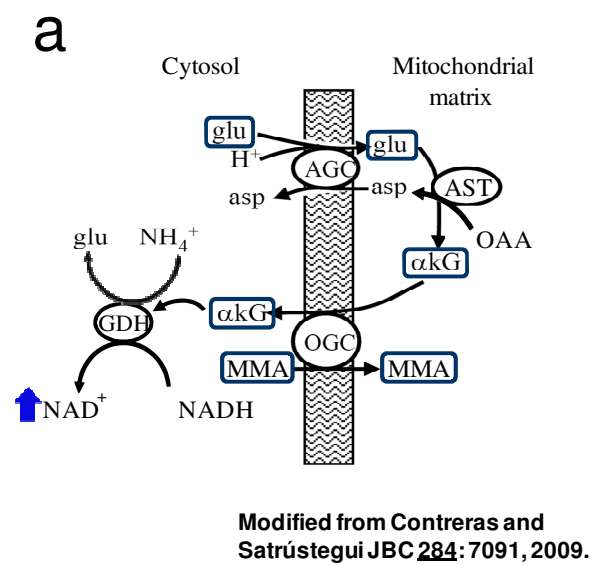
Após verificarmos que o MMA não causa inibição do influxo mitocondrial de glutamato e nem mesmo inibe expressivamente as enzimas diretamente relacionadas ao metabolismo de glutamato, sugerimos dois outros mecanismos através dos quais o MMA poderia atuar. Um ocorreria através da troca entre MMA extramitocondrial por  $\alpha$ -cetoglutarato da matriz mitocondrial, levando à depleção do mesmo dentro da mitocôndria e o outro seria pela inibição do complexo enzimático  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase por MMA, ambos tendo como consequência a diminuição da respiração mantida por glutamato.

De fato, os resultados da **Fig. 2** indicam que o estímulo causado pelo MMA na respiração mantida por  $\alpha$ -cetoglutarato pode ser resultado da troca de MMA intramitocondrial pelo substrato extramitocondrial, que se encontrava em alta concentração (5 mM) no meio de reação, resultando em aumento da velocidade de

consumo de  $O_2$ . Assim, para se comprovar a troca MMA/ $\alpha$ -cetogluturato e sua relação com a inibição da respiração mantida por glutamato, sugerimos um experimento específico para se testar o efeito de MMA no efluxo mitocondrial de  $\alpha$ -cetogluturato.

A saída de  $\alpha$ -cetogluturato intramitocondrial foi estimada por um método fluorimétrico indireto acoplado a atividade enzimática da glutamato desidrogenase (Contreras e Satrústegui, 2009) (**Fig 7**). Ao entrar na mitocôndria via trocador glutamato/aspartato (AGC), o glutamato é prontamente convertido em  $\alpha$ -cetogluturato pela aspartato transaminase (AST), e pode deixar a mitocôndria via transportador de  $\alpha$ -cetogluturato (OGC). O  $\alpha$ -cetogluturato transportado para fora da mitocôndria é reconvertido em glutamato pela glutamato desidrogenase exógena (GDH), numa reação em que há diminuição na fluorescência, pelo consumo de NADH (**Fig 7a**), permitindo a quantificação do transporte de  $\alpha$ -cetogluturato (Contreras e Satrústegui, 2009).

Observou-se que quando glutamato foi empregado na presença de MMA 0,5 mM, o efluxo mitocondrial de  $\alpha$ -cetogluturato aumentou cerca de 6 vezes (**Fig 7**, painéis **b** e **c**), quando comparado à situação controle (somente glutamato 3 mM). Houve um estímulo ainda mais exacerbado no transporte de  $\alpha$ -cetogluturato, utilizando-se glutamato na presença de malato (**Fig 7**, painéis **b** e **c**), indicando que as mitocôndrias de cérebro apresentam uma alta atividade do transportador de  $\alpha$ -cetogluturato. Esta última condição representa o controle positivo do experimento, já que conhecidamente ocorre a troca de malato por  $\alpha$ -KG pelo transportador de  $\alpha$ -cetogluturato. E ainda, dentro da mitocôndria o malato é convertido em oxaloacetato, que juntamente com glutamato, numa reação catalisada pela aspartato transaminase (AST), irá gerar mais  $\alpha$ -cetogluturato e, portanto, aumentar seu efluxo. Pelo emprego desta metodologia indireta foi confirmado que o MMA depleta a mitocôndria de  $\alpha$ -cetogluturato por meio da troca MMA/ $\alpha$ -cetogluturato.



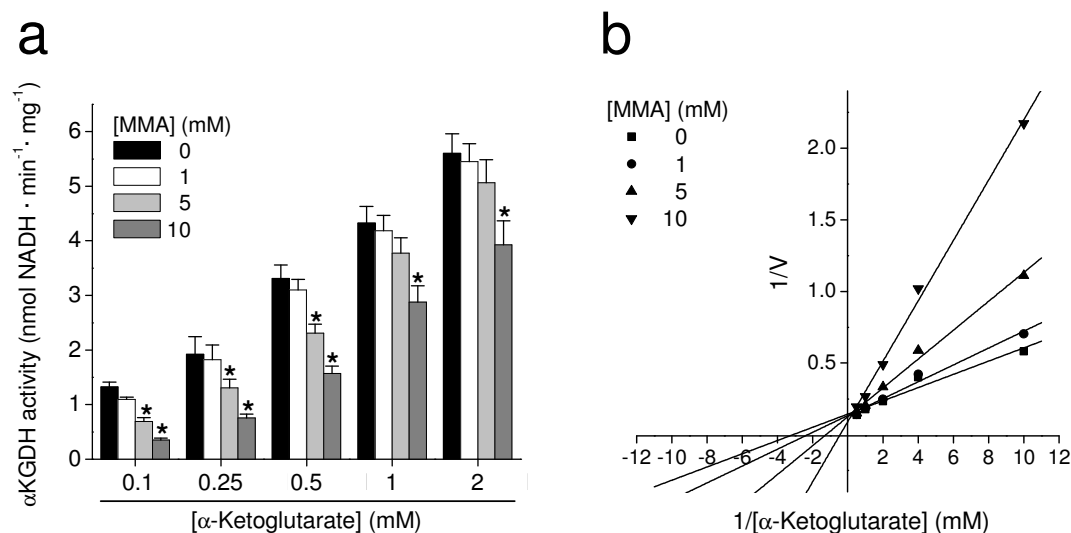
**Fig. 7 - Efeito estimulatório de MMA no efluxo mitocondrial de  $\alpha$ -cetoglutarato pelo transportador de  $\alpha$ -cetoglutarato.**

Mitocôndrias de cérebro total de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas a 37 °C em meio de reação contendo manitol 75 mM, sacarose 25 mM, fosfato de potássio 5 mM, tris-HCl 20 mM, EDTA-K<sup>+</sup> 0,5 mM, KCl 100 mM e BSA 0,1% (pH 7,4), ADP 500  $\mu$ M, sulfato de amônio 3 mM, glutamato desidrogenase (GDH) purificada 10 U/mL, NADH 66  $\mu$ M e glutamato 3 mM, na ausência ou presença de MMA 0,5 mM, malato 0,5 mM ou GDH. **Painel a:** Representação da queda da fluorescência pela produção de NAD<sup>+</sup> na reação, pelo estímulo no efluxo de  $\alpha$ -cetoglutarato promovido por malato e metilmalonato. Onde indicado pela seta, a suspensão mitocondrial (BM) foi adicionada. **Painel b:** Valores absolutos da velocidade de produção de NAD<sup>+</sup> pela reação de conversão a glutamato do  $\alpha$ -cetoglutarato transportado pelo carreador oxoglutarato. Dados representam a média  $\pm$  S.E.M de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em duplicata. a.u.: Unidades arbitrárias de fluorescência. \*Significativamente diferente de "Glut",  $p < 0,01$ , #significativamente diferente de "Glut",  $p < 0,05$ .

Sabe-se que algumas desordens neurológicas estão relacionadas a uma baixa atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, enzima crucial na produção de equivalentes reduzidos (NADH) e na manutenção do estado redox mitocondrial do cérebro. Esta enzima é considerada limitante no ciclo do ácido cítrico, onde converte  $\alpha$ -cetoglutarato a succinil-CoA (Gibson et al. 2000). Além de converter o  $\alpha$ -cetoglutarato proveniente do próprio ciclo, a  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase é responsável pelo catabolismo de glutamato, relacionando o metabolismo deste diretamente ao ciclo do ácido cítrico (Santos et al., 2006). Assim, outro mecanismo de ação do MMA no metabolismo oxidativo de glutamato seria por meio da inibição do complexo enzimático  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, impedindo a conversão de  $\alpha$ -cetoglutarato a succinil-CoA, e consequentemente a formação de oxaloacetato.

A atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase foi avaliada fluorimetricamente utilizando-se mitocôndrias isoladas de cérebro na presença de concentrações crescentes de  $\alpha$ -cetoglutarato (0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM), além de diversas concentrações de MMA (1-10 mM). Os valores absolutos de atividade enzimática, representada pelo NADH produzido (**Fig 8a**) estão de acordo com as concentrações crescentes de  $\alpha$ -cetoglutarato. O MMA promoveu um efeito inibitório dose-dependente, atingindo aproximadamente 73 e 60% quando utilizada a concentração mais alta (10 mM), em conjunto com  $\alpha$ -cetoglutarato 0,1 e 0,25 mM, respectivamente (**Fig 8a**). Quanto mais alta a concentração de substrato, menor foi o efeito de MMA. O perfil de inibição competitiva do MMA em relação à  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase é evidenciado através do gráfico de dupla-reciprocidade (**Fig 8b**). O valor de  $K_m$  encontrado para o substrato  $\alpha$ -cetoglutarato foi de  $0,57 \pm 0,06$  mM (n=4), enquanto o valor de  $K_i$  encontrado para o MMA foi de  $3,65 \pm 0,81$  mM (n=4), calculado utilizando o “Dixon-plot”. De modo interessante, Sauer et al. (2008) observaram

uma inibição de aproximadamente 25% na atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase na presença de 1 mM de metilmalonil-CoA, precursor metabólico do MMA.



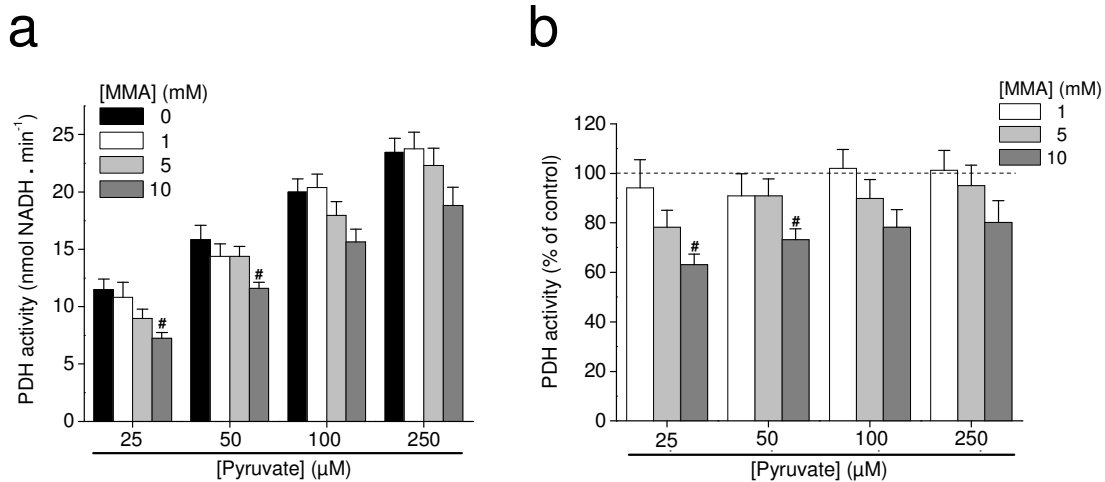
**Fig. 8 - Efeito de MMA na atividade da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase.**

A medida da atividade de  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase foi conduzida em meio de reação contendo  $K_2HPO_4$  50 mM,  $MgCl_2$  1 mM (pH 7,35), triton X-100 0.1%, pirofosfato de tiamina 0,2 mM, DTT 0,3 mM, EGTA 100  $\mu$ M, coenzima A-SH 50  $\mu$ M, antimicina A 1  $\mu$ M, rotenona 2,5  $\mu$ M, mitocôndrias de cérebro total de rato (0,5 mg/mL), diferentes concentrações de  $\alpha$ -cetoglutarato (0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM) na ausência ou presença de concentrações variáveis de MMA (1-10 mM), além de  $NAD^+$  2 mM a 37 °C. **Painel a:** Valores absolutos de NADH produzido correspondendo à atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase. **Painel b:** Gráfico duplo-recíproco (*Lineweaver-Burk*) mostrando o perfil competitivo da inibição da atividade enzimática por MMA. Dados representam a média  $\pm$  S.E.M de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em duplicata. \*Significativamente diferente de seu respectivo controle,  $p < 0,01$ .



A enzima piruvato desidrogenase constitui um membro da mesma família de  $\alpha$ -cetoácidos desidrogenases à qual pertence a  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (Gibson et al., 2000). O componente dihidrolipoil desidrogenase (E3) está presente em ambos os complexos enzimáticos, exercendo as mesmas funções. Além disso, a piruvato desidrogenase catalisa uma série de reações similares às aquelas catalisadas pela  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (Gibson et al., 2000). Baseando-se na similaridade estrutural e funcional dos dois complexos enzimáticos, decidimos investigar se o MMA também inibiria a atividade da piruvato desidrogenase.

A atividade do complexo piruvato desidrogenase foi analisada utilizando-se uma preparação de enzima purificada (32  $\mu\text{g}$  de proteína/mL), além de diferentes concentrações de piruvato (25; 50; 100 e 250  $\mu\text{M}$ ) e de MMA (1-10 mM). Este inibiu em pequena extensão a atividade enzimática da piruvato desidrogenase somente quando utilizado em sua concentração mais alta (10 mM), e na presença das concentrações mais baixas de piruvato (25 e 50  $\mu\text{M}$ ) (**Fig 9**). O  $K_m$  encontrado para o piruvato foi de  $34 \pm 4 \mu\text{M}$  (n=4). A partir destes resultados, pode-se concluir que o MMA não é um inibidor importante da atividade da piruvato desidrogenase.



**Fig. 9 - Efeito de MMA na atividade da enzima piruvato desidrogenase.**

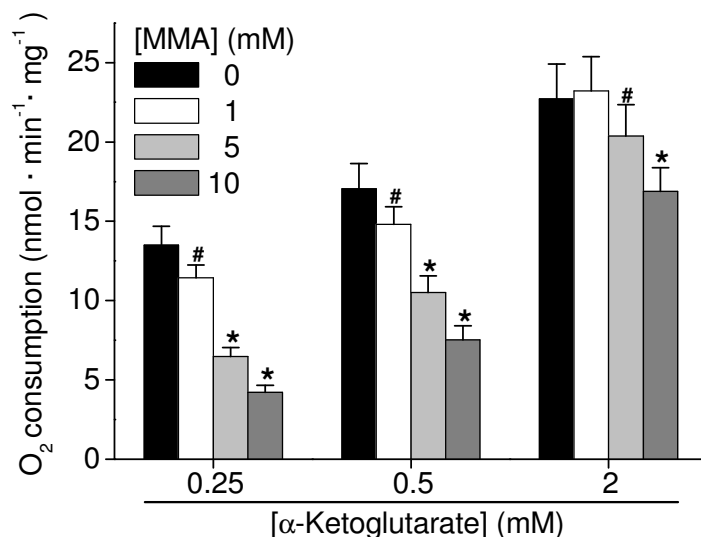
O ensaio enzimático da piruvato desidrogenase foi realizado em meio de reação contendo  $K_2HPO_4$  50 mM,  $MgCl_2$  1 mM (pH 7,35), pirofosfato de tiamina 0,2 mM, DTT 0,3 mM, EGTA 100 μM, coenzima A-SH 50 μM, piruvato desidrogenase purificada 10 mU/mL, diferentes concentrações de piruvato (25, 50, 100 e 250 μM) na ausência ou presença de concentrações variáveis de MMA (1-10 mM) além de  $NAD^+$  2 mM a 37 °C. **Painel a:** Taxas de produção de NADH correspondentes à atividade da piruvato desidrogenase. **Painel b:** Valores relativos de atividade enzimática. Dados mostrados como porcentagens de suas respectivas atividades na ausência de MMA. Dados representam a média  $\pm$  S.E.M de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em duplicata. <sup>#</sup>Significativamente diferente de seu respectivo controle,  $p < 0,05$ .

Uma vez caracterizadas a troca de MMA extramitocondrial por  $\alpha$ -cetoglutarato intramitocondrial e a inibição da atividade da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, foi caracterizado o efeito de MMA na respiração mitocondrial mantida pela atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase.

Em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato, foi estudado o efeito de concentrações crescentes de metilmalonato (1-10 mM) na respiração mantida por  $\alpha$ -cetoglutarato, empregando-se diferentes concentrações deste substrato, na presença de uma concentração fixa (0,5 mM) do dicarboxilato malonato, substrato para o transportador de  $\alpha$ -cetoglutarato (Sluse et al. 1972). O uso de malonato teve como objetivo de promover o influxo mitocondrial de  $\alpha$ -cetoglutarato, pela troca de  $\alpha$ -cetoglutarato extramitocondrial com malonato intramitocondrial, ao mesmo tempo minimizando a troca de  $\alpha$ -cetoglutarato extramitocondrial com MMA intramitocondrial, evitando o efeito estimulatório do MMA no consumo de oxigênio mantido pelo  $\alpha$ -cetoglutarato. Além disso, o malonato foi utilizado para inibir a succinato desidrogenase, deixando apenas a  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase como fonte de coenzima reduzida (NADH) para a cadeia respiratória. Desta forma, o uso de malonato nos permitiu avaliar diretamente a inibição da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase pelo MMA, e a consequente inibição da respiração mitocondrial.

Na **figura 10** observam-se as velocidades absolutas de consumo de oxigênio nas várias condições propostas. Nota-se que o MMA promoveu uma inibição dose-dependente no consumo de oxigênio, alcançando cerca de 70% quando utilizada a menor concentração de  $\alpha$ -cetoglutarato (0,25 mM), juntamente com a dose mais elevada de MMA (10 mM). O efeito inibitório de MMA foi mais significativo na presença das concentrações mais baixas do substrato  $\alpha$ -cetoglutarato (0,25 e 0,5 mM). Quando  $\alpha$ -cetoglutarato 2 mM foi utilizado no experimento, observou-se uma menor inibição da

respiração. Este fato, possivelmente está relacionado à inibição competitiva da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase por MMA.



**Fig. 10 - Efeito de metilmalonato (MMA) na respiração mitocondrial mantida por  $\alpha$ -cetoglutarato em presença de malonato (MA).**

Mitocôndrias de cérebro total de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas a 37 °C em meio de reação padrão (KCl 130 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EGTA 200  $\mu$ M, pH 7,2), na presença de  $\alpha$ -cetoglutarato 0,25; 0,5 ou 2 mM. O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi medido na presença de uma concentração fixa de malonato (0,5 mM) e ADP 800  $\mu$ M. Nestas condições, foram adicionadas ainda, concentrações crescentes de MMA (1-10 mM), como indicado. Na figura são mostrados os valores absolutos de consumo de oxigênio e os dados representam a média  $\pm$  S.E.M de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em duplicata. \*Significativamente diferente de seu respectivo controle,  $p < 0,01$ . #Significativamente diferente de seu respectivo controle,  $p < 0,05$ .

Após a observação da troca entre MMA extramitocondrial por  $\alpha$ -cetoglutarato intramitocondrial, decidimos analisar o efeito de MMA na depleção mitocondrial de  $\alpha$ -cetoglutarato e o acúmulo intramitocondrial de MMA por meio da técnica de eletroforese capilar de zona (CZE), que permite detectar e separar intermediários do ciclo do ácido cítrico. Esta técnica foi executada em colaboração com os Profs. Drs. Nilson Assunção e Etelvino Bechara, no Laboratório de Radicais Livres e Bioluminescência, no Instituto de Química da USP.

Nosso objetivo era, a princípio, identificar e quantificar os níveis de MMA,  $\alpha$ -cetoglutarato e glutamato em amostras que correspondiam aos conteúdos intra e extramitocondriais após experimentos de consumo de oxigênio empregando-se mitocôndrias de cérebro de ratos.

Aparentemente a técnica foi pouco sensível para o tipo de amostra analisada. Embora a presença dos ácidos  $\alpha$ -cetoglutarico e metilmalônico tenha sido detectável nas amostras (resultados não mostrados), as áreas dos picos correspondentes aos ácidos, apesar de visíveis, não eram definidas o suficiente para permitir uma quantificação confiável dos compostos na faixa de concentração acumulada.

Assim, decidimos analisar apenas o acúmulo de MMA nas amostras de conteúdo intramitocondrial utilizando uma metodologia bem estabelecida para a determinação de ácido metilmalônico. Esta metodologia emprega a cromatografia líquida associada à espectrometria de massas em série para detecção e quantificação do composto em amostras biológicas com alta sensibilidade (Carvalho e Kok, 2008). As análises foram realizadas pela equipe do “Instituto Fleury - Medicina e Saúde”, com suporte técnico do pesquisador Dr. Valdemir M. Carvalho.

| Substrates                    | Intramitochondrial [MMA] (mM) |
|-------------------------------|-------------------------------|
| Endogenous                    | 5.86 ± 0.56                   |
| Added glutamate               | 6.54 ± 0.79                   |
| Added $\alpha$ -ketoglutarate | 6.63 ± 0.57                   |

**Tabela II - Acúmulo intramitocondrial de MMA após respiração mantida por diferentes substratos na presença de MMA.**

Mitocôndrias de cérebro total de rato (2 mg/mL) foram incubadas a 37 °C em meio de reação padrão contendo KCl 130 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM (pH 7,2), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 200  $\mu$ M e MMA 2 mM, na presença de substratos endógenos, como também de glutamato 3 mM ou  $\alpha$ -cetoglutarato 1,5 mM exógenos. Após 8 min de respiração na presença de ADP 800  $\mu$ M, a suspensão mitocondrial foi processada e estocada para posterior detecção e quantificação do conteúdo intramitocondrial de MMA por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (CL – EM/EM). Dados representam a média  $\pm$  S.E.M. de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em duplicata.

Os resultados da **Tabela II** mostram a estimativa do acúmulo intramitocondrial de MMA após incubação de mitocôndrias de cérebro na presença substratos endógenos e MMA 2 mM durante 8 minutos. Para a estimativa do acúmulo intramitocondrial, o volume de matriz mitocondrial considerado foi 0,9  $\mu$ L (Brustovetsky et al. 2005).

Nota-se que as mitocôndrias isoladas de cérebro acumularam aproximadamente o triplo da concentração inicial de MMA no meio de reação. Este resultado está de acordo com Toyoshima et al. (1995), que mostraram que mitocôndrias de fígado podem captar e acumular MMA exógeno, levando a concentrações até 9 vezes mais altas dentro da matriz mitocondrial em relação ao ambiente extramitocondrial.

Outros experimentos foram realizados na presença de MMA em conjunto com glutamato 3 mM ou  $\alpha$ -cetoglutarato 1,5 mM exógenos. A presença de diferentes

substratos não alterou significativamente o acúmulo intramitocondrial de MMA. Sabe-se que o MMA pode entrar e sair da mitocôndria por três diferentes sistemas de transporte mitocondrial (Halperin et al., 1971), permitindo que seja alcançada uma concentração intramitocondrial considerável e constante deste metabólito, o que poderia explicar a ausência de interferência da adição de substratos exógenos no acúmulo intramitocondrial de MMA. Estes achados indicam que as mitocôndrias de cérebro acumulam MMA em concentrações que são altas o suficiente para inibir competitivamente a atividade da  $\alpha$ -KGDH.

#### **4.4. Efeito do tratamento crônico *in vivo* com MMA em ratos jovens**

Foi previamente descrito que, a administração crônica intraperitoneal de MMA em ratos durante seu estágio de vida inicial, compromete o sistema nervoso central destes animais, causando deficiências específicas de aprendizagem (Dutra et al., 1991), além de causar comprometimento comportamental de grau variado e retardo no desenvolvimento neuromotor (de Mello et al., 1996).

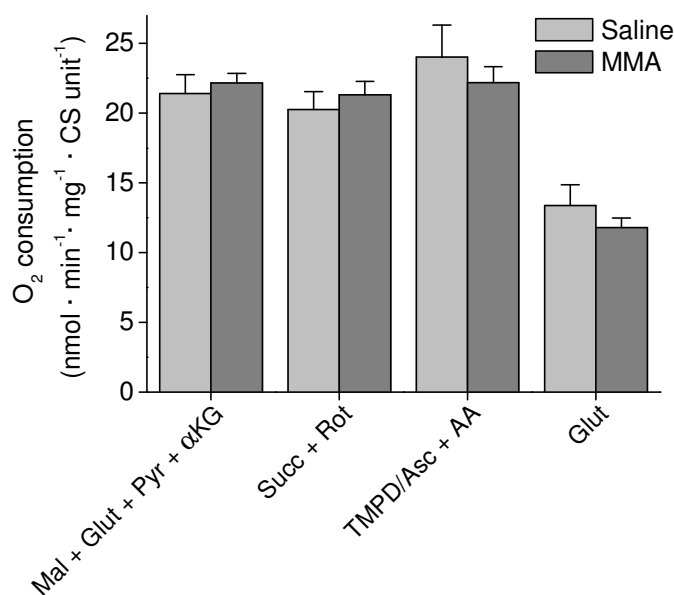
Devido ao fato da grande maioria destes estudos possuir um enfoque basicamente comportamental, sugerimos realizar o tratamento *in vivo* crônico com MMA em ratos jovens, utilizando o protocolo experimental já descrito (Wajner et al., 1988), apresentando, contudo, uma abordagem relacionada à bioenergética mitocondrial, de forma a complementar nossos estudos *in vitro*.

Foi realizado um tratamento crônico, com administração intraperitoneal de MMA por 16 dias (2x ao dia). Com este tratamento, espera-se alcançar níveis séricos de 2 a 2,5 mM de MMA, comparáveis àqueles encontrados na acidemia metilmalônica humana (Dutra et al., 1991). Após o período de tratamento, animais controles e tratados foram sacrificados, sempre dezesseis horas após a última administração de MMA, com o objetivo de evitar o efeito direto da presença deste nas organelas isoladas. Em seguida, foram realizados o isolamento de mitocôndrias de cérebro e a avaliação do consumo de oxigênio mitocondrial na presença de ADP, para se obter o estímulo da respiração pela fosforilação oxidativa.

Houve uma pequena tendência de aumento nas respirações das mitocôndrias provenientes dos animais tratados com MMA, quando utilizados como doadores de elétrons um coquetel de substratos para o complexo I (malato, glutamato, piruvato e  $\alpha$ -



cetoglutarato) e succinato e, quando comparadas às mitocôndrias dos animais controle (Fig 11). Quando se utilizou TMPD/ascorbato e glutamato como substratos, houve uma tendência da respiração sofrer um pequeno decréscimo. Contudo, nenhuma destas diferenças foi significativa.



**Fig. 11 - Efeito do tratamento crônico *in vivo* com MMA no consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de cérebro.**

Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) de cérebro total de ratos tratados cronicamente com MMA foram incubadas a 37 °C em meio de reação padrão contendo coquetel de substratos do complexo I [malato, glutamato, piruvato e α-cetoglutarato (Mal + Glut + Pyr + α-KG); 1,25 mM de cada]. Outros experimentos foram realizados na presença de succinato 5 mM + rotenona 2 μM (Succ + Rot), ou de TMPD 200 μM/ascorbato 1 mM + antimicina 1 μM (TMPD/Asc + AA). Foi ainda utilizado glutamato 5 mM como substrato respiratório. Os dados são mostrados como valores absolutos de velocidade de consumo de O<sub>2</sub> normalizados pela atividade de citrato sintase (CS). Dados representam a média ± S.E.M. de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em duplicata.

Os resultados de respiração empregando mitocôndrias de cérebro de ratos tratados com MMA *in vivo* foram normalizados pela atividade da citrato sintase. Esta enzima é muito utilizada como marcador do conteúdo e da atividade de mitocôndrias intactas (Holloszy et al., 1970; Williams et al., 1986; Hood et al., 1989), devido ao fato de ser uma enzima característica de matriz mitocondrial e frequentemente constante em tecidos específicos quando expressa por proteína mitocondrial total. Sendo assim, analisamos sua atividade em homogenatos e mitocôndrias isoladas de cérebros de ratos submetidos ao tratamento *in vivo* com MMA. Não foi constatada diferença entre a atividade da citrato sintase medida nos homogenatos controles  $1,35 \pm 0,07$  U/mg (n=6) e tratados  $1,34 \pm 0,08$  U/mg (n=6). Logo, não houve redução ou aumento significativo da atividade mitocondrial, que está relacionada ao número de organelas por conta do tratamento. A atividade da citrato sintase nas suspensões mitocondriais obtidas de ratos controles e tratados com MMA foi de  $2,44 \pm 0,16$  U/mg (n=6) e  $2,58 \pm 0,84$  U/mg (n=6), respectivamente. Em adição, as frações mitocondriais controles e tratadas corresponderam respectivamente a  $0,59 \pm 0,10\%$  e  $0,56 \pm 0,10\%$  da quantidade total em proteína dos cérebros dos animais. Estes resultados indicam que as quantidades de mitocôndrias obtidas nos isolamentos mitocondrial não foram diferentes entre si, e que não houve nenhum tipo de seleção das mitocôndrias durante o procedimento de isolamento mitocondrial.

Conclui-se, portanto, que o tratamento crônico com MMA em ratos jovens não resultou em alterações da respiração das organelas. Estes resultados indicam que este tratamento crônico com MMA não leva a alterações permanentes da função mitocondrial, relacionadas à estrutura da organela e que os efeitos na bioenergética mitocondrial dependem da presença do MMA no ambiente mitocondrial para ocorrerem.

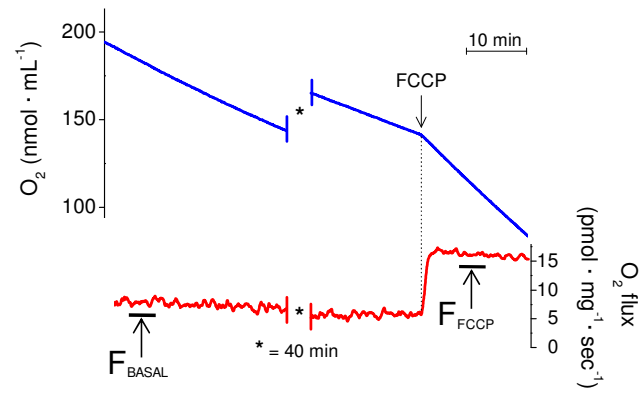
Os resultados sobre o efeito inibitório de MMA no metabolismo oxidativo de glutamato e sobre o tratamento crônico *in vivo* com MMA fazem parte do artigo ***“Methylmalonate impairs mitochondrial respiration supported by NADH-linked substrates: The involvement of mitochondrial glutamate metabolism”***, de autoria de D.R. Melo, S.R. Mirandola, N.A. Assunção, R.F. Castilho, publicado na revista *Journal of Neuroscience Research* (2012; doi: 10.1002/jnr.23020).

#### **4.5. Inibição por MMA da respiração por fragmentos de cérebro de rato (modelo *in situ*)**

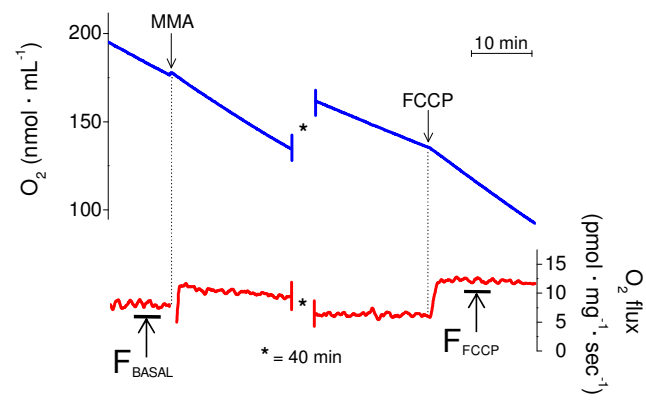
Como complementação aos estudos *in vitro* e *in vivo* empregando-se mitocôndrias isoladas de cérebro de rato, caracterizamos o comprometimento do metabolismo oxidativo neuronal pelo MMA, em um sistema *in situ* de maior complexidade constituído por fragmentos de tecido (~1 x 1 mm) de cérebro de rato.

Foram realizados experimentos de consumo de oxigênio medindo-se simultaneamente a respiração de amostras controle e tratadas com MMA 10 mM, em meio HBSS (glicose 1 g/L), suplementado ou não com malato 5 mM. Na situação controle, o fluxo de consumo de oxigênio se manteve estável ao longo do tempo (**Fig 12a**). Na presença de MMA, que foi adicionado ao experimento cerca de 10 minutos após seu início, ocorreu um aumento transitório no fluxo de oxigênio (**Fig 12b**), estabilizando-se após alguns minutos. Deste modo, a respiração de repouso não foi afetada pela presença do MMA. O meio de reação foi reoxigenado e em seguida o estímulo máximo da respiração no tecido cerebral foi obtido através da adição de FCCP 250 nM, em torno de 1 hora e 40 minutos de experimento.

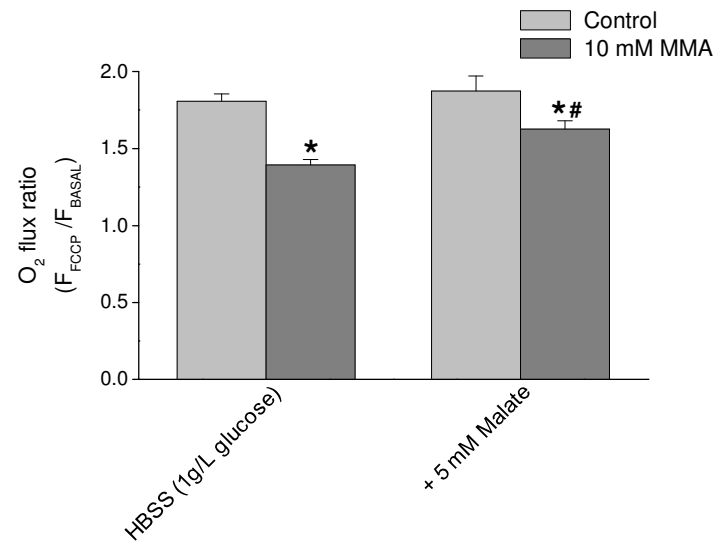
**a**



**b**



**c**



**Fig. 12 - Efeito de MMA no consumo de oxigênio por fragmentos de tecido de cérebro de rato.**

Grupos de 4 fragmentos de cérebro de rato, pesando cerca de 6 mg, e medindo aproximadamente 1 x 1 mm, cada fragmento, foram incubados a 37 °C em meio de reação composto por solução salina balanceada de Hank contendo HEPES 20 mM (HBSS, glicose 1 g/L) sob constante agitação. Os ensaios de respiração foram conduzidos na presença ou ausência de malato 5 mM, e as situações controle e tratada (MMA 10 mM) foram acompanhadas simultaneamente durante o experimento. **Painel a:** Representação de consumo de oxigênio por fragmentos cerebrais. Onde indicado pela seta, FCCP 250 nM foi adicionado, alcançando o máximo estímulo da respiração. **Painel b:** Respiração tecidual na presença de MMA 10 mM, adicionado onde indicado pela seta. **Painel c:** Fluxo de oxigênio nas diferentes condições propostas, com valores expressos como razão ( $F_{FCCP}/F_{BASAL}$ ). Dados representam a média  $\pm$  S.E.M. de pelo menos 5 experimentos independentes realizados em duplicata. \*Significativamente diferente de seu respectivo controle,  $p < 0,05$ . #Significativamente diferente de MMA na ausência de malato,  $p < 0,05$ .

Após o desacoplamento da respiração, observa-se que o MMA causou uma inibição tardia de aproximadamente 23% no fluxo de oxigênio em relação à situação controle, podendo indicar uma menor atividade de componentes da cadeia respiratória ou diminuição no fornecimento de substratos para a oxidação aeróbica. Notadamente, a utilização do malato como substrato reverteu parcialmente o efeito inibitório do MMA no fluxo de oxigênio (**Fig 12c**), suportando a ideia de que o MMA limita a disponibilidade de substratos para a mitocôndria. Nesta condição, a inibição do fluxo pelo MMA foi de 13%. Não houve diferença entre os fluxos de oxigênio nas situações controle, em presença ou ausência de malato.

Os resultados sobre o efeito inibitório de MMA na respiração por fragmentos de cérebro de rato fazem parte do artigo ***“Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia”***, de autoria de D.R. Melo, A.J. Kowaltowski, M. Wajner e R.F. Castilho, publicado na revista *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (volume 43, páginas 39-46, 2011).

#### **4.6. Toxicidade de MMA em linhagem tumoral de células neuronais (PC12)**

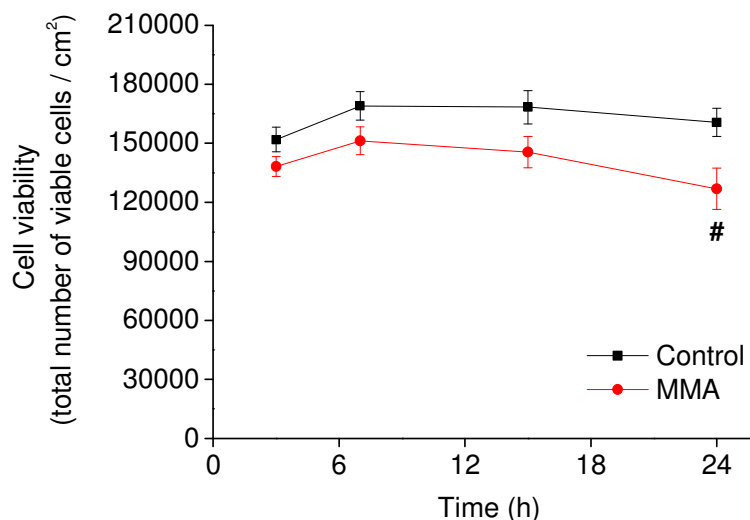
Além do modelo *in situ* (fragmentos de cérebro de rato), a avaliação do comprometimento do metabolismo oxidativo neuronal pelo MMA foi realizada por meio da investigação do efeito citotóxico do MMA em linhagens celulares neuronais e gliais.

Empregando-se células PC12, linhagem neuroendócrina derivada de um tumor das células cromafins da medula adrenal de rato (feocromocitoma), nosso grupo já havia demonstrado anteriormente que o MMA provoca morte celular por induzir a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (Maciel et al., 2004).

Deste modo, com o objetivo de melhor compreender a toxicidade do MMA neste modelo neural clássico, bem como as alterações do metabolismo oxidativo mitocondrial que antecedem o processo de morte celular, o efeito do MMA nas células PC12 foi estudado.

Os resultados da **figura 13** mostram o número total de células PC12 que permaneceram viáveis após incubação em situação controle ou tratada com MMA 10 mM, durante 3, 7, 15 e 24 horas em meio DMEM suplementado apenas com HEPES, sem presença de soros equino e bovino. Após 3 horas de tratamento, a quantidade de células encontrada foi de aproximadamente 150.000 e 140.000 células/cm<sup>2</sup> respectivamente para as condições controle e tratada, com aumento de aproximadamente 45.000 células/cm<sup>2</sup> em relação à quantidade de células plaqueadas (100.000 células/cm<sup>2</sup>) 24 horas antes do início do experimento. Nas 4 horas seguintes, as células continuaram em multiplicação, independentemente da condição estabelecida. O número de células viáveis na situação controle permaneceu estável no tempo de 15 horas em relação ao tempo anterior (7 horas). Já na presença de MMA houve uma tendência à diminuição na quantidade de

células viáveis em relação à situação controle, entretanto não significativa. O tratamento com MMA no tempo final de 24 horas resultou em diminuição significativa da viabilidade celular em relação às células controle incubadas por 24 horas, como evidenciado na **figura 13**.



**Fig. 13 - Efeito de MMA na viabilidade de células PC12.**

Células PC12 ( $1 \times 10^6$ ) foram dispostas em placas de  $9,2 \text{ cm}^2$  em meio DMEM contendo fenol e 4,5 g/L de glicose. O meio foi suplementado com soro equino a 10%, soro fetal bovino a 5% e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  e  $\text{CO}_2$  a 5%. Posteriormente, o meio foi substituído por meio DMEM (4,5 g/L de glicose) suplementado apenas com HEPES 20 mM (pH 7,2), e as células foram incubadas com MMA 10 mM durante 3, 7, 15 ou 24 horas. Na figura são mostrados os valores absolutos de células viáveis encontrados nas situações controle e tratada com MMA nos tempos determinados, após contagem em câmara de *Neubauer* com azul de tripan a 0,1 % em PBS. Na figura, os valores representam a média  $\pm$  S.E.M de pelo menos 4 experimentos independentes. #Significativamente diferente do respectivo controle,  $p < 0,05$ .

Logo após a verificação do tempo máximo da manutenção de viabilidade das células PC12 frente ao tratamento com MMA, a situação dos parâmetros mitocondriais foi examinada nas células PC12 intactas incubadas com MMA.

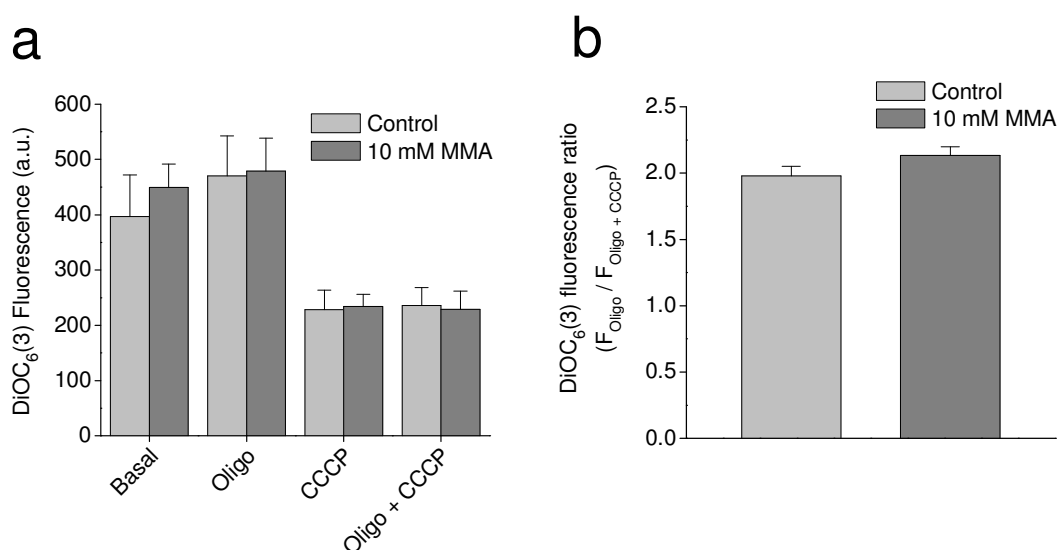
Para a estimativa do potencial de membrana mitocondrial em células PC12 intactas, optou-se pela utilização do tempo fixo de 15 horas de incubação com MMA, por ser o tempo limite entre a manutenção e decréscimo da viabilidade celular. Neste tempo, poderia ser detectada alguma alteração precoce no potencial de membrana mitocondrial, que antecederesse as alterações já relacionadas aos eventos de morte celular.

O marcador fluorescente, catiônico e lipofílico DiOC<sub>6</sub>(3), foi utilizado nas determinações do potencial de membrana mitocondrial nas células PC12 por citometria de fluxo (Shapiro, 2000). Este marcador liga-se a membranas lipídicas que apresentam diferença de potencial elétrico e quando em concentrações não-saturantes liga-se preferencialmente às membranas mitocondriais, devido à maior magnitude de seu potencial elétrico (-180 mV), quando comparado ao potencial da membrana plasmática (-60 mV) (Campos et al, 2004). Primeiramente foi realizada uma titulação prévia de DiOC<sub>6</sub>(3) para se determinar a concentração do marcador a ser empregada nos experimentos. De acordo com o protocolo estabelecido por Rottemberg e Wu (1998) e Campos et al. (2004) encontrou-se que, para células PC12, a concentração ideal de DiOC<sub>6</sub>(3) a ser utilizada é de 3 nM (resultados não mostrados).

A **figura 14a** mostra a fluorescência do marcador obtida nas diferentes condições testadas: células em presença apenas de DiOC<sub>6</sub>(3), na presença do marcador em associação com oligomicina, ou em associação com o desacoplador CCCP. Nota-se que na presença apenas de oligomicina, houve um esperado aumento na fluorescência de DiOC<sub>6</sub>(3) pelo acréscimo no potencial de membrana mitocondrial devido à inibição da



ATP-sintase pela oligomicina. Já o CCCP, na presença de oligomicina ou não, causou diminuição na fluorescência do corante pela dissipação do potencial de membrana nas situações controle e tratada com MMA.



**Fig. 14 - Efeito de MMA no potencial de membrana mitocondrial de células PC12 intactas.**

Células PC12 ( $1 \times 10^6$ ) mantidas em placas de 9,2 cm<sup>2</sup> foram incubadas em meio DMEM suplementado com HEPES 20 mM (pH 7,2) na ausência ou presença de MMA 10 mM durante 15 horas a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5%. Posteriormente, as células foram incubadas em meio contendo DiOC<sub>6</sub>(3) 3 nM e 80 U/mL de DNase na ausência (basal) ou presença de oligomicina 2 µg/mL (Oligo); CCCP 50 µM (CCCP) ou oligomicina juntamente com CCCP (Oligo + CCCP) nas situações controle e tratada com MMA 10 mM. As suspensões celulares foram mantidas sob agitação constante, a 25°C e protegidas da luz durante 40 minutos e em seguida avaliadas por citometria de fluxo. **Painel a:** Intensidade de fluorescência de DiOC<sub>6</sub>(3) nas células PC12 nas situações indicadas. **Painel b:** Razão entre a maior taxa de fluorescência encontrada ( $F_{\text{oligo}}$ ) pela correspondente na presença de CCCP ( $F_{\text{oligo} + \text{CCCP}}$ ), como um parâmetro de estimativa do potencial de membrana mitocondrial. Na figura, os valores representam a média  $\pm$  S.E.M de 6 experimentos independentes.

A razão da fluorescência do DiOC<sub>6</sub>(3) pela fluorescência do DiOC<sub>6</sub>(3) + CCCP corresponde proporcionalmente ao potencial de membrana mitocondrial (Rottemberg e Wu, 1998). Neste caso, devido à maior fluorescência do DiOC<sub>6</sub>(3) na presença de oligomicina, a razão da fluorescência nesta condição pela fluorescência do DiOC<sub>6</sub>(3) em conjunto com oligomicina e CCCP (**figura 14b**) foi considerada para a medida da amplitude do potencial de membrana mitocondrial.

Os resultados da **figura 14b** mostram que não houve diferença significativa entre as razões de fluorescência nas situações testadas, indicando que o MMA não causou alteração nos potenciais de membrana das mitocôndrias de células controle e tratadas com MMA.

Em seguida, foi estabelecida pelo nosso grupo uma metodologia específica para a determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) em células PC12 permeabilizadas, para que posteriormente o efeito do MMA fosse avaliado no potencial de membrana destas células. Esta metodologia faz parte de um capítulo intitulado ***“Safranin as a Fluorescent Probe for the Evaluation of Mitochondrial Membrane Potencial in Isolated Organelles and Permeabilized Cells”***, de autoria de T.R. Figueira, D.R. Melo, A.E. Vercesi, R.F. Castilho, publicado no número “Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols” da série “Methods in Molecular Biology” (volume 810, páginas 103-117, 2012).

Os experimentos para calibração do potencial de membrana foram realizados com 4 concentrações diferentes de células (0,5; 1; 4 e  $12 \times 10^6$  /mL), a 28°C em meio de reação padrão livre de K<sup>+</sup> (pH 7,2), na presença de 9,7 mM de coquetel de substratos para o complexo I e da concentração fixa de 5  $\mu$ M de safranina. Esta concentração foi

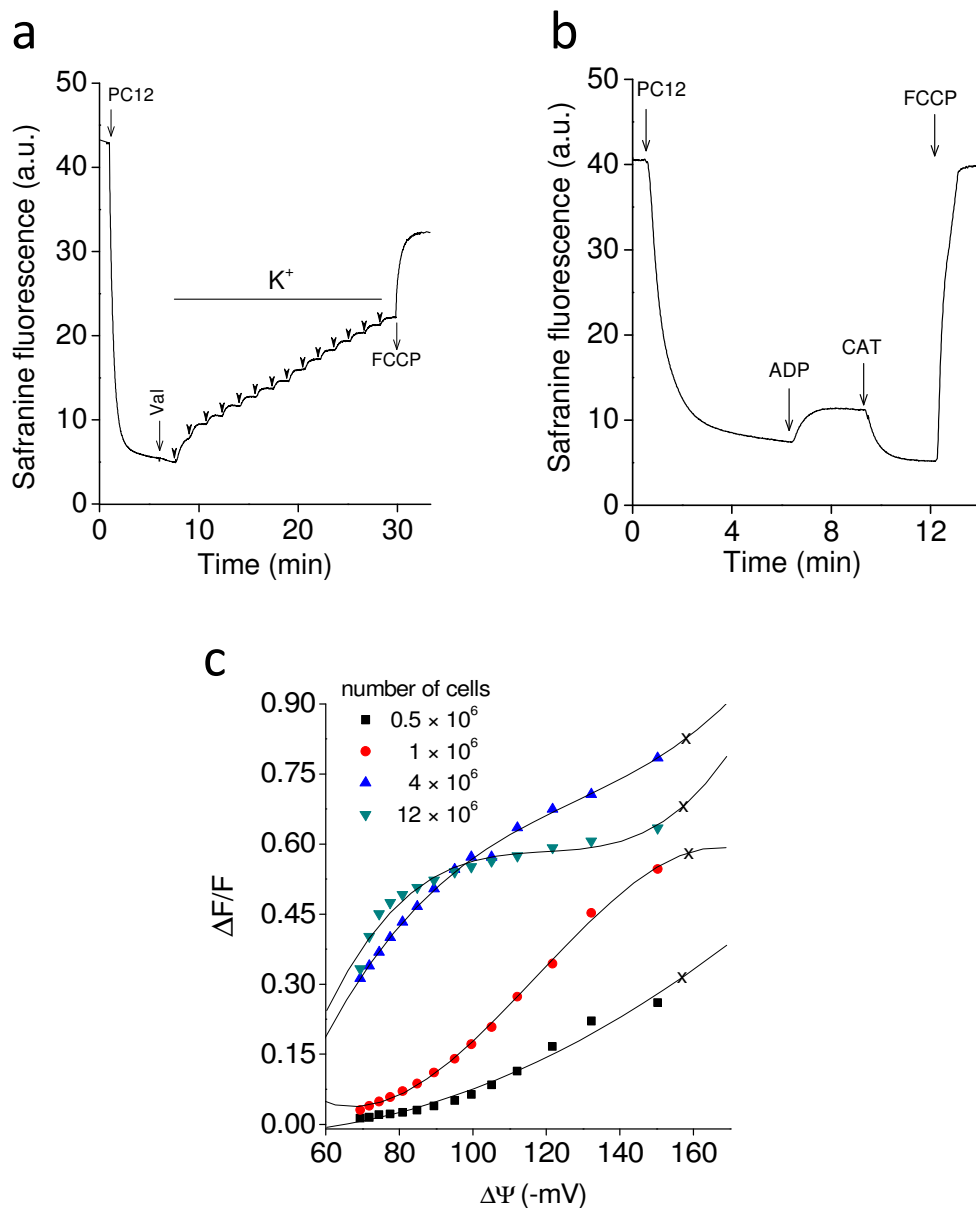
escolhida a partir de padronização prévia com mitocôndrias isoladas de fígado de rato (Figueira et al., 2012).

Após a adição das células, houve uma diminuição na fluorescência da suspensão, proporcional à captação mitocondrial da safranina, acumulada ou ligada à face interna da membrana interna, representando o estabelecimento do potencial de membrana mitocondrial. Seguidamente, foi adicionada a valinomicina 40  $\eta\text{g/mL}$ , ionóforo que apresenta maior afinidade pelo  $\text{K}^+$ , permitindo a calibração do potencial de membrana pela adição de concentrações conhecidas de  $\text{K}^+$ . Foi então realizada a calibração por meio de adições sucessivas e crescentes de  $\text{K}^+$ , resultando na liberação da safranina no meio de reação, com concomitante aumento da fluorescência e decréscimo do potencial de membrana até o seu total colapso pela adição de FCCP 0,5  $\mu\text{M}$  (**Fig. 15a**).

Para validação de nossas determinações de  $\Delta\Psi$  em células permeabilizadas, foram também realizados experimentos acompanhando-se o potencial de membrana com a adição de ADP 400  $\mu\text{M}$ , que causou diminuição do  $\Delta\Psi$  (**Fig. 15b**). O potencial foi totalmente reestabelecido, pela adição de carboxiatractilosídeo (CAT) 10  $\mu\text{M}$ , um inibidor do translocador de nucleotídeos de adenina (ANT). Por fim, a adição de FCCP causou o colapso do potencial de membrana.

Os valores de potencial de membrana após cada adição de  $\text{K}^+$  foram posteriormente calculados, utilizando-se a equação de Nernst e a curva de calibração foi montada. Em seguida,  $\Delta F/F$  foi plotado em função do potencial e, posteriormente, os dados foram ajustados por uma função polinomial (**Fig. 15c**). Nestes experimentos, consideramos “F” como a fluorescência apresentada pela safranina após a adição de FCCP, enquanto “ $\Delta F$ ” foi considerado F menos a fluorescência apresentada após cada

adição de  $K^+$ . A concentração de  $4 \times 10^6$  células/mL foi a que apresentou melhor relação entre os potenciais de membrana e as diferenças de fluorescência obtidas, correspondentes às sucessivas adições de  $K^+$ . Com esta concentração de células obtivemos uma curva de calibração com um perfil mais próximo ao linear.



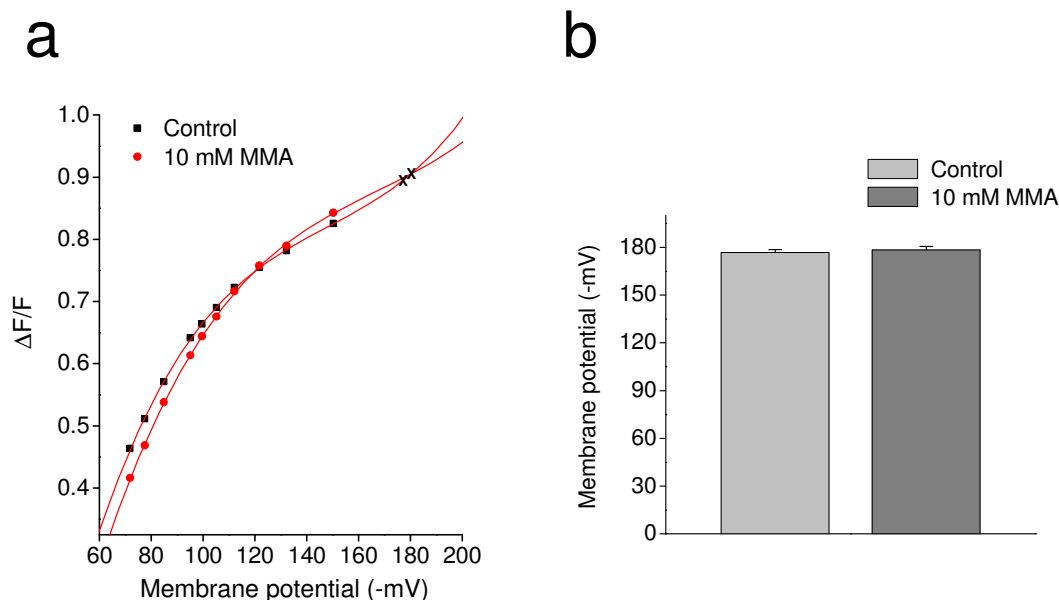
**Fig 15 – Avaliação do uso de safranina para a estimativa de potencial de membrana mitocondrial em células PC12 permeabilizadas.**

Células PC12 (painéis **a** e **b**:  $4 \times 10^6$  /mL; **c**: 0,5 a  $12 \times 10^6$  /mL) foram incubadas a 28°C em meio de reação livre de  $K^+$  e constituído por sacarose 250 mM, EGTA 200  $\mu$ M, BSA 1 mg/mL,  $Na_2HPO_4$  2 mM,  $MgCl_2$  1 mM e HEPES- $Na^+$  10 mM (pH 7,2), na presença de safranina 5  $\mu$ M, digitonina 40  $\mu$ M e de um coquetel de substratos para o complexo I (malato 3,4 mM, glutamato 2,1 mM, piruvato 2,1 mM e  $\alpha$ -cetoglutarato 1,86 mM) totalizando 9,7 mM. **Painel a:** Figura representativa do aumento da fluorescência, com perda de potencial em decorrência de adições crescentes de  $K^+$  (3 adições de 375  $\mu$ M, 4 adições de 500  $\mu$ M e 7 adições de 750  $\mu$ M), sequencialmente totalizando 8,375 mM. Valinomicina (Val) 40 ng/mL e FCCP 0,5  $\mu$ M foram adicionados onde indicado na figura. **Painel b:** Representação do efeito de ADP 400  $\mu$ M, carboxiatractilósídeo (CAT) 10  $\mu$ M e FCCP 1  $\mu$ M no potencial de membrana mitocondrial mantido por células PC12. **Painel c:** Representação do melhor ajuste de  $\Delta\Psi \times \Delta F/F$  para as diferentes concentrações de PC12 utilizadas, com **X** correspondendo ao valor encontrado de potencial de membrana para cada condição antes da adição de  $K^+$ . Os dados foram ajustados por uma função polinomial de 2ª ( $0,5 \times 10^6$  células/mL) e 3ª ordem (1; 4 e  $12 \times 10^6$  células/mL). Os resultados são representativos de 4 experimentos realizados em duplicata. a.u.: Unidades arbitrárias de fluorescência, F: fluorescência na presença de FCCP.  $\Delta F$ : F menos a fluorescência apresentada após cada adição de  $K^+$ .

Nota-se que com a concentração de  $4 \times 10^6$  células/mL observou-se um boa resposta tanto para valores mais baixos (60 mV - 100 mV) como para altos (> 140 mV) de potencial de membrana. Estes resultados não só estabelecem uma metodologia prática e quantitativa para se estimar  $\Delta\Psi$  em suspensões de linhagens de células neuronais, como demonstram também, a grande importância de se determinar condições experimentais adequadas para a medida do mesmo.

Pelo fato de não ter sido observada nenhuma alteração no potencial de membrana mitocondrial em células intactas por meio da citometria de fluxo, decidimos avaliar o  $\Delta\Psi$  empregando o método da safranina O estabelecido para células PC12 permeabilizadas com digitonina após um tempo de exposição ao MMA de 7 horas.

As relações entre os potenciais de membrana e as diferenças de fluorescência obtidas, correspondentes às sucessivas adições de  $K^+$  para as situações controle e tratada com MMA, indicaram perfis bastante semelhantes e próximos ao linear (**figura 16a**). Os valores absolutos de potencial de membrana mitocondrial de repouso estimados após o ajuste pela equação polinomial apresentam-se muito similares (**figura 16b**), indicando que o tratamento com MMA durante 7 horas não foi suficiente para alterar o potencial de membrana mitocondrial de repouso em células PC12 permeabilizadas.



**Fig 16 – Efeito de MMA no potencial de membrana mitocondrial de células PC12 permeabilizadas.**

Células PC12 ( $4 \times 10^6$ ) mantidas em placas de  $22,1 \text{ cm}^2$  foram incubadas em 4 mL de meio DMEM suplementado com HEPES 20 mM (pH 7,2) em situações controle e tratada com MMA 10 mM durante 7 horas. Posteriormente, as células foram ressuspendidas e incubadas ( $4 \times 10^6/\text{mL}$ ) a  $28^\circ\text{C}$  em meio de reação livre de  $\text{K}^+$  constituído por sacarose 250 mM, EGTA 200  $\mu\text{M}$ , BSA 1 mg/mL,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM e HEPES- $\text{Na}^+$  10 mM (pH 7,2), na presença de safranina 5  $\mu\text{M}$ , digitonina 40  $\mu\text{M}$  e de coquetel de substratos para o complexo I (malato 3,4 mM, glutamato 2,1 mM, piruvato 2,1 mM e  $\alpha$ -cetogluturato 1,86 mM) totalizando 9,46 mM.

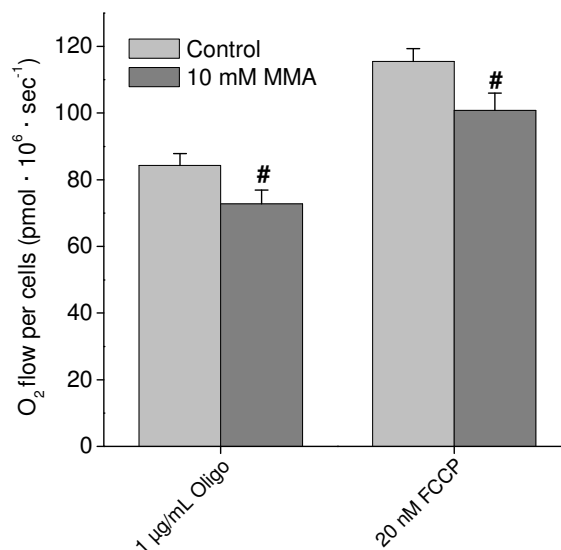
**Painel a:** Representação do melhor ajuste de  $\Delta\Psi \times \Delta F/F$  para as condições controle e tratada com MMA 10 mM, onde **X** corresponde ao valor encontrado de potencial de membrana para cada condição antes da adição de  $\text{K}^+$ . **Painel b:** Valores aproximados de potencial de membrana encontrados para as situações controle e tratada com MMA 10 mM, anteriormente à primeira adição de  $\text{K}^+$ . Os dados foram ajustados por uma função polinomial de 3ª ordem. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. F: fluorescência na presença de FCCP,  $\Delta F$ : F menos a fluorescência apresentada após cada adição de  $\text{K}^+$ .

Anteriormente, mostramos que o efeito inibitório de MMA no consumo de oxigênio por fragmentos de cérebro de rato foi parcialmente revertido por malato. Os experimentos das **figuras 17 e 18** tiveram como objetivo comparar os resultados obtidos com fragmentos de cérebro com experimentos utilizando células PC12. Além disso, em determinadas situações, as medidas de consumo de oxigênio são mais sensíveis que determinações de potencial de membrana mitocondrial (Kowaltowski et al, 2002), o que poderia evidenciar pequenas alterações mitocondriais existentes nas células PC12 tratadas com MMA, que não puderam ser notadas quando o  $\Delta\Psi$  foi investigado.

Para a avaliação da respiração por mitocôndrias de células intactas, os experimentos foram realizados dentro dos mesmos parâmetros experimentais utilizados para avaliação do potencial de membrana mitocondrial, com exceção do uso da digitonina, que neste caso foi suprimido. A respiração das suspensões celulares controle e tratada com MMA 10 mM durante 7 horas foi medida simultaneamente, em meio de reação livre de  $K^+$  na presença de um coquetel de substratos para o complexo I. Na situação controle, a inibição da ATP-sintase pela adição de oligomicina 1  $\mu\text{g/mL}$  diminuiu o fluxo de oxigênio em cerca de 25% em relação a respiração de repouso (**Fig. 17**).

O tratamento com MMA diminuiu significativamente o fluxo de oxigênio em 14% em relação a situação controle, em presença de oligomicina. A adição de FCCP após 12 min estimulou a respiração em aproximadamente 35% em relação à condição controle em presença de oligomicina. Novamente, em presença de MMA foi notada uma inibição significativa de 15% no fluxo de oxigênio na situação de respiração desacoplada, como evidenciado na **figura 17**.





**Fig. 17 - Efeito de MMA no consumo de oxigênio por células PC12 intactas.**

Células PC12 ( $4 \times 10^6$ ) foram incubadas em placas de 22,1 cm<sup>2</sup> em 4 mL de meio DMEM suplementado com HEPES 20 mM (pH 7,2) em situações controle e tratada com MMA 10 mM durante 7 horas. Posteriormente, as células ( $2 \times 10^6$ /mL) foram incubadas a 28°C, sob agitação constante de 200 rpm em 2 mL de meio de reação livre de K<sup>+</sup> constituído por sacarose 250 mM, EGTA 200 µM, BSA 1 mg/mL, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM e HEPES-Na<sup>+</sup> 10 mM (pH 7,2), na presença de um coquetel de substratos para o complexo I (malato 3,4 mM, glutamato 2,1 mM, piruvato 2,1 mM e α-cetoglutarato 1,86 mM) totalizando 9,46 mM. Experimentos nas condições controle e em presença de MMA 10 mM foram conduzidos em paralelo e as câmaras foram mantidas sempre fechadas. Os resultados representam os valores absolutos dos fluxos de oxigênio observados após a adição de oligomicina 1 µg/mL e FCCP 20 nM nas diferentes situações. Dados representam a média ± S.E.M. de 3 experimentos independentes.

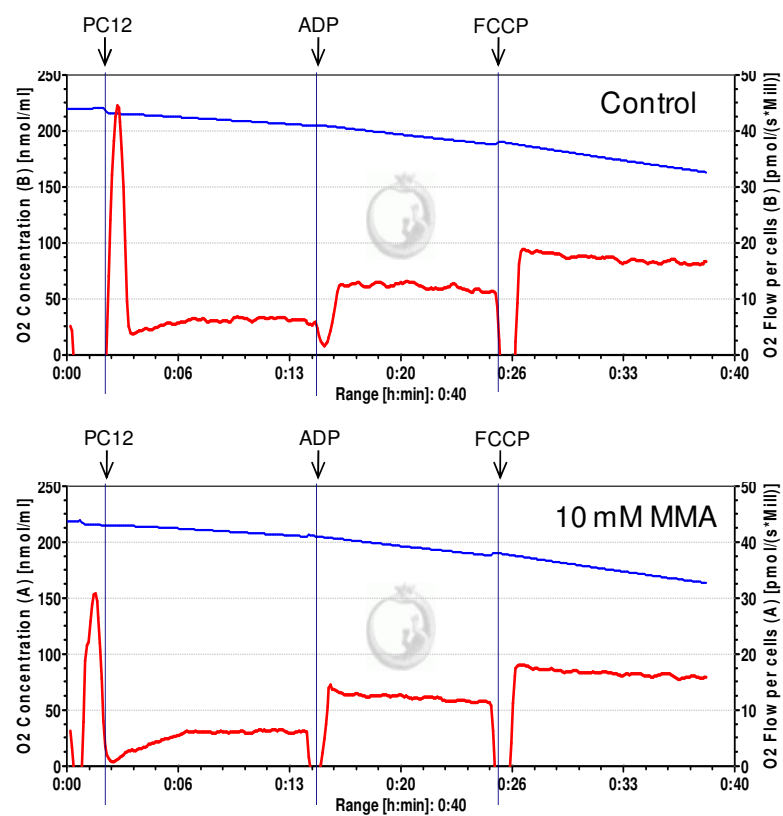
<sup>#</sup>Significativamente diferente do respectivo controle,  $p < 0,05$ .

Em seguida, acompanharam-se as medidas de respiração por mitocôndrias de células PC12 permeabilizadas com digitonina após tratamento com MMA 10 mM, empregando-se os mesmos parâmetros experimentais utilizados nos experimentos de determinação de  $\Delta\Psi$  em PC12 permeabilizadas. O fluxo de consumo de oxigênio inicial se manteve estável ao longo do tempo (**Fig. 18a**) e foi bastante semelhante para as duas situações ( $6,4 \text{ pmol} \times 10^6 \text{ céls}^{-1} \times \text{seg}^{-1}$ ). A presença de ADP 400  $\mu\text{M}$ , que foi adicionado ao experimento aproximadamente 15 minutos após seu início, causou um aumento considerável no fluxo de oxigênio nas duas situações testadas e que permaneceu estável até a adição de FCCP 80 nM. Na presença deste, o estímulo máximo da respiração foi obtido, alcançando aproximadamente  $18,5 \text{ pmol} \times 10^6 \text{ céls}^{-1} \times \text{seg}^{-1}$  para as duas situações (**Fig. 18b**), sendo que não houve diferença significativa entre as células controle e tratadas com MMA, contrastando com o efeito inibitório observado na **Figura 17**.

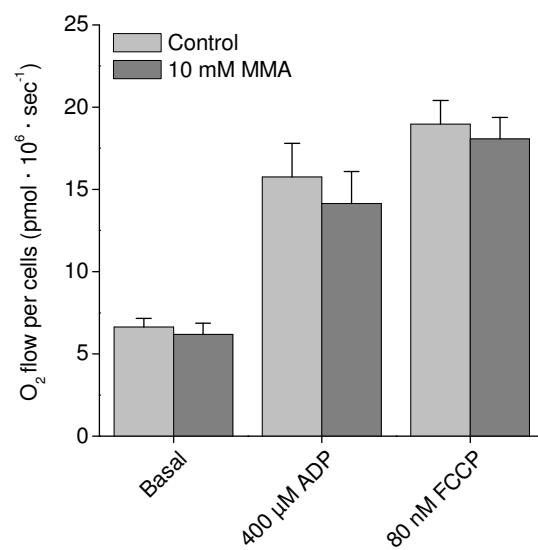
De modo interessante, o efeito inibitório do MMA observado anteriormente na respiração mitocondrial por células PC12 intactas foi perdido após a permeabilização das mesmas. Este efeito sugere que ao se excluir o bloqueio representado pela membrana plasmática, por meio do uso da digitonina, promoveu-se um aumento da disponibilidade de substratos para as mitocôndrias no meio de reação, minimizando o efeito do MMA. Estes resultados estão de acordo a **Figura 11**, na qual foi mostrado que o efeito inibitório de MMA no consumo de oxigênio por fragmentos de cérebro de rato é parcialmente revertido pela suplementação do meio de reação com malato. Isto confirma a possibilidade de que o comprometimento do metabolismo energético neuronal pelo MMA está associado a um suprimento diminuído de substratos para oxidação mitocondrial.

Não foi constatada diferença na atividade de citrato sintase entre as células controle e tratadas com MMA 10 mM (resultados não mostrados).

a



b



**Fig. 18 - Efeito de MMA no consumo de oxigênio por células PC12 permeabilizadas.**

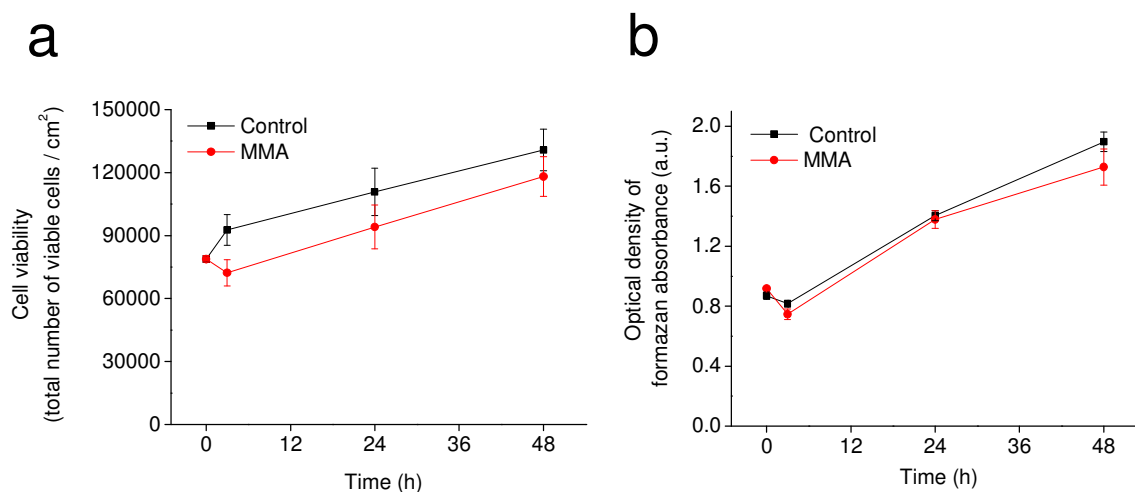
Células PC12 ( $1 \times 10^6$ ) foram incubadas em placas de 22,1 cm<sup>2</sup> em meio DMEM suplementado com HEPES 20 mM (pH 7,2) em situações controle e tratada com MMA 10 mM durante 7 horas. Posteriormente, as células ( $2 \times 10^6$  /mL) foram incubadas a 28°C, sob agitação constante de 200 rpm em 2 mL de meio de reação livre de K<sup>+</sup> constituído por sacarose 250 mM, EGTA 200 µM, BSA 1 mg/mL, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM e HEPES-Na<sup>+</sup> 10 mM (pH 7,2), na presença de digitonina 40 µM e de um coquetel de substratos para o complexo I (malato 3,4 mM, glutamato 2,1 mM, piruvato 2,1 mM e α-cetoglutarato 1,86 mM) totalizando 9,46 mM. Experimentos nas condições controle e em presença de MMA 10 mM foram conduzidos em paralelo e as câmaras foram mantidas sempre fechadas. **Painel a:** Resultados representativos das medidas de concentração (azul) e fluxo (vermelho) de oxigênio por células permeabilizadas sob condições controle e tratada com MMA. Onde indicado, ADP 400 µM foi adicionado para estimular a respiração pela fosforilação oxidativa e FCCP 80 nM foi adicionado para atingir a máxima velocidade de respiração. **Painel b:** Valores absolutos dos fluxos de oxigênio observados nas diferentes condições experimentais. Dados representam a média ± S.E.M. de 3 experimentos independentes.

#### **4.7. Efeito de MMA na viabilidade e morfologia de células gliais**

Considerando que os estudos já publicados apenas abordaram o efeito de MMA em culturas primárias de neurônios (McLaughlin et al., 1998; Okun et al., 2002) ou linhagens de origem neuronal (Maciel et al., 2004; Kowaltowski et al., 2006; **Figs 13, 14 e 16-18** desta Tese), decidimos investigar se haveria a possibilidade de o MMA atuar prejudicando o metabolismo energético mitocondrial de células gliais. Para tanto, utilizamos inicialmente como modelo de estudo a linhagem U-87MG, derivada de células de glioblastoma humano.

Essencialmente, avaliamos a viabilidade destas células após tratamento com MMA 10 mM durante 3, 24 e 48 horas, utilizando 2 métodos diferentes: a contagem das células inviáveis coradas pelo azul de tripan (**Fig. 19a**) e a densidade óptica do formazan produzido nas células viáveis pelo método colorimétrico do MTT (**Fig. 19b**). Quando medida pelo método da contagem no azul de tripan, houve uma tendência de diminuição

da viabilidade na situação tratada com MMA 10 mM, ainda que não significativa (**Fig. 19a**), nos 3 diferentes tempos de tratamento. Já pelo método do MTT, esta tendência permaneceu apenas no tempo mais longo de tratamento (48h) (**Fig. 19b**).



**Fig. 19 - Efeito de MMA na viabilidade de células U-87MG.**

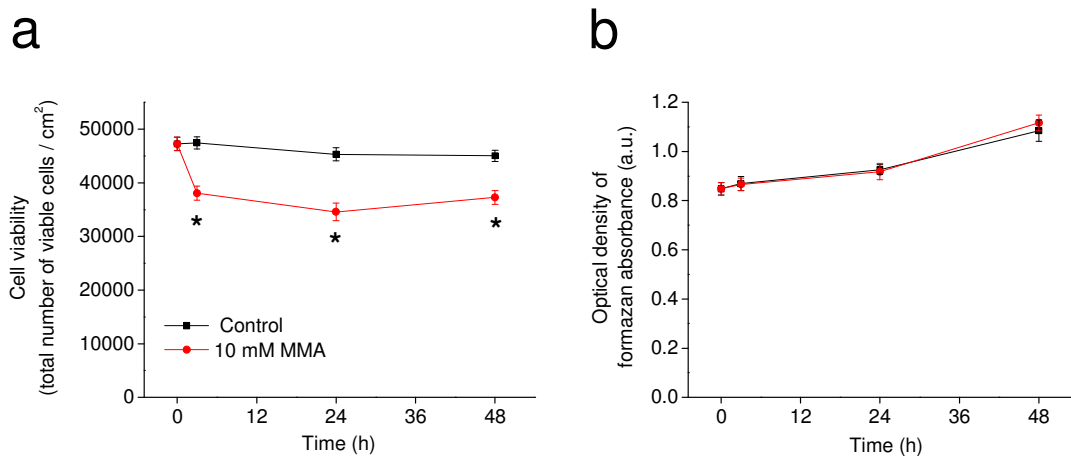
Células U-87MG ( $0,5 \times 10^6$ ) foram dispostas em placas de  $9,2 \text{ cm}^2$  com 2 mL de meio DMEM contendo fenol e 2 g/L de glicose. O meio foi suplementado com soro fetal bovino a 10% e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  e  $\text{CO}_2$  a 5%. Posteriormente, o meio foi renovado e suplementado ainda com HEPES 20 mM (pH 7,2), para incubação das células com MMA 10 mM durante 3, 24 e 48 horas. **Painel a:** Valores absolutos do número de células viáveis encontrados nas situações controle e tratada com MMA nos tempos determinados, após contagem em câmara de *Neubauer* com azul de tripan a 0,1 % em PBS. **Painel b:** valores de absorbância do azul de formazan, originado na reação do MTT, correspondente à viabilidade celular das células U-87MG nas diferentes situações. Os dados representam a média  $\pm$  S.E.M de pelo menos 4 experimentos independentes.

A ausência de efeito citotóxico do MMA na linhagem glial tumoral U-87MG, bem como as sutis alterações promovidas pelo MMA na linhagem neuronal tumoral PC12, indicam a possibilidade de menor sensibilidade das células tumorais frente à toxicidade promovida pelo tratamento com MMA. A resistência de células de origem tumoral ao MMA pode se dever ao fato de que estas células apresentam um metabolismo predominante glicolítico.

Portanto, para dar continuidade ao estudo, foi estabelecida uma cultura primária de astrócitos provenientes de cérebro total de ratos neonatos com 2 dias de idade.

Após o tratamento de astrócitos com MMA 10 mM durante 3, 24 e 48h a viabilidade celular foi avaliada. Quando medida pelo método do azul de Tripán, uma diminuição significativa da viabilidade foi observada nos 3 tempos de tratamento (**Fig. 20a**), enquanto o método do MTT não detectou nem mesmo uma tendência de diminuição na viabilidade das células tratadas com MMA (**Fig. 20b**). Estes resultados contraditórios podem ser explicados pelo tipo do método utilizado para se medir a viabilidade celular.

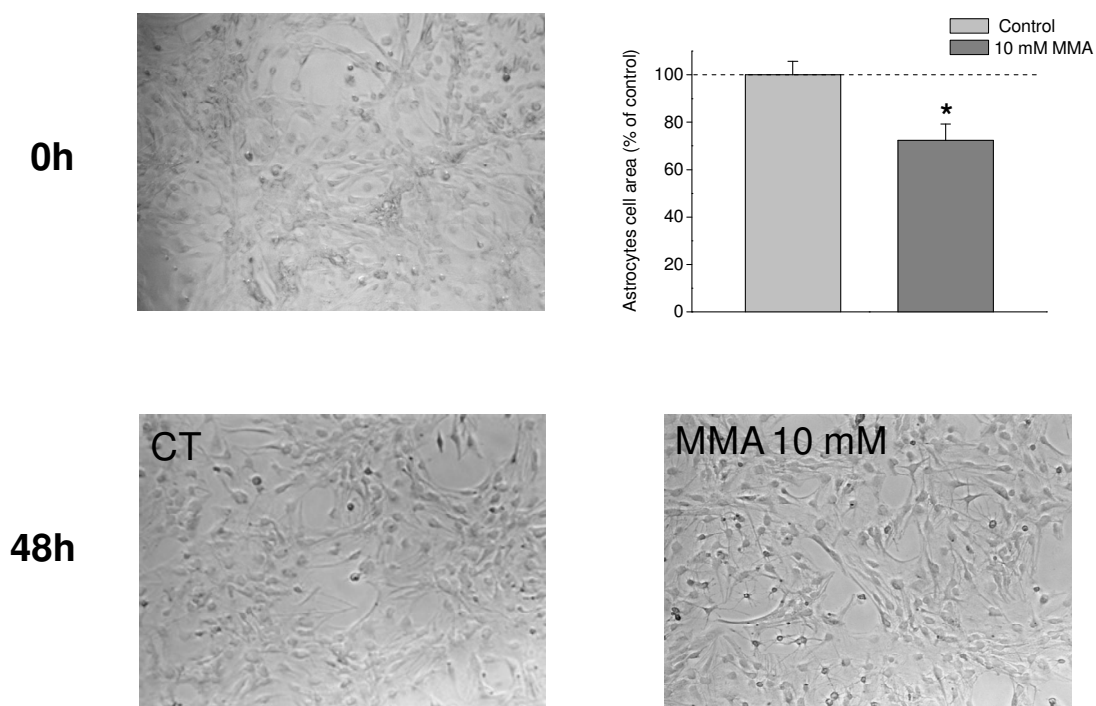
Possivelmente, as células astrócitárias primárias são prejudicadas de alguma forma pelo MMA, talvez até por inibição da atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, e o atrito mecânico proporcionado pelo método do azul de Tripán faz com que estas células, já sensibilizadas, sejam rompidas com maior facilidade e terminem inviáveis.



**Fig. 20 - Efeito de MMA na viabilidade de astrócitos primários.**

Astrócitos primários ( $0.6 \times 10^6$ ) provenientes de ratos neonatos (2d) foram dispostos em placas de  $9,2 \text{ cm}^2$  com 2 mL de meio DMEM contendo fenol e 2 g/L de glicose. O meio foi suplementado com soro fetal bovino a 10% e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  e  $\text{CO}_2$  a 5%. Posteriormente, o meio foi renovado e suplementado ainda com HEPES 20 mM (pH 7,2), para incubação das células com MMA 10 mM durante 3, 24 e 48 horas. **Painel a:** Valores absolutos do número de células viáveis encontrados nas situações controle e tratada com MMA nos tempos determinados, após contagem em câmara de *Neubauer* com azul de tripan a 0,1 % em PBS. **Painel b:** valores de absorbância do azul de formazan, originado na reação do MTT, correspondente à viabilidade celular das células U-87MG nas diferentes situações. Os dados representam a média  $\pm$  S.E.M de pelo menos 4 experimentos independentes. \*Significativamente diferente de seu respectivo controle (tempo 0h),  $p < 0,01$ .

A sensibilidade dos astrócitos primários aos efeitos da incubação com MMA também pode ser evidenciada na **Figura 21**.



**Fig. 21 - Efeito de MMA na morfologia e área de astrócitos primários.**

Astrócitos primários ( $0.3 \times 10^6/\text{mL}$ ) provenientes de ratos neonatos (2d) foram dispostos em placas de  $9,2 \text{ cm}^2$  com 2 mL de meio DMEM contendo fenol e 2 g/L de glicose. O meio foi suplementado com soro fetal bovino a 10% e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), e as células mantidas durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  e  $\text{CO}_2$  a 5%. Posteriormente, o meio foi renovado e suplementado ainda com HEPES 20 mM (pH 7,2), para incubação das células com MMA 10 mM durante 48 horas. Em seguida, os estudos morfológicos foram realizados utilizando-se o contraste de fase óptico e as células foram fotografadas nos tempos: **0h** e **48h** na situação controle ou após tratamento com **MMA 10 mM**. As imagens originais foram ajustadas aumentando-se o contraste. \*Significativamente diferente de CT,  $p < 0,01$ .



Pode-se notar que após o tratamento com MMA 10 mM a morfologia dos astrócitos apresenta-se retraída e com bordas mais espiculadas em relação às células controle (**Fig 21**). Quando a área destas células foi medida, observou-se uma diminuição de quase 30% em relação à situação controle, o que pode representar ainda, uma perda de até 40% em termos de volume celular.

A diferença de sensibilidade encontrada em células tumorais e primárias pode recair sobre o perfil metabólico de cada um destes tipos celulares (Koppenol et al., 2011). As células tumorais possuem um perfil altamente glicolítico, produzindo a maior parte de sua energia pela glicólise seguida pela fermentação láctica. Já as células primárias possuem uma dependência menor em relação à glicólise, porque a geração de energia após este passo ocorre pela oxidação do piruvato, processo mais eficiente. Entretanto, como este processo é dependente do metabolismo oxidativo para ocorrer, o comprometimento do metabolismo energético mitocondrial induzido pelo MMA é suficiente para danificar estas células. No entanto, o mesmo efeito do MMA possivelmente não possa ser evidenciado em células tumorais devido à menor dependência destas células em relação ao metabolismo oxidativo mitocondrial, o que explicaria a menor sensibilidade destas células frente aos efeitos deletérios do MMA.

#### ***4.8. Efeito de MMA na produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs)***

Estudamos ainda se o prejuízo causado pelo MMA no metabolismo neuronal poderia estar associado, além dos fatores acima citados, a um aumento na produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs).

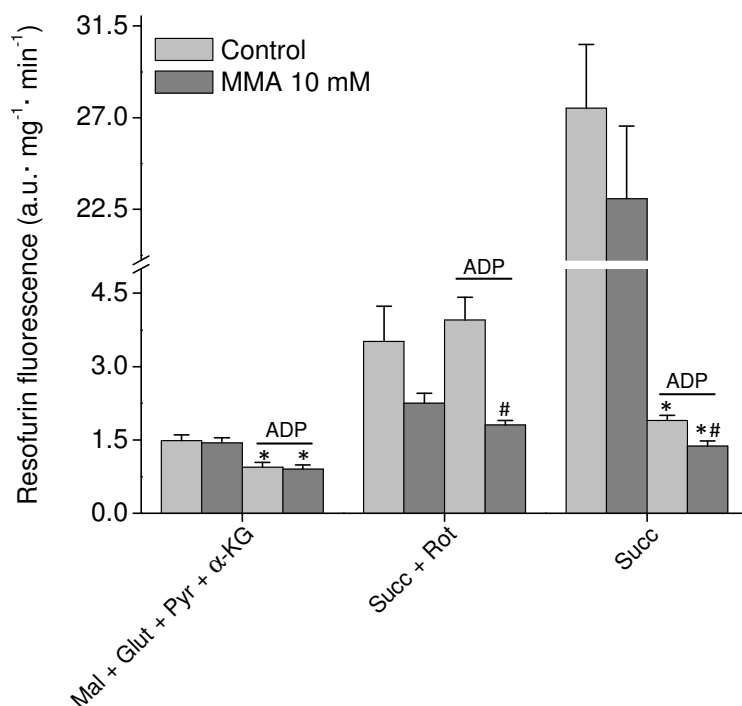
Sabe-se que condições patológicas que levam a baixas taxas respiratórias, frequentemente são acompanhadas por uma produção aumentada de EROs (Sousa e Castilho, 2005). Tal produção constitui um evento importante na patogênese de muitas doenças neurodegenerativas (Betarbet et al., 2000), principalmente devido às altas taxas metabólicas e a capacidade relativamente reduzida de regeneração celular apresentada pelo cérebro, quando comparado a outros órgãos sendo, portanto, mais suscetível aos efeitos danosos de EROs (Andersen, 2004).

Em nossos primeiros resultados sobre o efeito de MMA na respiração de mitocôndrias isoladas, o MMA mostrou ser um potente inibidor da respiração mitocondrial mantida por succinato (**Fig. 2**). Com o objetivo de avaliarmos se tal alteração pode ser acompanhada de uma produção aumentada de EROs, realizamos ensaios *in vitro* para detecção de resofurina, produto fluorescente da reação de peróxido de hidrogênio liberado pela mitocôndria com o marcador não-fluorescente Amplex Red na presença de HRP (peroxidase de raiz forte, tipo VI-A). As medidas foram realizadas em três condições experimentais diferentes: presença de substratos para o complexo I da cadeia respiratória, succinato em conjunto com rotenona e succinato sem rotenona, nas situações controle e na presença de MMA 10 mM, com e sem ADP (**Figura 22**).

Na condição mantida por substratos para o complexo I da cadeia respiratória, a produção de EROs foi pouco expressiva e, na presença de ADP, decaiu para níveis ainda mais baixos, tanto na situação controle como também no tratamento com MMA 10 mM. Entretanto, este não alterou a produção de EROs em ambas condições (com e sem ADP) (**Figura 22**).

O succinato por sua vez, promoveu uma elevada produção de EROs, possivelmente porque na situação de falta de ADP, os elétrons provenientes da

metabolização de succinato podem fluir reversamente para o complexo I, com consequente aumento dos níveis de EROs (Kowaltowski et al, 2009). Estes foram posteriormente diminuídos em cerca de 15 vezes pela adição de ADP, por levar a depleção do gradiente de prótons com consequente inibição da transferência reversa de elétrons (Liu et al., 2002). Nesta mesma condição, o MMA mostrou uma tendência em inibir a produção de EROs quando comparado ao seu respectivo controle.



**Fig. 22 - Efeito de metilmalonato (MMA) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por mitocôndrias de cérebro na presença ou ausência de ADP.**

Mitocôndrias de cérebro total de ratos (0,5 mg/mL) foram incubadas a 37 °C em meio de reação padrão (KCl 130 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EGTA 200 µM, pH 7,2), juntamente com um coquetel de substratos para o complexo I (malato, glutamato, piruvato e α-cetoglutarato; 1,25 mM de cada substrato) ou succinato 5 mM, acompanhado ou não de rotenona 5 µM. Nestas condições, foi utilizada uma concentração fixa de MMA (10 mM), como indicado. O peróxido de hidrogênio formado na presença ou ausência de ADP 800 µM, foi detectado pela reação com Amplex Red 10 µM em conjunto com HRP 1 U/mL. Na figura, os valores são mostrados como unidades arbitrárias de fluorescência da resofurina produzida e, representam a média ± S.E.M de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em duplicata. \*Significativamente diferente da respectiva condição na ausência de ADP, p<0,05. #Significativamente diferente do respectivo controle, p<0,05.

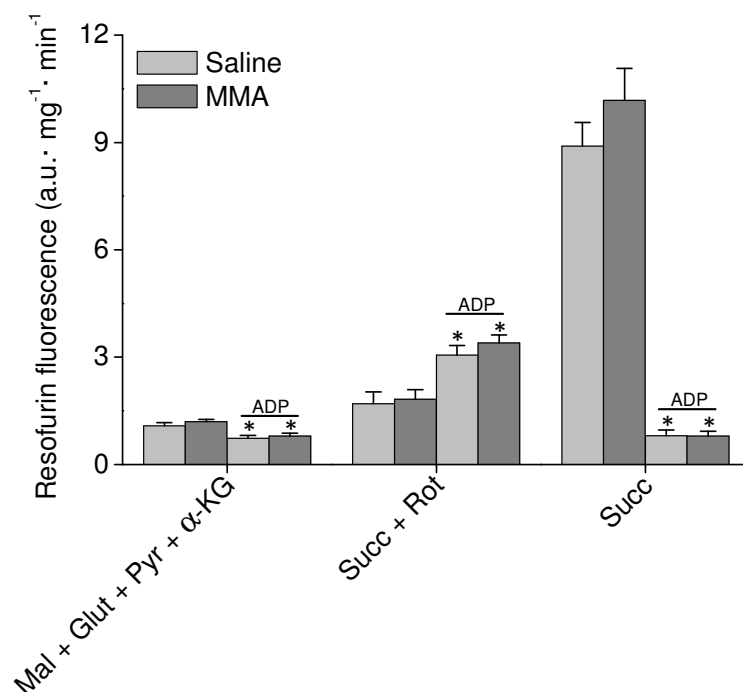
Finalmente, a utilização de rotenona, conhecido inibidor do complexo I da cadeia respiratória, juntamente com succinato, diminuiu a produção de EROs consideravelmente, devido ao bloqueio do fluxo de elétrons para o complexo I. A presença de ADP não afetou a produção de EROs nesta condição. Porém, o MMA mostrou uma tendência em inibir a produção de EROs na ausência de ADP, e na presença deste tal inibição foi significativa (**Figura 22**). Nestas condições, a menor produção de EROs na presença de MMA deve-se provavelmente à inibição da oxidação do succinato pelas mitocôndrias, reduzindo o fluxo de elétrons na cadeia respiratória.

Foi previamente descrito que, em animais cronicamente tratados com MMA, a administração concomitante de ácido ascórbico preveniu os déficits comportamentais apresentados pelos ratos que receberam apenas MMA (Pettenuzzo et al, 2003), relacionando tais mudanças comportamentais com EROs e indicando o envolvimento de estresse oxidativo na neuropatologia da acidemia metilmalônica.

Anteriormente, verificamos que a respiração mitocondrial não foi alterada pelo tratamento *in vivo* crônico com MMA em ratos jovens. Assim, utilizando o protocolo experimental já descrito (Wajner et al., 1988), decidimos avaliar se alguma alteração na liberação mitocondrial de EROs ocorreria como resultado do efeito indireto do tratamento crônico com MMA, de forma a complementar nossos estudos *in vitro* sobre a produção de EROs em mitocôndrias de cérebro de rato.

O tratamento crônico foi realizado por meio da administração intraperitoneal de MMA por 15 dias (2x ao dia). Após o período de tratamento, animais controles e tratados foram sacrificados, sempre 16 h após a última administração de MMA, com o objetivo de evitar o efeito direto da presença deste nas organelas isoladas (Dutra et al., 1991). Em seguida, foi realizado o isolamento de mitocôndrias de cérebro e, posteriormente, a

detecção dos níveis de peróxido de hidrogênio liberado, empregando-se o marcador Amplex Red na presença de HRP.



**Fig. 23 - Efeito do tratamento crônico *in vivo* com MMA na produção de EROs por mitocôndrias de cérebro de ratos jovens na presença ou ausência de ADP.**

Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) de cérebro de ratos jovens tratados cronicamente com MMA foram incubadas a 37 °C em meio de reação padrão (KCl 130 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EGTA 200 µM, pH 7,2), juntamente com um coquetel de substratos para o complexo I (malato, glutamato, piruvato e α-cetoglutarato; 1,25 mM de cada substrato) ou succinato 5 mM, acompanhado ou não de rotenona 5 µM. O peróxido de hidrogênio formado na presença ou ausência de ADP 800 µM, foi detectado pela reação com Amplex Red 10 µM em conjunto com HRP 1 U/mL. Na figura, os valores são mostrados como unidades arbitrárias da fluorescência de resorufina produzida, e representam a média ± S.E.M de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em duplicata. \*Significativamente diferente da respectiva condição na ausência de ADP, p<0,05.

Conforme observado nos experimentos utilizando MMA *in vitro*, em mitocôndrias isoladas de ratos jovens tratados cronicamente com MMA observou-se uma redução por ADP da produção de EROs mantida por substratos do complexo I, mas não houve qualquer efeito do tratamento com MMA. A produção de EROs mantida por succinato na ausência de rotenona foi a mais acentuada, e nesta situação também foi diminuída por ADP, nas condições controle e tratado, que não foram diferentes entre si. Por fim, na presença de succinato e rotenona, que impede a transferência reversa de elétrons, a produção de EROs foi menor, com pequeno estímulo por ADP, mas também sem efeito do tratamento com MMA, como mostrado na **figura 23**.

Recentemente, foi descrito um aumento significativo na produção de EROs em fibroblastos de pacientes com acidemia metilmalônica (Richard et al., 2007). Além disso, num modelo animal para a acidemia metilmalônica constituído de camundongos *knockout* para o gene *mut*, Chandler et al. (2009) observaram um menor conteúdo de glutatona intracelular. De fato, muitos erros inatos do metabolismo têm sido associados com estresse oxidativo, sugerindo que o acúmulo de metabólitos levaria a uma produção excessiva de radicais livres.

Também sugerindo a participação de estresse oxidativo na neurotoxicidade por MMA, McLaughlin et al. (1998) mostraram que a morte de células corticais e estriatais provenientes de cérebro de embriões de rato submetidos a 24 horas de incubação com MMA era atenuada pelo uso de antioxidantes.

Em estudo empregando células PC12, nosso grupo já havia demonstrado que o MMA promove morte celular por induzir a transição de permeabilidade mitocondrial (Maciel et al., 2004). Deste modo, decidimos detectar a liberação de EROs por estas células neuroendócrinas na presença de MMA, com o objetivo de complementar nossos

resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*, bem como, melhor compreender o efeito deste ácido neste modelo neural clássico.

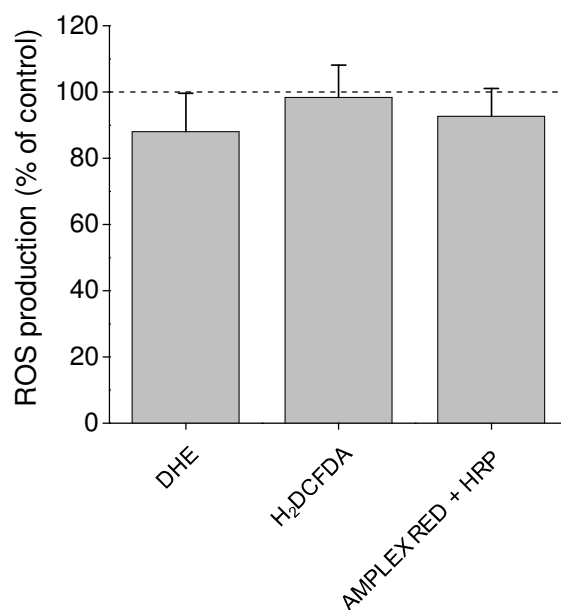
Para estimarmos a liberação de EROs em células PC12, optamos pela utilização de um tempo fixo de 15 horas de incubação com MMA, por ter ainda nesse período apresentado manutenção da viabilidade celular entre controle e tratado com MMA, excluindo assim, a interferência da produção de EROs acionada por eventos já relacionados ao processo de morte celular.

Posteriormente ao período de incubação, as células foram tripsinizadas e ressuspendidas em meio de reação composto por HBSS + HEPES 20 mM. Em seguida, foi realizada a detecção da produção de EROs, durante 15 minutos empregando-se três marcadores diferentes. Amplex Red, na presença de HRP, foi utilizado para detecção da liberação mitocondrial de peróxido de hidrogênio. Foi ainda utilizado o H<sub>2</sub>DCFDA (forma reduzida) permeável e não-fluorescente, que apresenta maior afinidade em reagir com radicais peroxil, hidroxil e peroxinitrito, após deacetilação por esterases intracelulares, sendo convertido em DCF (forma oxidada) não-permeável e fluorescente (Lebel et al., 1992). E por fim, o DHE, também permeável e mais seletivo para o ânion superóxido. O DHE é oxidado em etídio, que acaba intercalando no DNA nuclear, onde permanece e aumenta consideravelmente a fluorescência (Robinson et al., 2006).

Nestes experimentos, nota-se que a produção de EROs como resultado da incubação de células PC12 na presença de MMA durante 15 horas não foi alterada (**Fig. 24**) em relação ao controle, indicando que o aumento na produção de espécies reativas por MMA descrito por alguns grupos (McLaughlin et al., 1998 e Richard et al., 2007) possa estar relacionado já com o período em que há indução de morte celular pelo MMA,



consistindo num efeito secundário deste na produção de espécies reativas e não um evento precoce causado diretamente.



**Fig. 24 - Efeito de MMA na liberação de EROs por células PC12.**

Células PC12 ( $0,5 \times 10^6$  /mL) foram mantidas em placas de  $9,2 \text{ cm}^2$  com 2 mL de meio DMEM contendo fenol, 4,5 g / L de glicose e suplementado com soro equino a 10%, soro fetal bovino a 5% e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  e  $\text{CO}_2$  a 5%. Posteriormente, o meio foi substituído por meio DMEM suplementado apenas com HEPES 20 mM (pH 7,2), e as células foram incubadas com MMA 10 mM durante 3, 15 ou 24 horas. Os valores estão expressos como porcentagens de seus respectivos controles quanto à detecção da presença de espécies reativas, pela oxidação dos marcadores dihidroetidina (DHE) 5  $\mu\text{M}$ , 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) 5  $\mu\text{M}$  e Amplex Red 10  $\mu\text{M}$  + HRP 1U/mL. As medidas foram conduzidas 15 horas depois da incubação com MMA, após ressuspensão das células em solução salina balanceada de Hank (HBSS), sem fenol e suplementada com HEPES 20 mM (pH 7,2). Na figura, os valores representam a média  $\pm$  S.E.M de pelo menos 4 experimentos independentes.



## ***5. Conclusões***

- 5.1** Metilmalonato (MMA) mostrou ser um potente inibidor da respiração mitocondrial mantida pelo substrato succinato, sendo este efeito causado pela inibição do transportador mitocondrial de dicarboxilatos pelo MMA, impedindo a captação de succinato pela mitocôndria. Na presença de um coquetel de substratos para o complexo I da cadeia respiratória, a respiração não foi alterada pelo MMA, indicando que este ácido orgânico não interfere diretamente na atividade dos complexos mitocondriais.
- 5.2** Notadamente, a respiração mitocondrial mantida por glutamato também foi fortemente inibida pelo MMA. Experimentos de transporte mitocondrial de substratos mostraram que MMA extramitocondrial é trocado por  $\alpha$ -cetoglutarato intramitocondrial, depletando a mitocôndria de tal substrato. Ainda, o MMA inibe competitivamente a  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase ( $K_i=3,65 \pm 0,81$  mM). Ambos os processos explicariam a inibição por MMA do metabolismo oxidativo neuronal de glutamato.
- 5.3** O tratamento *in vivo* crônico (15 dias) de ratos jovens com MMA não resultou em alterações mitocondriais permanentes e estruturais. Alterações na bioenergética mitocondrial induzidas por MMA dependem da presença deste no ambiente mitocondrial para ocorrerem.
- 5.4** A inibição induzida pelo MMA da respiração por fragmentos de tecido cerebral foi parcialmente prevenida pela suplementação do meio de reação com malato, suportando a hipótese de que na presença de MMA a disponibilidade de substratos é menor.
- 5.5** Em células tumorais neuronais PC12, o tratamento com MMA durante 7 h diminuiu a respiração em células intactas, mas não em células permeabilizadas incubadas na presença de um coquetel de substratos respiratórios, reforçando a proposta de que o MMA restringe o acesso de substratos para a mitocôndria.
- 5.6** Aditivamente, o MMA inibiu a viabilidade celular de astrócitos primários, mas não de células tumorais de glioblastoma, sugerindo maior resistência destas frente aos efeitos deletérios do MMA, provavelmente devido ao perfil metabólico predominantemente glicolítico das células de origem tumoral. Astrócitos incubados na

presença de MMA apresentaram alterações morfológicas, caracterizadas, sobretudo, por uma diminuição da área destas células.

**5.7** A geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio não foi alterada pelos tratamentos *in vitro* e *in vivo* com MMA. O MMA também não modificou a produção de espécies reativas de oxigênio por células neuronais PC12. O estresse oxidativo promovido por MMA descrito em alguns estudos pode ser um efeito secundário deste ácido orgânico, decorrente de sua citotoxicidade, e não um evento precoce causado diretamente.



## ***6. Referências Bibliográficas***

- Adam-Vizi V, Chinopoulos C (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* **27**: 639-645.
- Åkerman KE, Wikström MK (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* **68**:191-197.
- Albin RL (2000) Basal ganglia neurotoxins. *Neurol Clin* **18**: 665-680.
- Albin RL, Greenamyre JT (1992) Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* **42**: 733-738.
- Amaral AU, Cecatto C, Busanello EN, Ribeiro CA, Melo DR, Leipnitz G, Castilho RF, Wajner M. (2012) Ethylmalonic acid impairs brain mitochondrial succinate and malate transport. *Mol Genet Metab* **105**: 84-90.
- Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* **10**: 18-25.
- Balázs R (1965) Control of glutamate oxidation in brain and liver mitochondrial systems. *Biochem J* **95**: 497-508.
- Baumgartner ER, Viardot C (1995) Long-term follow-up of 77 patients with isolated methylmalonic acidaemia. *J Inherit Metab Dis* **18**: 138-142.
- Beal MF (2005) Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* **58**: 495-505.
- Belisle E, Kowaltowski AJ (2002) Opening of mitochondrial K<sup>+</sup> channels increases ischemic ATP levels by preventing hydrolysis. *J Bioenerg Biomembr* **34**: 285-298.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* **12**: 1301-1306.
- Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* **1758**: 994-1003.
- Boveris A, Cadenas E (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* **54**: 311-314.
- Brand MD, Nicholls DG (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* **435**: 297-312.



- Brismar J, 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, 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.
- Burgeois M, Goutieres F, Chretien D, Rustin P, Munnich A, Aicardi J (1992) Deficiency in complex II of the respiratory chain, presenting as a leukodystrophy in two sisters with Leigh syndrome. *Brain Dev* **14**: 404-408.
- 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 Inherit Metab Dis* **26**: 417-422.
- Campos CB, Degasperis GR, Pacifico DS, Alberici LC, Carreira RS, Guimarães F, Castilho RF, Vercesi AE (2004) Ibuprofen-induced Walker 256 tumor cell death: cytochrome *c* release from functional mitochondria and enhancement by calcineurin inhibition. *Biochem Pharmacol* **68**: 2197-2206.
- Carvalho VM, Kok F (2008) Determination of serum methylmalonic acid by alkylative extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **381**: 67-73.
- Castilho RF, Kowaltowski AJ, Meinicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE (1995) Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by  $\text{Ca}^{2+}$  ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radic Biol Med* **18**:479-486.
- Chandler RJ, Sloan J, Fu H, Tsai M, Stabler S, Allen R, Kaestner KH, Kazazian HH, Venditti CP (2007) Metabolic phenotype of methylmalonic acidemia in mice and humans: the role of skeletal muscle. *BMC Med Genet* **8**:64-75.
- Chandler RJ, Venditti CP (2005) Genetic and genomic systems to study methylmalonic acidemia. *Mol Genet Metab* **86**: 34-43.
- Chandler RJ, Zerfas PM, Shanske S, Sloan J, Hoffmann V, Di Mauro S, Venditti CP (2009) Mitochondrial dysfunction in *mut* methylmalonic acidemia. *FASEB J* **23**: 1252-1261.
- Cheeseman AJ, Clarck JB (1988) Influence of the malate-aspartate shuttle on oxidative metabolism in synaptosomes. *J Neurochem* **50**: 1559-1564.
- Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* **7**: 369-379.

- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* **131**: 1047-1058.
- Contreras L, Satrústegui J (2009) Calcium signaling in brain mitochondria: interplay of malate aspartate NADH shuttle and calcium uniporter/mitochondrial dehydrogenases pathways. *J Biol Chem* **284**: 7091-7099.
- Coulombe JT, Shih VE, Levy HL (1981) Massachusetts Metabolic Disorders Screening Program II. Methylmalonic aciduria. *Pediatrics* **67**: 26-31.
- Daikhin Y, Yudkoff M (2000) Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr* **130**: 1026S-1031S.
- de Keyzer Y, Valayannopoulos V, Benoist JF, Batteux F, Lacaille F, Hubert L, Chrétien D, Chadeafeaux-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, Jiménez-Bernal RE, Rubin MA, Bastiani J, Costa EJM, Wajner M (1996) Intrastriatal methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. *Brain Res* **721**: 120-125.
- Dennis SC, Land JM, Clarck JB (1976) Glutamate metabolism and transport in rat brain mitochondria. *Biochem J* **156**: 323-331.
- Deodato F, Boenzi S, Santorelli FM, Dionisi-Vici C (2006) Methylmalonic and propionic aciduria. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **142**: 104-112.
- Dobson CM, Wai T, Leclerc D, Wilson A, Wu X, Dore C, Hudson T, Rosenblatt D, Gravel R (2002) Identification of the gene responsible for the *cbIA* complementation group of vitamin B12-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 15554-15559.
- Dutra JC, Dutra-Filho CS, Cardozo SE, Wannmacher CMD, 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.
- Dutra JC, Wajner M, Wannmacher CF, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (1991) Effects of methylmalonate and propionate on uptake of glucose and ketone bodies in vitro by brain of developing rats. *Biochem Med Metab Biol* **45**: 56-64.
- Dutra JC, Wajner M, Wannmacher CMD, Wannmacher LE, Pires RF, Rosa-Jr. A (1991) Effects of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. *Braz J Med Biol Res* **24**: 595-605.

- Erecińska M, Zaleska MM, Nissim I, Nelson D, Dagani F, Yudkoff M (1988) Glucose and synaptosomal glutamate metabolism: studies with [15N]glutamate. *J Neurochem* **51**: 892-902.
- Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ (2005) Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels prevent oxidative stress, permeability transition and cell death. *J Bioenerg Biomembr* **37**: 75-82.
- Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS (2001) Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle AD, SlyW (eds) The metabolic and molecular basis of inherited disease, 8<sup>th</sup> edn. McGraw-Hill, New York, pp 2165-2193.
- Fenton WA, Hack AM, Willard HF, Gertler A, Rosenberg LE (1982) Purification and properties of methylmalonyl coenzyme A mutase from human liver. *Arch Biochem Biophys* **214**: 815-823.
- Figueira TR, Melo DR, Vercesi AE, Castilho RF (2012) Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. *Methods Mol Biol* **810**:103-117.
- Fleck J, Ribeiro MC, Schneider CM, Sinhorin VD, Rubin MA, Mello CF (2004) Intrastriatal malonate administration induces convulsive behaviour in rats. *J Inherit Metab Dis* **27**: 211-219.
- Foster A, Fagg G (1984) Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. *Brain Res* **319**: 103-164.
- Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **64**: 97-112.
- Gibson GE, Park LCH, Sheu K-FR, Blass JP, Calingasan NY (2000) The  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration. *Neurochem Int* **36**: 97-112.
- Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A (1998) Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* **273**: 11038-11043.
- Gornal AG, Bardawill CJ, Donid MM (1949) Determination of serum protein by means of the Biuret reaction. *J Biol Chem* **177**: 751-766.
- Haas RH, Marsden DL, Capistrano-Estrada S, Hamilton R, Grafe MR, Wong W, Nyhan WL (1995) Acute basal ganglia infarction in propionic acidemia. *J Child Neurol* **10**: 18-22.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**: 1-14.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1997) Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem* **69**: 1330-1331.

- Halperin ML, Schiller CM, Fritz IB (1971) The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. A possible explanation for hypoglycemia in methylmalonic aciduria. *J Clin Invest* **50**: 2276-2282.
- Harting I, Seitz A, Geb S, Zwickler T, Porto L, Lindner M, Kölker S, Hörster F (2008) Looking beyond the basal ganglia: the spectrum of MRI changes in methylmalonic acidemia. *J Inherit Metab Dis* **31**: 368-378.
- Hassel B, Bråthe A, Petersen D (2002) Cerebral dicarboxylate transport and metabolism studied with isotopically labelled fumarate, malate and malonate. *J Neurochem* **82**: 410-419.
- Hayasaka K, Metoki K, Satoh T, Narisawa K, Tada K, Kawakami T, Matsuo N, Aoki T (1982) Comparison of cytosolic and mitochondrial enzyme alterations in the livers of propionic or methylmalonic acidemia: a reduction of cytochrome oxidase activity. *J Exp Med* **137**: 329-334.
- Heidenreich R, Natowicz M, Hainline BE, Berman P, Kelley RI, Hillman RE, Berry GT (1988) Acute extrapyramidal syndrome in methylmalonic acidemia: "metabolic stroke" involving the globus pallidus. *J Pediatr* **113**: 1022-1027.
- Hertz L (2004) Intercellular metabolic compartmentation in the brain: past, present and future. *Neurochem Int* **45**: 285-296.
- Hoffmann GF, Meier-Augenstein W, Stöckler S, Surtees R, Rating D, Nyhan WL (1993) Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *J Inherit Metab Dis* **16**: 648-669.
- Holloszy J, Oscai LB, Don IJ, Mole PA (1970) Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: Adaptive response to exercise. *Biochem Biophys Res Comm* **40**: 1368-1373.
- Hood D, Zak R, Pette D (1989) Chronic stimulation of rat skeletal muscle induces coordinate increases in mitochondrial and nuclear mRNAs of cytochrome c oxidase subunits. *Eur J Biochem* **179**: 275-280.
- Horster F, Baumgartner MR, Viardot C, Suormala T, Bugard P, Fowler B, Hoffmann GF, Garbade SF, Kolker S, Baumgartner ER (2007) Long-term outcome in methylmalonic acidurias is influenced by the underlying defect (*mut<sup>0</sup>*, *mut<sup>f</sup>*, *cblA*, *cblB*). *Pediatr Res* **62**: 225-230.
- Kahler SG, Sherwood WG, Woolf D, Lawless ST, Zaritsky A, Bonham J, Taylor CJ, Clarke JT, Durie P, Leonard JV (1994) Pancreatitis in patients with organic acidemias. *J Pediatr* **124**: 239-243.
- Kennedy DG, Cannavan A, Molloy A, O'Harte F, Taylor SM, Kennedy S, Blanchflower WJ (1990) Methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) and methionine synthetase (EC 2.1.1.13) in the tissues of cobalt-vitamin B12 deficient sheep. *Br J Nutr* **64**: 721-732.

- Kölker S, Okun JG (2005) Methylmalonic acid-an endogenous toxin? *Cell Mol Life Sci* **62**: 621-624.
- Kölker S, Sauer SW, Surtees RA, Leonard JV (2006) The aetiology of neurological complications of organic acidaemias-a role for the blood-brain barrier. *J Inherit Metab Dis* **29**: 701-704.
- Kölker S, Schwab M, Horster F, Sauer S, Hinz A, Wolf NI, Mayatepek E, Hoffmann GF, Smeitink JA, Okun JG (2003) Methylmalonic acid, a biochemical hallmark of methylmalonic acidurias but no inhibitor of mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* **278**: 47388-47393.
- Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV (2011) Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* **11**: 325-337.
- Kovachy RJ, Copley SD, Allen RH (1983) Recognition, isolation, and characterization of rat liver D-methylmalonyl coenzyme A hydrolase. *J Biol Chem* **258**: 11415-11421.
- Kowaltowski AJ, Cosso RG, Campos CB, Fiskum G (2002) Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. *J Biol Chem* **277**: 42802-42807.
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **4**: 333-343.
- Kowaltowski AJ, Maciel EN, Fornazari M, Castilho RF (2006) Diazoxide protects against methylmalonate-induced neuronal toxicity. *Exp Neurol* **201**: 165-171.
- Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD (2001) Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**: 649-657.
- Krahenbuhl S, Chang M, Brass EP, Hoppel CL (1991) Decreased activities of ubiquinol:ferricytochrome c oxidoreductase (complex III) and ferrocyclochrome c: oxygen oxidoreductase (complex IV) in liver mitochondria from rats with hydroxycobalamin[c-lactam]-induced methylmalonic aciduria. *J Biol Chem* **266**: 20998-21003.
- Lai JCK, Walsh JM, Dennis SC, Clarck JB (1975) Metabolic compartmentation and neurotransmission. In: Berl S, Clarke DD, Schneider DJ (eds.) pp 487-496, Plenum Press, New York.
- Lash LH (2006) Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem Biol Interact* **163**: 54-67.
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (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.

- Ledley FD, Lumetta M, Nguyen PN, Kolhouse JF, Allen RH (1988) Molecular cloning of L-methylmalonyl-CoA mutase: gene transfer and analysis of mut cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 3518-3521.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. (2011) Lehninger: Princípios de Bioquímica, 5ª Edição, Editora Sarvier.
- Leonard JV (1995) The management and outcome of propionic and methylmalonic acidemia. *J Inherit Metab Dis* **18**: 430-434.
- Leonard JV, Walter JH, McKiernan PJ (2001) The management of organic acidemias: the role of transplantation. *J Inherit Metab Dis* **24**: 309-311.
- Liu G, Hinch B, Beavis AD (1996) Mechanisms for the transport of alpha,omega-dicarboxylates through the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* **271**: 25338-25344.
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* **80**: 780-787.
- Maack C, O'Rourke B (2007) Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res Cardiol* **102**: 369-392.
- Maciel EN, Kowaltowski AJ, Schwalm FD, Rodrigues JM, Souza DO, Vercesi AE, Wajner M, Castilho RF (2004) Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by  $\text{Ca}^{2+}$  and respiratory chain complex II inhibition. *J Neurochem* **90**: 1025-1035.
- Marisco PC, Ribeiro MCP, Bonini JS et al (2003) Ammonia potentiates methylmalonate acid-induced convulsions and TBARS production. *Exp Neurol* **182**: 455-460.
- Mayer M (1997) Kainate receptors: Finding homes at synapses *Nature* **389**: 542-543.
- McKenna MC (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res* **85**: 3347-3358.
- McLaughlin BA, Nelson D, Silver IA, Erecinska M, Chesselet MF (1998) Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience* **86**: 279-290.
- Mecha M, Iñigo PM, Mestre L, Hernangómez M, Borrell J, Guaza C (2011) An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. *Protocol Exchange from Nature Protocols* (doi:10.1038/protex.2011.218).
- Melo DR, Kowaltowski AJ, Wajner M, Castilho RF (2011) Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia. *J Bioenerg Biomembr* **43**: 39-46.

- Melo DR, Mirandola SR, Assunção NA, Castilho RF (2012) Methylmalonate impairs mitochondrial respiration supported by NADH-linked substrates: The involvement of mitochondrial glutamate metabolism. *J Neurosci Res* DOI: 10.1002/jnr.23020.
- 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 P (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc* **41**: 445-502.
- Morath MA, Okun JG, Muller IB, et al (2008) Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria – a pathophysiological approach. *J Inherit Metab Dis* **31**: 35-43.
- Murphy GE, Lowekamp BC, Zervas 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.
- Nham SU, Wilkemeyer MF, Ledley FD (1990) Structure of the human methylmalonyl-CoA mutase (*MUT*) locus. *Genomics* **8**: 710-716.
- Nicholls DG (2009) Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* **1787**: 1416-1424.
- Nicholls DG, Budd SL (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* **80**: 315-360.
- Nicholls DG, Ferguson SJ (2002) Bioenergetics, 3<sup>rd</sup> edn, Academic press, London.
- Nicklas WJ, Clarck JB, Williamson JR (1971) Metabolism of rat brain mitochondria. Studies on the potassium ion-stimulated oxidation of pyruvate. *Biochem J* **123**: 83-95.
- Njogu RM, Hoek JB (1983) The effect of inhibitors of glutamate transport on the pathway of glutamate oxidation in rat liver mitochondria. *FEBS Lett* **152**: 222-226.
- Oberholzer VG, Levin B, Burgess EA, Young WF (1967) Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. *Arch Dis Child* **225**: 492-504.
- Ogier de Baulny H, Benoist JF, Rigal O, Touati G, Rabier D, Saudubray JM (2005) Methylmalonic and propionic acidaemias: management and outcome. *J Inherit Metab Dis* **28**: 415-423.
- Ogier de Baulny H, Saudubray JM (2002) Branched-chain organic acidurias. *Semin Neonatol* **7**: 65-74.

- Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* **276**: 38388-38393.
- Okun JG, Hörster F, Farkas LM, Feyh P, Hinz A, Sauer S, Hoffmann 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.
- Ostergaard E, Wibrand F, Orngreen MC, Vissing J, Horn N (2005) Impaired energy metabolism and abnormal muscle histology in *muf* methylmalonic aciduria. *Neurology* **65**: 931-933.
- Pettenuzzo LF, Ferreira GC, Schmidt AL, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M (2006) Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complexes activities in rat tissues. *Int J Dev Neurosci* **24**: 45-52.
- 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.
- Pinar-Sueiro S, Martínez-Fernández R, Lage-Medina S, Aldamiz-Echevarria L, Vecino E (2010) Optic neuropathy in methylmalonic acidemia: the role of neuroprotection. *J Inherit Metab Dis* DOI: 10.1007/s10545-010-9084-8.
- Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* **266**: 22028-22034.
- Reszko AE, Kasumov T, Pierce BA, David F, Hoppel CL, Stanley WC, Des Rosiers C, Brunengraber H (2003) Assessing the reversibility of the anaplerotic reactions of the propionyl-CoA pathway in heart and liver. *J Biol Chem* **278**: 34959-34965.
- Rhee SG, Kim KH, Chae HZ, Yim MB, Uchida K, Netto LE, Stadtman ER (1994) Antioxidant defense mechanisms: a new thiol-specific antioxidant enzyme. *Ann N Y Acad Sci* **738**: 86-92.
- 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.
- Robinson BH, Cooper JM (1970) Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal Biochem* **33**: 390-399.
- Robinson KM, Janes MS, Pehar M, monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide *in vivo* using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 15038-15043.



- Rosenberg LE (1978) In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Frederickson DS (eds) The metabolic basis of inherited disease, 4<sup>th</sup> edn. McGraw-Hill, New York, pp 411-429.
- Rosenthal RE, Hamud F, Fiskum G, Varghese PJ, Sharpe S (1987) Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J Cereb Blood Flow Metab* **7**: 752-758.
- Rothman SM, Olney JW (1987) Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci* **10**: 299-302.
- Rottenberg H and Wu S (1998) Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochim Biophys Acta* **16**: 393-404.
- 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 intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience* **118**: 1079-1090.
- Saad LO, Mirandola SR, Maciel EN, Castilho RF (2006) Lactate dehydrogenase activity is inhibited by methylmalonate in vitro. *Neurochem Res* **31**: 541-548.
- Salvi M, Battaglia V, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pietrangeli P, Marcocci L, Mondovì B, Rossi CA, Toninello A (2007) Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *J Biol Chem* **282**: 24407-24415.
- Santos SS, Gibson GE, Cooper AJL, Denton TT, Thompson CM, Bunik VI, Alves PM, Sonnewald U (2006) Inhibitors of the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex alter [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] glucose and [ $\text{U-}^{13}\text{C}$ ] glutamate metabolism in cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* **83**: 450-458.
- 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, Okun JG, Hoffmann GF, Koelker S, Morath MA (2008) Impact of short- and medium-chain organic acids, acylcarnitines, and acyl-CoAs on mitochondrial energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1777**: 1276-1282.
- Sauer SW, Opp S, Mahringer A, Kamiński MM, Thiel C, Okun JG, Fricker G, Morath MA, Kölker S (2010) Glutaric aciduria type I and methylmalonic aciduria: simulation of cerebral import and export of accumulating neurotoxic dicarboxylic acids in *in vitro* models of the blood-brain barrier and the choroid plexus. *Biochim Biophys Acta* **1802**: 552-560.

- Schapira AH (2010) Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration. *Exp Neurol* **224**: 331-335.
- Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T (2006) Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1762**:164-180.
- Schon EA, Przedborski S (2011) Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* **70**: 1033-1053.
- Schuck PF, Rosa RB, Pettenuzzo LF, Sitta A, Wannmacher CM, Wyse AT, Wajner M (2004) Inhibition of mitochondrial creatine kinase activity from rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* **45**: 661-667.
- Shapiro HM (2000) Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods* **21**: 271-279.
- Shepherd D, Garland PB (1969) The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J* **114**: 597-610.
- Sluse FE, Ranson M, Liébecq C (1972). Mechanism of the exchanges catalysed by the oxoglutarate translocatory of rat heart mitochondria. Kinetics of the exchange reactions between 2-oxoglutarate, malate and malonate. *Eur J Biochem* **25**: 207-217.
- Sousa SC, Castilho RF (2005) Protective effect of melatonin on rotenone plus  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial oxidative stress and PC12 cell death. *Antioxid Redox Signal* **7**: 1110-1116.
- Sweetman L, Williams JC (2001) Branched chain organic acidurias. In: Scriver CR; Beaudet AL; Sly WS; Valle D (eds.): *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Vol. 2 New York: McGraw-Hill (8<sup>th</sup> ed.) Pp. 2155-2157.
- Tamai I, Tsuji A (2000) Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *J Pharm Sci* **89**: 1371-1388.
- Tanpaiboon P (2005) Methylmalonic acidemia (MMA). *Mol Genet Metab* **85**: 2-6.
- Thompson GN, Chalmers RA (1990) Increased urinary metabolite excretion during fasting in disorders of propionate metabolism. *Pediatr Res* **27**: 413-416.
- Thompson GN, Chalmers RA, Walter JH, Bresson JL, Lyonnet SL, Reed PJ, Saudubray JM, Leonard JV, Halliday D (1990) The use of metronidazole in management of methylmalonic and propionic acidemias. *Eur J Pediatr* **149**: 792-796.
- Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Miyatake K, Nakano Y (1995) Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. *J Nutr* **125**: 2846-2850.

- Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Pezacka EH, Jacobsen DW, Miyatake K, Nakano Y (1996) Accumulation of methylmalonic acid caused by vitamin B12-deficiency disrupts normal cellular metabolism in rat liver. *Br J Nutr* **75**: 929-938.
- 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.
- Turrens, JF (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* **17**: 3-8.
- Utter MF, Keech DB, Scrutton MC (1964) A possible role for acetyl CoA in the control of gluconeogenesis. *Adv Enzyme Regul* **2**: 49- 68.
- Valayannopoulos V, Hubert L, Benoist JF, Romano S, Arnoux JB, Chrétien D, Kaplan J, Fakhouri F, Rabier D, Rötig A, Lebre AS, Munnich A, de Keyzer Y, de Lonlay P (2009) Multiple OXPHOS deficiency in the liver of a patient with *CblA* methylmalonic aciduria sensitive to vitamin B12. *J Inherit Metab Dis* **32**: 159-162.
- Venditti CP (2005) Methylmalonic acidemia. In: GeneReviews at GeneTests, University of Washington, Seattle: Medical Genetics Information Resource. [database online at <http://www.genetests.org>].
- Wajner M, Brites EC, Dutra JC, Buchalter MS, Pons AH, Pires RF, Wannmacher LE, Rosa-Jr A, Trindade VM, Wannmacher CMD (1988) Diminished concentrations of ganglioside-N-acetylneuraminic acid (G-NeuAc) in cerebellum of young rats receiving chronic administration of methylmalonic acid. *J Neurol Sci* **85**: 233-238.
- Wajner M, Coelho JC (1997) Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production. *J Inherit Metab Dis* **20**: 761-768.
- Wajner M, Dutra JC, Cardozo SE, Wannmacher CMD, Motta ER (1992) Effect of methylmalonate on *in vivo* lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. *J Inherit Metab Dis* **15**: 92-96.
- Wajner M, Goodman SI (2011) Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies. *J Bioenerg Biomembr* **43**: 31-38.
- Williams RS, Salmons S, Newsholme E, Kaufman RE, Mellor J (1986) Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* **261**: 376-380.

- Yannicelli S (2006) Nutrition therapy of organic acidaemias with amino acid-based formulas: emphasis on methylmalonic and propionic acidaemia. *J Inherit Metab Dis* **29**: 281-287.
- Yu AC, Schousboe A, Hertz L (1982) Metabolic fate of  $^{14}\text{C}$ -labeled glutamate in astrocytes in primary cultures. *J Neurochem* **39**: 954-960.
- Zhang X, Vincent AS, Halliwell B, Wong KP (2004) A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* **279**: 43035-43045.
- Zhou MJ, Diwu ZJ, PanchukVoloshina N, Haugland RP (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem* **253**: 162-168.

## ***7. Anexos***

## ***7.1 Principais artigos relacionados à Tese***

**Artigo I:** Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia.

Autores: Daniela R. Melo, Alicia J. Kowaltowski, Moacir Wajner e Roger F. Castilho

Revista: Journal of Bioenergetics and Biomembranes 43: 39-46, 2011.

**Artigo II:** Methylmalonate impairs mitochondrial respiration supported by NADH-linked substrates: The involvement of mitochondrial glutamate metabolism.

Autores: Daniela R. Melo, Sandra R. Mirandola, Nilson A. Assunção e Roger F. Castilho

Revista: Journal of Neuroscience Research (2012 - doi: 10.1002/jnr.23020).

## Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia

Daniela R. Melo · Alicia J. Kowaltowski ·  
Moacir Wajner · Roger F. Castilho

Published online: 27 January 2011  
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** Methylmalonic acidemia is one of the most prevalent inherited metabolic disorders involving neurological deficits. *In vitro* experiments, animal model studies and tissue analyses from human patients suggest extensive impairment of mitochondrial energy metabolism in this disease. This review summarizes changes in mitochondrial energy metabolism occurring in methylmalonic acidemia, focusing mainly on the effects of accumulated methylmalonic acid, and gives an overview of the results found in different experimental models. Overall, experiments to date suggest that mitochondrial impairment in this disease occurs through a combination of the inhibition of specific enzymes and transporters, limitation in the availability of substrates for mitochondrial metabolic pathways and oxidative damage.

**Keywords** Central nervous system · Methylmalonic acid · Mitochondria · Neurodegeneration · Organic acidemias · Oxidative metabolism

### Introduction

Methylmalonic acidemia consists of a group of autosomal recessive genetic disorders affecting catabolic pathways of the branched chain aminoacids isoleucine, valine, methionine and threonine, as well as thymine, odd carbon number fatty acids and the side chain of cholesterol. Methylmalonic acidemia is usually caused by mutations in the *MUT* gene (609058) that lead to partial (*mut*<sup>-</sup>) or complete (*mut*<sup>o</sup>) deficiency in the activity of methylmalonyl-CoA mutase (MCM, EC 5.4.99.2), a mitochondrial matrix enzyme that catalyses the conversion of L-methylmalonyl-CoA to succinyl-CoA (Fenton et al. 2001; Tanpaiboon 2005; Venditti 2005). In addition, defects in the synthesis of 5'-deoxyadenosyl cobalamin (AdoCbl), a vitamin B<sub>12</sub>-derived cofactor required for MCM activity, or failure in the metabolism of cobalamin itself can promote a functional deficiency of this enzyme, also resulting in methylmalonic acidemia. Methylmalonyl-CoA, among other metabolites, accumulates in the mitochondrial matrix as a result of MCM deficiency. Methylmalonyl-CoA is subsequently hydrolyzed to CoA and methylmalonic acid (MMA) (Kovachy et al. 1983; Fenton et al. 2001; Chandler and Venditti 2005).

One in 48,000 newborns in the United States is estimated to be affected by methylmalonic acidemia (Coulombe et al. 1981), while incidences range from 1:115,000 in Italy to 1:169,000 in Germany (Deodato et al. 2006). Generally, *mut*<sup>-</sup> patients and those with AdoCbl synthesis defects present good clinical responses when supplemented with vitamin B<sub>12</sub>, while *mut*<sup>o</sup> patients are not responsive, constituting the most severe phenotype of the disease (Tanpaiboon 2005; Deodato et al. 2006).

MMA is produced within tissues and transported to the plasma and cerebrospinal fluid, where it can reach high

---

D. R. Melo · R. F. Castilho (✉)  
Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências  
Médicas, Universidade Estadual de Campinas,  
13083-887, Campinas, SP, Brazil  
e-mail: roger@fcm.unicamp.br

A. J. Kowaltowski  
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química,  
Universidade de São Paulo,  
São Paulo, SP, Brazil

M. Wajner  
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre, RS, Brazil

levels during periods of metabolic decompensation (Fenton et al. 2001). The upper reference values for MMA are 4 mmol/mol creatinine in the urine, 0.27  $\mu\text{mol/L}$  in the blood and 0.59  $\mu\text{mol/L}$  in the cerebrospinal fluid. In severely affected individuals, MMA concentrations lie in the range of 1,000–10,000 mmol/mol creatinine in the urine and 220–2,900  $\mu\text{mol/L}$  in the blood (Fenton et al. 2001; Venditti 2005). MMA varies from tens to hundreds mmol/mol creatinine in the urine and 5 to 100  $\mu\text{mol/L}$  in the blood for B<sub>12</sub>-responsive patients (Venditti 2005). MMA concentrations in the cerebrospinal fluid of patients are similar to those found in blood but can reach even higher levels (Rosenberg 1978; Hoffmann et al. 1993).

MMA is predominantly produced in the liver and kidneys because of the high methylmalonyl-CoA mutase activity in these organs (Fenton et al. 1982; Kennedy et al. 1990). MMA may also be produced in the skeletal muscle and brain (Chandler et al. 2007). Although low amounts of MMA are generated in the brain, the neurodegeneration in methylmalonic acidemia possibly results from intracerebral accumulation of this metabolite (Kölker et al. 2006). The blood–brain-barrier is virtually impermeable to dicarboxylic acids such as MMA (Hoffmann et al. 1993), trapping these compounds within the central nervous system (Kölker et al. 2006). Many transport systems have been reported for monocarboxylic acids and aminoacids (Tamai and Tsuji 2000), whereas dicarboxylic acids have a limited flux in and out of the central nervous system (Hassel et al. 2002; Sauer et al. 2006). In fact, only a weak expression of the organic anion transporters 1 and 3 (OAT1 and OAT3) for dicarboxylic acids was identified in brain capillary endothelial cells (Sauer et al. 2010).

A substantial body of evidence suggests that neurodegeneration in methylmalonic acidemia is associated with a failure of mitochondrial oxidative metabolism. In fact, disruption of mitochondrial homeostasis has been proposed to take part in the mechanism of tissue damage in several organic acidemias, as reviewed by Wajner and Goodman in this issue (Wajner and Goodman 2011).

Patients with methylmalonic acidemia usually present acute clinical features early in life resulting from metabolic decompensation, with recurrent vomiting, dehydration, respiratory distress and neurological symptoms, including psychomotor delay, irritability, lethargy, hypotonia, convulsions and coma. Without specific therapy, these episodes result in severe handicap or death. Most children survive the first acute metabolic crisis, but develop long-term complications including neurological deficits (Baumgartner and Viardot 1995; Leonard 1995; Horster et al. 2007). Although the brain neuropathological findings are nonspecific, patients often develop acute extrapyramidal signs due to bilateral destruction of the *globus pallidus*, which has been attributed to the accumulation of toxic metabolites

(Heidenreich et al. 1988; Fenton et al. 2001; Harting et al. 2008). Remarkably, the *globus pallidus* is highly vulnerable to hypoxic or ischemic damage, also observed in carbon monoxide and cyanide intoxication and in some organic acidemias involving energy metabolism impairment such as propionic acidemia and mitochondrial encephalopathy (Burgeois et al. 1992; Brismar and Ozand 1994; Haas et al. 1995; Albin 2000). Elevation of lactic acid in the *globus pallidus* and in cerebrospinal fluid was observed in patients with methylmalonic acidemia during metabolic decompensation, indicating an impairment of mitochondrial pyruvate oxidation (Trinh et al. 2001). Therefore, it may be presumed that bioenergetic defects are associated with neurodegeneration in methylmalonic acidemia. Interestingly, a recent study showed a significantly and long-term improvement of optic neuropathy in a patient with methylmalonic acidemia under coenzyme Q10 and alpha-tocopherol therapy (Pinar-Sueiro et al. 2010).

Additional evidence that patients with methylmalonic acidemia present impairment of mitochondrial oxidative metabolism is the urinary excretion and accumulation of large amounts of lactic acid and citric acid cycle intermediates in the blood (Fenton et al. 2001). Findings of mitochondrial abnormalities, reduced oxygen uptake, low activities of cytochrome *c* oxidase and of other respiratory chain enzyme complexes were observed in various tissues from methylmalonic acidemic patients (Hayasaka et al. 1982; Ostergaard et al. 2005; Chandler et al. 2009; de Keyzer et al. 2009).

The next sections of this review will describe several toxic effects of MMA and related metabolites on mitochondrial functions and their relationship with the neurodegeneration found in different *in vitro* and *in vivo* experimental models for methylmalonic acidemia.

#### On the toxic role of accumulated metabolites in methylmalonic acidemia

Systemic and neurological manifestations in methylmalonic acidemia are thought to be associated with the accumulation of MMA in tissues and biological fluids and the consequent impairment of energy metabolism and redox imbalance (Wajner and Coelho 1997; Fenton et al. 2001; Morath et al. 2008; Chandler et al. 2009). The reported effects of MMA on mitochondrial function are primarily related to the inhibition of enzymatic activities and transport systems (Halperin et al. 1971; Dutra et al. 1993; Toyoshima et al. 1995; Wajner and Coelho 1997; Brusque et al. 2002; Maciel et al. 2004; Schuck et al. 2004; Pettenuzzo et al. 2006; Mirandola et al. 2008; Morath et al. 2008). Most MMA effects on these systems present competitive inhibitory characteristics. Interestingly, mito-



chondria have the property to take up and accumulate exogenous MMA, leading to 3–9 times higher MMA concentrations within the mitochondrial matrix than in the extramitochondrial environment (Toyoshima et al. 1995; D. R. Melo and R. F. Castilho, unpublished results). This may be a reason why these organelles are more prone to the toxic effects of MMA.

It has also been argued that MMA is not the major toxic metabolite in methylmalonic acidemia and that part of the pathophysiology of this disease can be ascribed to other accumulated metabolic intermediates (Okun et al. 2002; Kölker et al. 2003; Kölker and Okun 2005). In addition to MMA, patients with methylmalonic acidemia present elevated levels of propionic, 3-hydroxypropionic, malonic and 2-methylcitric acids, as well as propionylglycine and butanone (Fenton et al. 2001; Kölker and Okun 2005). Malonic acid is a competitive inhibitor of mitochondrial complex II and could explain tissue lesions observed in the disease, considering it is formed in reasonable amounts (Okun et al. 2002). 2-Methylcitric acid, propionic acid and propionyl-CoA have also been ascribed to take part in tissue degeneration, although the high [D-methylmalonyl-CoA]/[propionyl-CoA] thermodynamic equilibrium ratio precludes a significant production of these compounds (Reszko et al. 2003). For further discussions regarding the toxicity of 2-methylcitric, malonic and propionic acids and propionyl-CoA in methylmalonic acidemia, we recommend reviews by Kölker and Okun (2005) and Morath et al. (2008).

Metabolic derangement in methylmalonic acidemia was also suggested to occur due to trapping of CoA as methylmalonyl-CoA, producing a general inhibition of oxidative metabolism (Fenton et al. 2001). Methylmalonyl-CoA may also be toxic in itself: Utter et al. (1964) showed that this metabolite is a competitive inhibitor of pyruvate carboxylase. However, Sauer et al. (2008) did not observe inhibitory effects of methylmalonyl-CoA (up to 1 mM) on complexes I–V of the mitochondrial respiratory chain, and only a minor inhibition of pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenases activities was detected.

#### **Impairment of mitochondrial energy metabolism in *in vitro* methylmalonic acidemia models**

Oberholzer et al. (1967) first proposed that inhibition of pyruvate carboxylase by methylmalonyl-CoA could promote diminished gluconeogenesis and the inability to maintain blood glucose levels. Indeed, hypoglycemia is present in a considerable number of patients with methylmalonic acidemia. Shortly after, results by Halperin et al. (1971) highlighted an alternate site for gluconeogenesis inhibition in methylmalonic acidemia, which involves

MMA-inhibited malate transport by the mitochondrial dicarboxylate carrier. In fact, MMA itself can be transported by all three mitochondrial carrier systems for malate: the dicarboxylate, tricarboxylate and  $\alpha$ -ketoglutarate transport carriers (Halperin et al. 1971). In addition, the same work suggested an inhibitory effect of MMA on succinate dehydrogenase (SDH), a component of the mitochondrial respiratory chain and citric acid cycle.

Initial experiments suggesting MMA was a weak competitive SDH inhibitor were conducted using isolated brain and liver mitochondria (Dutra et al. 1993; Toyoshima et al. 1995). This effect was attributed to the structural similarity between this compound, malonate (a classical SDH inhibitor), and succinate. Nonetheless, the inhibitory effect of MMA on SDH activity was not detected in purified submitochondrial particles (Okun et al. 2002; Kölker et al. 2003). Furthermore, we recently reported that MMA does not inhibit succinate-supported oxygen consumption in permeabilized mitochondria or inverted submitochondrial particles (Mirandola et al. 2008) and provided evidence that MMA is a potent inhibitor of mitochondrial succinate transport by the dicarboxylate carrier. Therefore, this explains the inhibitory effect of MMA on succinate-supported oxygen consumption in intact isolated mitochondria.

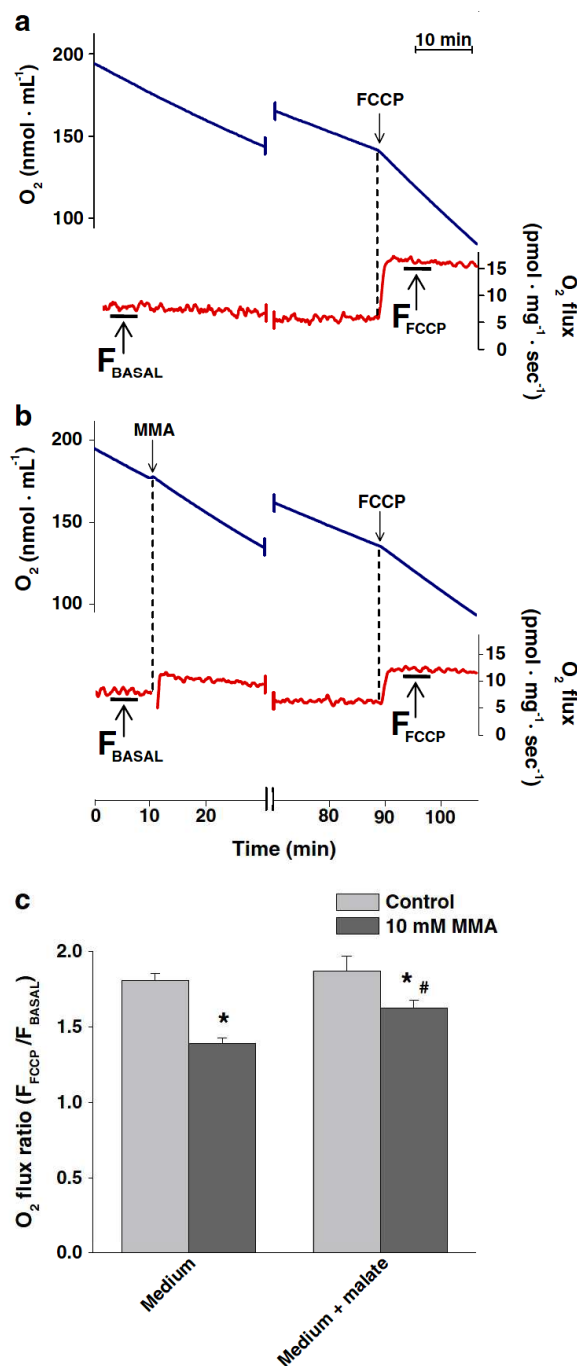
In liver and kidney, the mitochondrial dicarboxylate carrier is important for gluconeogenesis, promoting malate transport from mitochondria to the cytosol, while its role in brain mitochondria is less understood. The brain mitochondrial dicarboxylate carrier is probably associated with the supply of intermediates to the citric acid cycle expended during *de novo* glutamate synthesis (Hertz 2004). In addition, neurons are considered incapable of *de novo* synthesis of oxaloacetate, which requires pyruvate carboxylation, occurring only in astrocytes (Yu et al. 1983). In this regard, neuronal energy metabolism and glutamatergic neurotransmission may be compromised by high concentrations of MMA. In addition, mitochondrial dicarboxylate carrier inhibition by MMA may also inhibit glutathione transport into mitochondria (Lash 2006; Morath et al. 2008), leading to mitochondrial antioxidant defense depletion and redox imbalance, which may be related to the glutathione deficiency observed in methylmalonic acidemia (Treacy et al. 1996). Furthermore, several studies show that MMA elicits lipid peroxidation in cerebral tissues, suggesting that redox processes take part in the neurological dysfunction found in methylmalonic acidemia (Fontella et al. 2000; Figuera et al. 2003; Malfatti et al. 2003; Wajner et al. 2004).

When evaluating the effects of MMA on oxygen consumption in diced rat brains we observed a delayed inhibition of uncoupled respiration (Fig. 1), with no change in resting respiration. These results indicate either a

**Fig. 1** Malate partially prevents the inhibitory effect of MMA on oxygen consumption in diced rat forebrain. Rat forebrains (brain minus cerebellum and brainstem) were diced into pieces of approximately 1 mm<sup>3</sup> using a tissue chopper (McIlwain Tissue Chopper), suspended in standard medium (Hank's balanced salt solution containing 1 g/L glucose and 20 mM HEPES, pH 7.2), kept over an ice bath and used within 4 h. For each experiment, four forebrain pieces weighing about 6 mg were incubated in standard medium at 37 °C under constant stirring (200 rpm) in a 2 mL sealed chamber of a high-resolution respirometer (OROBOROS Oxygraph-2k). The graphs in Panels A and B present a 40 min gap starting at minute 30 for clarity. To avoid anoxia, medium reoxygenation was promoted at 60 min by keeping the chamber open for 8 min. **Panel a:** Representative results for oxygen concentration (blue) and flux (respiration, red) measurements when brain pieces were incubated under control conditions, in the absence of malate. Where indicated by the arrow, the protonophore p-trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenyl hydrazine (FCCP; 250 nM) was added to achieve the maximum respiratory rate. **Panel b:** 10 mM MMA was added where indicated by the arrow. **Panel c:** Oxygen flux ratios between FCCP-induced uncoupled ( $F_{\text{FCCP}}$ ) and basal respiration ( $F_{\text{BASAL}}$ ) under different experimental conditions. Respiratory assays were conducted in the presence or absence of 5 mM malate and/or 10 mM MMA, as indicated. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. of at least 5 independent experiments done in duplicate and were analyzed by ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. \*Significantly different from the respective control,  $p < 0.05$ . #Significantly different from MMA in the absence of malate,  $p < 0.05$

decreased activity of respiratory chain components or a diminished substrate supply for aerobic oxidation. Supporting the idea that substrate availability may be limiting, we found that MMA-induced inhibition of uncoupled respiration was partially prevented when the incubation medium was supplemented with malate. Indeed, MMA significantly reduced brain CO<sub>2</sub> production from [2-<sup>14</sup>C]glucose and [U-<sup>14</sup>C]acetate in a dose-dependent manner, and also increased lactate production in diced rat brains (Wajner et al. 1992). These MMA effects were followed by increased glucose uptake, indicating that aerobic glucose oxidation is blocked by this metabolite. Overall, these experiments support the concept that MMA may compromise citric acid cycle activity due to the lack of intermediates, including oxaloacetate (generated by pyruvate carboxylase), intramitochondrial succinate and malate. The absence of succinyl-CoA derived from methylmalonyl-CoA mutase may also contribute to the reduction of citric acid cycle activity in methylmalonic acidemia.

MMA also inhibits brain mitochondrial use of alternative substrates such as ketone bodies and lactate through competitive inhibition of  $\beta$ -hydroxybutyrate (Dutra et al. 1991, 1993) and lactate dehydrogenases (Saad et al. 2006). The inhibitory effect of MMA on  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase in the liver would result in a decreased supply of ketone bodies to the brain, and a consequent impairment of their utilization in this organ.



Another possibility is that MMA can inhibit mitochondrial respiratory chain components. Although the evidence presented above indicate that MMA is not an inhibitor of SDH (respiratory complex II), this compound can lead to diverse alterations in respiratory chain complexes activities. Diminished activities of NADH:cytochrome *c* oxidoreductase



(complexes I + CoQ + III) and succinate:cytochrome *c* oxidoreductase (complexes II + CoQ + III) were found in brain, liver and kidney homogenates after MMA exposure (Brusque et al. 2002; Pettenuzzo et al. 2006). On the other hand, MMA did not show an inhibitory effect on complex IV activity in isolated rat liver mitochondria and homogenates from different rat tissues (Hayasaka et al. 1982; Brusque et al. 2002; Pettenuzzo et al. 2006). Importantly, respiratory complexes III and IV were found to be deficient in liver extracts from methylmalonic acidemia patients (Hayasaka et al. 1982; Chandler et al. 2009; de Keyser et al. 2009; Valayannopoulos et al. 2009). In addition, diminished activities of respiratory chain complexes III and IV were also found in liver from two rodent models for methylmalonic acidemia (Krahenbuhl et al. 1991; Chandler et al. 2009), as will be described latter in this article. Because reduced electron flow in the mitochondrial respiratory chain is associated with an increased generation of reactive oxygen species (Kowaltowski et al. 2009), respiratory complex impairments associated with methylmalonic acidemia are likely to be responsible for increased oxidant production.

Furthermore, Schuck et al. (2004) observed that MMA inhibits mitochondrial creatine kinase in rat cerebral cortex. This enzyme is an important component of the cellular energy buffering and transport system, connecting oxidative phosphorylation to ATP consumption (Schlattner et al. 2006). The reduced activity of creatine kinase may lead to a decreased cellular ATP/ADP ratio, as observed in cultured striatal cells exposed to MMA (McLaughlin et al. 1998).

### Toxic MMA effects on cultured neuronal cells

In cultured neurons, MMA decreases ATP/ADP ratio, collapses ion gradients, causes membrane depolarization and increases intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels, leading to necrotic and apoptotic cell death (McLaughlin et al. 1998; Okun et al. 2002; Maciel et al. 2004; Kowaltowski et al. 2006). Cell death induced by MMA is prevented by ionotropic glutamate receptor antagonists, suggesting the involvement of excitotoxic mechanisms of cell damage (McLaughlin et al. 1998; Okun et al. 2002). Moreover, the involvement of excitotoxicity is also evidenced by the prevention promoted by glutamate receptor antagonist MK-801 on rotational behavior and convulsions induced by intrastriatal administration of MMA (de Mello et al. 1996).

Excitotoxicity is a central nervous system process that may be associated with increased glutamate release in response to impairment of brain energy metabolism (secondary excitotoxicity) (Albin and Greenamyre 1992). Glutamate toxicity is promoted mainly by activation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$

influx (Choi 1987; Rothman and Olney 1987). Under excitotoxic conditions, mitochondria are the main organelle responsible for  $\text{Ca}^{2+}$  sequestration, an event associated with neuronal cell death (Nicholls and Budd 2000). Increased  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in the mitochondrial matrix may induce organelle dysfunction by promoting mitochondrial permeability transition (MPT), a non-selective permeabilization of the inner mitochondrial membrane (Kowaltowski et al. 2001). The involvement of MPT in MMA-mediated neurotoxicity was evidenced in experiments using cultured PC12 cells and rat brain slices, where an important inhibition of MMA-induced cell death was observed in the presence of MPT inhibitors (Maciel et al. 2004; Kowaltowski et al. 2006). Since redox imbalance is an important inducer of MPT (Castilho et al. 1995), increased mitochondrial reactive oxygen species generation in cells from methylmalonic acidemic patients, as observed in fibroblasts by Richard et al. (2007), may facilitate the occurrence of MPT.

We also observed that mitochondrial ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channel (mitoK<sub>ATP</sub>) opening by diazoxide protects against MMA-induced cell death (Kowaltowski et al. 2006). MitoK<sub>ATP</sub> opening results in decreased mitochondrial reactive oxygen species production (Facundo et al. 2005). In addition, under energy deprivation conditions, mitoK<sub>ATP</sub> opening inhibits mitochondrial ATP hydrolysis by ATP synthase (Belisle and Kowaltowski 2002; Kowaltowski et al. 2006), which helps to keep the cytosolic ATP/ADP ratio and also to limit mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, indirectly preventing MPT.

Although the cytotoxic effects of MMA were documented in neuron-enriched primary cultures and in a neuronal cell line, the toxic effect of MMA on glial cells remains unexplored and deserves future investigation.

### Mitochondrial oxidative metabolism in animal methylmalonic acidemia models

At least four *in vivo* rodent models have been used to study the pathogenesis of methylmalonic acidemia: young rats subcutaneously injected with MMA, adult rats intrastrially infused with MMA, rats chronically treated with the inhibitory vitamin B<sub>12</sub> analog hydroxycobalamin[c-lactam] (HCCL) and *MUT* knockout mice. Several evidences of mitochondrial oxidative metabolism impairment in these experimental models have been observed, as described below.

Acute or chronic chemically-induced methylmalonic acidemia promoted by subcutaneous treatment of rats with MMA was characterized in detail by Wajner and collaborators (Wajner et al. 1988; Dutra et al. 1991; de Mattos-Dutra et al. 1998; Wyse et al. 2000; Pettenuzzo et al. 2003).

This experimental model does not exactly mimic the human disease but reproduces the elevated tissue levels of MMA (Pettenuzzo et al. 2003). MMA administration twice a day to young rats from the first to the fourth week of life promoted plasma levels of 2–2.5 mM (Wajner et al. 1988; Dutra et al. 1991), near to those reported in patients with methylmalonic acidemia during crisis periods. A reduction in  $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism was observed in brain tissue from MMA-treated rats, probably due to  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase inhibition by MMA (Patel et al. 1976; Dutra et al. 1991). In addition, behavioral deficits presented by rats after chronic MMA treatment seems to be related to oxidative brain damage, since co-administration of the antioxidant ascorbic acid prevented such effects (Pettenuzzo et al. 2003).

By means of these well established chemically-induced models for methylmalonic acidemia, we recently evaluated ADP-stimulated oxygen consumption by isolated brain mitochondria. We did not observe significant differences between control and MMA-treated rats using different substrates specific for each complex of the mitochondrial respiratory chain (D.R. Melo, S.R. Miranda and R.F. Castilho, unpublished results). These results indicate that MMA does not lead to permanent inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation, and corroborates with observations that impairment of mitochondrial function by MMA is mainly related to a decreased supply of substrates, as observed in *in vitro* experimental methylmalonic acidemia models.

An alternative *in vivo* methylmalonic acidemia model induced by MMA was achieved by infusion of this metabolite into adult rat striatum. Stereotaxic injections of MMA (2–10  $\mu$ mol) lead to extensive striatal degeneration (Narasimhan et al. 1996), rotational behavior and convulsions (de Mello et al. 1996; Malfatti et al. 2003; Royes et al. 2003), in a mechanism involving excitotoxicity, oxidative damage and impairment of energy metabolism. With respect to energy metabolism, increased brain lactate production as well as rotational behavior and convulsions were prevented by intraperitoneal creatine or intrastratial succinate pretreatments (de Mello et al. 1996; Malfatti et al. 2003; Royes et al. 2003).

Another way to mimic methylmalonic acidemia in rodents and in cultured cells is through chronical treatment with the vitamin B<sub>12</sub> analog hydroxycobalamin[c-lactam] (HCCL) (Krahenbuhl et al. 1991; Sauer et al. 2009). Adult rats subcutaneously treated for 5–6 weeks with HCCL showed diminished activities for respiratory chain complexes III and IV related to decreased contents of cytochromes *b* and *a+a<sub>3</sub>* (Krahenbuhl et al. 1991).

The two engineered *MUT* knockout mice present severe symptoms immediately after birth and perish within 2 days of life (Peters et al. 2003; Chandler et al. 2007). A background-modified *MUT* knockout mouse that was

capable of surviving beyond the neonatal period was developed (Chandler et al. 2009) and encouraged studies involving mitochondrial function. Changes in mitochondrial morphology, including megamitochondria, were observed in the liver, kidney and pancreas, but not in skeletal muscle and heart of this knockout mouse (Chandler et al. 2009; Murphy et al. 2010). Furthermore, respiratory chain complex III and IV activities as well as glutathione levels were decreased in liver extracts. On the other hand, the activity of citrate synthase was increased (Chandler et al. 2009). Further studies using these *MUT* knockout mice may help to improve the current knowledge about mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of this disease. Interestingly, the presence of megamitochondria and respiratory chain complex IV inhibition was also identified in patients with methylmalonic acidemia (Hayasaka et al. 1982; Chandler et al. 2009), confirming that there are important parallels between the animal model and human disease.

**Acknowledgments** We thank Tiago R. Figueira for critical reading the manuscript. The authors were supported by grants from the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência* (IBN-Net), *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP), *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* (FAPERGS), National Institutes of Health (NIH) and *Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia* (INCT/MCT/CNPq).

## References

- Albin RL (2000) *Neurol Clin* 18:665–680
- Albin RL, Greenamyre JT (1992) *Neurology* 42:733–738
- Baumgartner ER, Viardot C (1995) *J Inher Metab Dis* 18:138–142
- Belisle E, Kowaltowski AJ (2002) *J Bioenerg Biomembr* 34:285–298
- Brismar J, Ozand PT (1994) *AJNR Am J Neuroradiol* 15:1459–1473
- 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) *Neurochem Int* 40:593–601
- Burgeois M, Goutieres F, Chretien D, Rustin P, Munnich A, Aicardi J (1992) *Brain Dev* 14:404–408
- Castilho RF, Kowaltowski AJ, Meinicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE (1995) *Free Radic Biol Med* 18:479–486
- Chandler RJ, Venditti CP (2005) *Mol Genet Metab* 86:34–43
- Chandler RJ, Sloan J, Fu H, Tsai M, Stabler S, Allen R, Kaestner KH, Kazazian HH, Venditti CP (2007) *BMC Med Genet* 8:64
- Chandler RJ, Zerfas PM, Shanske S, Sloan J, Hoffmann V, DiMauro S, Venditti CP (2009) *FASEB J* 23:1252–1261
- Choi DW (1987) *J Neurosci* 7:369–379
- Coulombe JT, Shih VE, Levy HL (1981) *Pediatrics* 67:26–31
- de Keyzer Y, Valayannopoulos V, Benoist JF, Batteux F, Lacaille F, Hubert L, Chretien D, Chadeafeux-Vekemans B, Niaudet P, Touati G, Munnich A, de Lonlay P (2009) *Pediatr Res* 66:91–95
- de Mattos-Dutra A, de Freitas MS, Lisboa CS, Pessoa-Pureur R, Wajner M (1998) *Neurochem Int* 33:75–82
- de Mello CF, Beghini J, Jiménez-Bernal RE, Rubin MA, de Bastiani J, da Costa E Jr, Wajner M (1996) *Brain Res* 721:120–125
- Deodato F, Boenzi S, Santorelli FM, Dionisi-Vici C (2006) *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142:104–112



- Dutra JC, Wajner M, Wannmacher CF, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (1991) *Biochem Med Metab Biol* 45:56–64
- Dutra JC, Dutra-Filho CS, Cardozo SE, Wannmacher CM, Sarkis JJ, Wajner M (1993) *J Inherit Metab Dis* 16:147–153
- Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ (2005) *J Bioenerg Biomembr* 37:75–82
- Fenton WA, Hack AM, Willard HF, Gertler A, Rosenberg LE (1982) *Arch Biochem Biophys* 214:815–823
- Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS (2001) In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 2165–2193
- Figuera MR, Bonini JS, de Oliveira TG, Frussa-Filho R, Rocha JB, Dutra-Filho CS, Rubin MA, Mello CF (2003) *Int J Biochem Cell Biol* 35:465–473
- Fontella FU, Pulrolnik V, Gassen E, Wannmacher CM, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS (2000) *NeuroReport* 11:541–544
- Haas RH, Marsden DL, Capistrano-Estrada S, Hamilton R, Grafe MR, Wong W, Nyhan WL (1995) *J Child Neurol* 10:18–22
- Halperin ML, Schiller CM, Fritz IB (1971) *J Clin Invest* 50:2276–2282
- Harting I, Seitz A, Geb S, Zwickler T, Porto L, Lindner M, Kölker S, Hörster F (2008) *J Inherit Metab Dis* 31:368–378
- Hassel B, Bräthe A, Petersen D (2002) *J Neurochem* 82:410–419
- Hayasaka K, Metoki K, Satoh T, Narisawa K, Tada K, Kawakami T, Matsuo N, Aoki T (1982) *J Exp Med* 137:329–334
- Heidenreich R, Natowicz M, Hainline BE, Berman P, Kelley RI, Hillman RE, Berry GT (1988) *J Pediatr* 113:1022–1027
- Hertz L (2004) *Neurochem Int* 45:285–296
- Hoffmann GF, Meier-Augenstein W, Stöckler S, Surtees R, Rating D, Nyhan WL (1993) *J Inherit Metab Dis* 16:648–669
- Horster F, Baumgartner MR, Viardot C, Suomalainen T, Bugard P, Fowler B, Hoffmann GF, Garbade SF, Kolker S, Baumgartner ER (2007) *Pediatr Res* 62:225–230
- Kennedy DG, Cannavan A, Molloy A, O'Harte F, Taylor SM, Kennedy S, Blanchflower WJ (1990) *Br J Nutr* 64:721–732
- Kölker S, Okun JG (2005) *Cell Mol Life Sci* 62:621–624
- Kölker S, Schwab M, Hörster F, Sauer S, Hinz A, Wolf NI, Mayatepek E, Hoffmann GF, Smeitink JA, Okun JG (2003) *J Biol Chem* 278:47388–47393
- Kölker S, Sauer SW, Surtees RA, Leonard JV (2006) *J Inherit Metab Dis* 29:701–704
- Kovachy RJ, Copley SD, Allen RH (1983) *J Biol Chem* 258:11415–11421
- Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD (2001) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:649–657
- Kowaltowski AJ, Maciel EN, Fornazari M, Castilho RF (2006) *Exp Neurol* 201:165–171
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE (2009) *Free Radic Biol Med* 47:333–343
- Krahenbuhl S, Chang M, Brass EP, Hoppel CL (1991) *J Biol Chem* 266:20998–21003
- Lash LH (2006) *Chem Biol Interact* 163:54–67
- Leonard JV (1995) *J Inherit Metab Dis* 18:430–434
- Maciel EN, Kowaltowski AJ, Schwalm FD, Rodrigues JM, Souza DO, Vercesi AE, Wajner M, Castilho RF (2004) *J Neurochem* 90:1025–1035
- Malfatti CR, Royes LF, Francescato L, Sanabria ER, Rubin MA, Cavalheiro EA, Mello CF (2003) *Epilepsia* 44:761–767
- McLaughlin BA, Nelson D, Silver IA, Erecinska M, Chesselet MF (1998) *Neuroscience* 86:279–290
- Mirandola SR, Melo DR, Schuck PF, Ferreira GC, Wajner M, Castilho RF (2008) *J Inherit Metab Dis* 31:44–54
- Morath MA, Okun JG, Müller IB, Sauer SW, Hörster F, Hoffmann GF, Kölker S (2008) *J Inherit Metab Dis* 31:35–43
- Murphy GE, Lowekamp BC, Zerfas PM, Chandler RJ, Narasimha R, Venditti CP, Subramaniam S (2010) *J Struct Biol* 171:125–132
- Narasimhan P, Sklar R, Murrell M, Swanson RA, Sharp FR (1996) *J Neurosci* 16:7336–7346
- Nicholls DG, Budd SL (2000) *Physiol Rev* 80:315–360
- Oberholzer VG, Levin B, Burgess EA, Young WF (1967) *Arch Dis Child* 225:492–504
- Okun JG, Hörster F, Farkas LM, Feyh P, Hinz A, Sauer S, Hoffmann GF, Unsicker K, Mayatepek E, Kölker S (2002) *J Biol Chem* 277:14674–14680
- Ostergaard E, Wibrand F, Omgreen MC, Vissing J, Horn N (2005) *Neurology* 65:931–933
- Patel MS, Owen OE, Raefsky C (1976) *Life Sci* 19:41–47
- Peters H, Nefedov M, Sarsero J, Pitt J, Fowler KJ, Gazeas S, Kahler SG, Ioannou PA (2003) *J Biol Chem* 278:52909–52913
- Pettenuzzo LF, Schuck PF, Wyse AT, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wajner M (2003) *Brain Res* 976:234–242
- Pettenuzzo LF, Ferreira Gda C, Schmidt AL, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M (2006) *Int J Dev Neurosci* 24:45–52
- Pinar-Sueiro S, Martínez-Fernández R, Lage-Medina S, Aldamiz-Echevarria L, Vecino E (2010) *J Inherit Metab Dis*. doi:10.1007/s10545-010-9084-8
- Reszko AE, Kasumov T, Pierce BA, David F, Hoppel CL, Stanley WC, Des Rosiers C, Brunengraber H (2003) *J Biol Chem* 278:34959–34965
- Richard E, Alvarez-Barrientos A, Pérez B, Desviat LR, Ugarte M (2007) *J Pathol* 213:453–461
- Rosenberg LE (1978) In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Frederickson DS (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 4th edn. McGraw-Hill, New York, pp 411–429
- Rothman SM, Olney JW (1987) *Trends Neurosci* 10:299–302
- Royes LF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, da Silva LG, Malfatti CR, Schneider PH, Braga AL, Wajner M, Mello CF (2003) *Neuroscience* 118:1079–1090
- Saad LO, Mirandola SR, Maciel EN, Castilho RF (2006) *Neurochem Res* 31:541–548
- 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) *J Neurochem* 97:899–910
- Sauer SW, Okun JG, Hoffmann GF, Koeller S, Morath MA (2008) *Biochim Biophys Acta* 1777:1276–1282
- Sauer SW, Opp S, Haarmann A, Okun JG, Kölker S, Morath MA (2009) *J Inherit Metab Dis* 32:720–727
- Sauer SW, Opp S, Mahringer A, Kamiński MM, Thiel C, Okun JG, Fricker G, Morath MA, Kölker S (2010) *Biochim Biophys Acta* 1802:552–560
- Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T (2006) *Biochim Biophys Acta* 1762:164–180
- Schuck PF, Rosa RB, Pettenuzzo LF, Sitta A, Wannmacher CM, Wyse AT, Wajner M (2004) *Neurochem Int* 45:661–667
- Tamai I, Tsuji A (2000) *J Pharm Sci* 89:1371–1388
- Tanpaiboon P (2005) *Mol Genet Metab* 85:2–6
- Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Miyatake K, Nakano Y (1995) *J Nutr* 125:2846–2850
- Treacy E, Arbour L, Chessex P, Graham G, Kasprzak L, Casey K, Bell L, Mamer O, Scriver CR (1996) *J Pediatr* 129:445–448
- Trinh BC, Melhem ER, Barker PB (2001) *Am J Neuroradiol* 22:831–833
- Utter MF, Keech DB, Scrutton MC (1964) *Adv Enzyme Regul* 2:49–68
- Valayannopoulos V, Hubert L, Benoist JF, Romano S, Arnoux JB, Chrétien D, Kaplan J, Fakhouri F, Rabier D, Rötig A, Lebre AS, Munnich A, de Keyser Y, de Lonlay P (2009) *J Inherit Metab Dis* 32:159–162
- Venditti CP (2005) *Methylmalonic acidemia*. In: *GeneReviews at GeneTests*, University of Washington, Seattle: Medical Genetics

- Information Resource. [database online at <http://www.genetests.org>] (Accessed: September 2010)
- Wajner M, Coelho JC (1997) *J Inherit Metab Dis* 20:761–768
- Wajner M, Goodman SI (2011) *J Bioenerg Biomembr*. doi:10.1007/s10863-011-9324-0
- Wajner M, Brites EC, Dutra JC, Buchalter MS, Pons AH, Pires RF, Wannmacher LE, Rosa Júnior A, Trindade VM, Wannmacher CM (1988) *J Neurol Sci* 85:233–238
- Wajner M, Dutra JC, Cardoso SE, Wannmacher CM, Motta ER (1992) *J Inherit Metab Dis* 15:92–96
- Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS (2004) *J Inherit Metab Dis* 27:427–448
- Wyse AT, Streck EL, Barros SV, Brusque AM, Zugno AI, Wajner M (2000) *NeuroReport* 11:2331–2334
- Yu AC, Drejer J, Hertz L, Schousboe A (1983) *J Neurochem* 41:1484–1487

# Methylmalonate Impairs Mitochondrial Respiration Supported by NADH-Linked Substrates: Involvement of Mitochondrial Glutamate Metabolism

Daniela R. Melo,<sup>1</sup> Sandra R. Mirandola,<sup>1</sup> Nilson A. Assunção,<sup>2</sup> and Roger F. Castilho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Ambientais, Química e Farmacêutica, Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, São Paulo, Brazil

The neurodegeneration that occurs in methylmalonic acidemia is proposed to be associated with impairment of mitochondrial oxidative metabolism resulting from methylmalonate (MMA) accumulation. The present study evaluated the effects of MMA on oxygen consumption by isolated rat brain mitochondria in the presence of NADH-linked substrates ( $\alpha$ -ketoglutarate, citrate, isocitrate, glutamate, malate, and pyruvate). Respiration supported either by glutamate or glutamate plus malate was significantly inhibited by MMA (1–10 mM), whereas no inhibition was observed when a cocktail of NADH-linked substrates was used. Measurements of glutamate transport revealed that the inhibitory effect of MMA on respiration maintained by this substrate is not due to inhibition of its mitochondrial uptake. In light of this result, the effect of MMA on the activity of relevant enzymes involved in mitochondrial glutamate metabolism was investigated. MMA had minor inhibitory effects on glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase, whereas  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase was significantly inhibited by this metabolite ( $K_i = 3.65$  mM). Moreover, measurements of  $\alpha$ -ketoglutarate transport and mitochondrial MMA accumulation indicated that MMA/ $\alpha$ -ketoglutarate exchange depletes mitochondria from this substrate, which may further contribute to the inhibition of glutamate-sustained respiration. To study the effect of chronic in vivo MMA treatment on mitochondrial function, young rats were intraperitoneally injected with MMA. No significant difference was observed in respiration between isolated brain mitochondria from control and MMA-treated rats, indicating that in vivo MMA treatment did not lead to permanent mitochondrial respiratory defects. Taken together, these findings indicate that the inhibitory effect of MMA on mitochondrial oxidative metabolism can be ascribed to concurrent inhibition of specific enzymes and lower availability of respiratory substrates. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** brain mitochondria; glutamate; methylmalonic acidemia; neurodegeneration; oxidative metabolism

Methylmalonic acidemia is a group of inherited disorders affecting catabolic pathways of the branched chain amino acids, thymine, odd carbon number fatty acids, and the side chain of cholesterol. Methylmalonic acidemia is usually caused by mutations in the *MUT* gene that lead to partial ( $\text{mut}^-$ ) or complete ( $\text{mut}^0$ ) deficiency in the activity of methylmalonyl-CoA mutase (MCM), a mitochondrial enzyme that catalyses the conversion of L-methylmalonyl-CoA to succinyl-CoA (Fenton et al., 2001; Tanpaiboon, 2005; Venditti, 2005). Defects in the uptake of or steps involved in the processing of cobalamin, the precursor of the cofactor for MCM activity 5'-deoxyadenosyl cobalamin (AdoCbl), can also result in methylmalonic acidemia. Hypomyelination, cerebral atrophy, and neurodegeneration with basal ganglia lesions affecting mainly the globus pallidus are common neurological features of the disease (Brismar and Ozand, 1994; Harting et al., 2008). Much evidence indicates that oxidative metabolism dysfunction is involved in the pathophysiology of methylmalonic acidemia (for reviews see Wajner and Coelho, 1997;

Contract grant sponsor: São Paulo Research Foundation (FAPESP); Contract grant sponsor: Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Sandra R. Mirandola's current address is German Center for Neurodegenerative Diseases, Bonn, Germany

\*Correspondence to: Dr. Roger F. Castilho, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP 13083-887, Brazil. E-mail: roger@fcm.unicamp.br

Received 9 September 2011; Revised 28 November 2011; Accepted 8 December 2011

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.23020



Morath et al., 2008; Melo et al., 2011), with potential implications for the development of treatments to prevent neurodegeneration (Figuera et al., 1999; Pinar-Sueiro et al., 2010).

The methylmalonyl-CoA that is not converted as a consequence of MCM deficiency is subsequently hydrolyzed to methylmalonic acid (MMA), the main metabolite that accumulates in methylmalonic acidemia. Other metabolic intermediates that can also accumulate, such as 2-methylcitric acid, propionic acid, and propionyl-CoA, have also been recognized to play a role in the disease (Kölker and Okun, 2005). During periods of metabolic decompensation, MMA levels of up to 2.9 mmol/liter can be found in blood and cerebrospinal fluid (Fenton et al., 2001).

Mitochondrial morphological abnormalities and diminished cytochrome c oxidase activity have been found in various tissues from methylmalonic acidemia patients as well as in the liver, kidney, and pancreas of a knockout mouse for methylmalonic acidemia (Hayasaka et al., 1982; Chandler et al., 2009; Murphy et al., 2010). In diced rat brain, MMA decreased CO<sub>2</sub> production from both glucose and acetate (Wajner et al., 1992) and caused an inhibitory effect on respiration (Melo et al., 2011). This effect was prevented by malate, possibly indicating a reduction in the supply of substrates for the citric acid cycle (Melo et al., 2011). Recently, our group reported that MMA inhibited succinate-supported respiration in a dose-dependent manner in experiments using isolated, intact rat brain mitochondria (Mirandola et al., 2008). This effect was attributed to inhibition of the mitochondrial dicarboxylate transporter by MMA (Halperin et al., 1971; Mirandola et al., 2008), with a subsequent diminished supply of succinate inside the mitochondria. In addition, MMA has been shown to induce mitochondrial permeability transition in isolated organelles and cell suspensions (Maciel et al., 2004; Kowaltowski et al., 2006) and is also able to inhibit the activity of  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase (Dutra et al., 1993) and mitochondrial creatine kinase (Schuck et al., 2004).

The aim of the present study was to investigate the effects of MMA on mitochondrial respiration supported by different NADH-linked substrates in order to elucidate the mechanisms involved in the mitochondrial dysfunction that occurs in methylmalonic acidemia. The effects of MMA were evaluated using isolated brain mitochondria from both adult control rats (in vitro) and chronically MMA-treated young rats (in vivo).

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Most of the chemicals used, including ADP,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, citric acid, isocitric acid trisodium salt, L-glutamic acid, malic acid, malonic acid, methylmalonic acid, pyruvic acid sodium salt, and succinic acid, were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The enzyme L-glutamate dehydrogenase from bovine liver was also obtained from Sigma-Aldrich. ADP,  $\alpha$ -ketoglutarate, citrate, isocitrate, glutamate, malate, malonate, MMA, and the pyruvate solutions

were prepared by dissolving the acids in water and adjusting the pH to 7.2 with KOH. For the in vivo treatments, MMA-buffered solutions were freshly prepared by dissolving the acid in water and adjusting the pH to 7.4 with NaOH.

### Animals

Wistar rats (*Rattus norvegicus albino*) were obtained from the State University of Campinas (UNICAMP) Animal Breeding Center. The animals were kept under standard laboratory conditions (20–22°C and 12 hr/12 hr light/dark cycle) with free access to a standard diet (Labina/Purina, Campinas, SP, Brazil) and tap water. Animal experiments followed UNICAMP guidelines for the use of animals in experimental studies and the *Guide for the care and use of laboratory animals* published by the U.S. National Institutes of Health (NIH publication 85-23, revised 1996).

### Chronic In Vivo Administration of MMA to Young Rats

First, two groups of 5-day-old rats, each composed of six litters, were kept in separate cages together with their mothers. One of the groups received intraperitoneal administration of buffered MMA (pH 7.4) for 16 days, twice per day with an 8-hr intervals. Increasing MMA doses were administered according to Dutra et al. (1991b). During the first 8 days of treatment, the rats were injected with 9  $\mu$ l/g animal weight (0.76  $\mu$ mol MMA/g) of a 1% MMA solution. During the following 5 days of treatment, the rats were injected with 8  $\mu$ l/g (1.01  $\mu$ mol MMA/g) of a 1.5% MMA solution, and during the last 3 days they were injected with 11  $\mu$ l/g (1.86  $\mu$ mol MMA/g) of a 2% MMA solution. A matched group of rats (control) received saline solution (0.9% NaCl) in the same volumes as the treated group. On the 21st day of life, 16 hr after the last injection of MMA, the rats were sacrificed, and brain mitochondria were isolated.

### Isolation of Rat Forebrain Mitochondria

Forebrain (brain minus cerebellum and brainstem) mitochondria were isolated from 8-week-old female control Wistar rats as described by Mirandola et al. (2008), using digitonin to permeabilize synaptosomal plasma membrane (Rosenthal et al., 1987). This preparation results in a mixture of synaptosomal and nonsynaptosomal mitochondria. For some experiments, 21-day-old rats chronically treated with MMA (or saline solution) were used for brain mitochondrial isolation. Mitochondria were kept on ice until the experiments were begun. All experiments using isolated mitochondria were conducted within 5 hr of isolation. The ratio of the mitochondrial respiratory rate in the presence of oxidative phosphorylation (state 3) to that in the absence of oxidative phosphorylation (state 4), measured using 5 mM glutamate plus 5 mM malate as substrates, was over 6. The protein content of mitochondrial suspensions was determined by the Biuret assay in the presence of 0.2% deoxycholate, with bovine serum albumin as standard.

### Oxygen Uptake Measurement

Oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type electrode (Hansatech Instruments Limited,



Norfolk, United Kingdom) in a 1.0-ml sealed glass cuvette equipped with a magnetic stirrer and kept at 37°C. The initial molecular oxygen (O<sub>2</sub>) concentration in the reaction medium was considered to be 200 μmol/liter (Robinson and Cooper, 1970). The experiments to measure oxygen consumption by isolated mitochondria (0.5 mg/ml) were carried out at 37°C in standard reaction medium containing 130 mM KCl, 10 mM K<sup>+</sup>-HEPES (pH 7.2), 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 200 μM EGTA. Substrates and MMA in different concentrations were added to the reaction medium prior to the addition of mitochondrial suspension. In all the experiments, 800 μM ADP was used to stimulate respiration by oxidative phosphorylation.

#### Mitochondrial Glutamate Transport Assay

To estimate mitochondrial glutamate influx, we measured the decrease in mitochondrial light scattering resulting from the swelling that accompanies net ammonium salt transport into the organelles (Johnson and Chappell, 1974). Rat brain mitochondria (0.1 mg/ml) were added to the reaction medium containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EGTA (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> salt), 100 mM glutamate or MMA (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> salts), 2 μM antimycin A, and 2.5 μM rotenone at 37°C. The measurements were conducted in the presence of the respiratory chain inhibitors antimycin A and rotenone to ensure that glutamate influx would occur as a result of the glutamate concentration gradient across the inner mitochondrial membrane. Inhibition of the respiratory chain minimizes interference caused by mitochondrial glutamate metabolism in this assay. Mitochondrial swelling was estimated using a model F-4500 Hitachi spectrofluorometer (Hitachi, Tokyo, Japan) operating at excitation and emission wavelengths of 540 nm, with slit widths of 2.5 nm.

#### Measurement of Glutamate Dehydrogenase Activity

The conversion of glutamate and NAD<sup>+</sup> to α-ketoglutarate, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and NADH by glutamate dehydrogenase (GDH) was followed fluorometrically by measuring NADH produced at excitation and emission wavelengths of 340 and 460 nm, respectively (Zhang et al., 2004) and slit widths of 5 nm. The mitochondrial suspension (0.15 mg/ml) was incubated at 37°C in reaction medium containing 130 mM KCl, 10 mM K<sup>+</sup>-HEPES (pH 7.2), 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM EGTA, 0.1% Triton X-100, 250 μM ADP, 1 mM NAD<sup>+</sup>, and glutamate (0.3; 1; 3 and 10 mM) in the absence or presence of varying concentrations of MMA (1–10 mM).

#### Measurement of Aspartate Aminotransferase Activity

Aspartate aminotransferase (AST) activity was estimated from the reaction in the direction of aspartate and α-ketoglutarate formation. The assay was coupled to NADPH oxidation by glutamate dehydrogenase (Dennis et al., 1976; Cheeseman and Clark, 1988). Rat brain mitochondria (0.25 mg/ml) were incubated at 37°C in reaction medium containing 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4), 0.17% Triton X-100, 2 mM glutamate, 1 mM oxaloacetate, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 100 μM NADPH, and 4 U/ml bovine liver GDH in the absence or presence of varying concentrations of MMA (1–10 mM). NADPH oxidation was followed at wavelengths of 340 nm for excitation and 460 nm for emission, with slit widths of 5 nm.

#### Measurement of the Activity of the α-Ketoglutarate Dehydrogenase Complex (αKGDH)

The conversion of α-ketoglutarate, NAD<sup>+</sup>, and coenzyme A to succinyl-CoA, NADH, and CO<sub>2</sub> catalyzed by αKGDH was measured by following NADH fluorescence at wavelengths of 340 and 460 nm for excitation and emission, respectively, with slit widths of 5 nm. The αKGDH assay was carried out in reaction medium containing 0.5 mg/ml rat brain mitochondria, 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.35), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM thiamine pyrophosphate, 0.3 mM dithiothreitol, 100 μM EGTA, 50 μM coenzyme A-SH, 0.1% Triton X-100, 2 mM NAD<sup>+</sup>, and varying concentrations of α-ketoglutarate (0.1, 0.25, 0.5, 1, and 2 mM) and MMA (0, 1, 5, and 10 mM) at 37°C.

#### Citrate Synthase Activity

The conversion of oxaloacetate and acetyl-CoA to citrate and SH-CoA catalyzed by citrate synthase was monitored by measuring the colorimetric product thionitrobenzoic acid (Shepherd and Garland, 1969). Mitochondrial suspensions (15 μg/ml) were incubated at 37°C in reaction medium containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% Triton X-100, 250 μM oxaloacetate, 50 μM acetyl-CoA, and 100 μM dithionitrobenzoic acid (DTNB). The increase in absorbance at 412 nm was followed for 5 min.

#### Measurement of Mitochondrial α-Ketoglutarate Efflux

Mitochondrial α-ketoglutarate efflux by the α-ketoglutarate carrier was determined as described by Contreras and Satrústegui (2009) following NADH fluorescence. Rat brain mitochondria suspensions (0.5 mg/ml) were incubated at 37°C in reaction medium containing 75 mM mannitol, 25 mM sucrose, 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 mM EDTA, 0.1% BSA, 3 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 mM ADP, 10 U/ml bovine liver GDH, 66 μM NADH, and 3 mM glutamate in the presence or absence of 0.5 mM malate or 0.5 mM MMA. With this methodology, glutamate enters the mitochondria via the glutamate/aspartate and glutamate<sup>-</sup>/OH<sup>-</sup> exchangers and is promptly converted to α-ketoglutarate by AST. Malate or MMA was present in the extramitochondrial medium to promote mitochondrial efflux of α-ketoglutarate, which is converted by exogenous GDH into glutamate, consuming NADH.

#### Estimate of Intramitochondrial MMA Accumulation

Rat brain mitochondria (2 mg/ml) were incubated at 37°C in reaction medium containing 130 mM KCl, 10 mM K<sup>+</sup>-HEPES (pH 7.2), 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM EGTA, 800 μM ADP, and 2 mM MMA in the presence of the substrates 3 mM glutamate or 1.5 mM α-ketoglutarate. Some experiments were also conducted in the absence of exogenous substrates. After 8 min of incubation, mitochondrial suspension was centrifuged for 5 min at 20,800g. The supernatant, corresponding to the extramitochondrial content, was discarded. The pellet was washed in 1 ml reaction medium and resuspended in 200 μl hypotonic 10 mM HEPES (pH 7.2) followed by four cycles of freeze-thawing to disrupt mitochondrial membranes. The suspension was recentrifuged for

5 min at 20,800g, and the resulting supernatant, which included the intramitochondrial content, was kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . MMA detection and quantitation were performed using a methodology that combines alkylative extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, according to Carvalho and Kok (2008).

### Statistical Analysis

The experimental data were analyzed by one-way ANOVA, followed by a post hoc Tukey test when multiple comparisons were performed. Student's *t*-test was used when a single parameter was compared between two different groups. The data are presented as mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments. The level of significance was set at  $P < 0.05$ . All data were analyzed in GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effects of MMA on Brain Mitochondrial Respiration Supported by NADH-Linked Substrates

The effect of 1–10 mM MMA on brain mitochondrial oxygen consumption was studied in the presence of six different respiratory substrates added separately or in combination (Fig. 1). ADP was used to stimulate respiration by oxidative phosphorylation. The absolute values of oxygen consumption are presented in Figure 1a, and Figure 1b shows the values as a percentage of control. The most remarkable effect of MMA was on glutamate-supported mitochondrial oxygen consumption, which was inhibited in a dose-dependent manner and fell by about 94% when the highest MMA concentration was used (10 mM). In addition, a mild inhibitory effect of MMA on mitochondrial oxygen consumption was observed when glutamate plus malate or malate alone was used as substrate. Besides these inhibitory effects, MMA caused significant stimulation of mitochondrial respiration maintained either by  $\alpha$ -ketoglutarate or by citrate. The stimulatory effects of MMA on mitochondrial oxygen consumption are probably associated with the mitochondrial influx of substrates promoted by MMA. According to Halperin et al. (1971), MMA can be transported by three different mitochondrial systems used for malate transport: dicarboxylate, tricarboxylate, and  $\alpha$ -ketoglutarate transporters. By entering the mitochondria in exchange for phosphate via the dicarboxylate transporter, MMA can leave in exchange for citrate or  $\alpha$ -ketoglutarate, which might explain the stimulatory effect of MMA on respiration maintained by these substrates. When isocitrate, pyruvate, malate plus pyruvate, or a cocktail of NADH-linked substrates was used, MMA showed no effect on mitochondrial oxygen consumption (Fig. 1). The lack of any effect of MMA on mitochondrial respiration maintained by a cocktail of NADH-linked substrates is in accordance with previous results published by our group (Mirandola et al., 2008). This finding also indicates that the inhibitory effect of

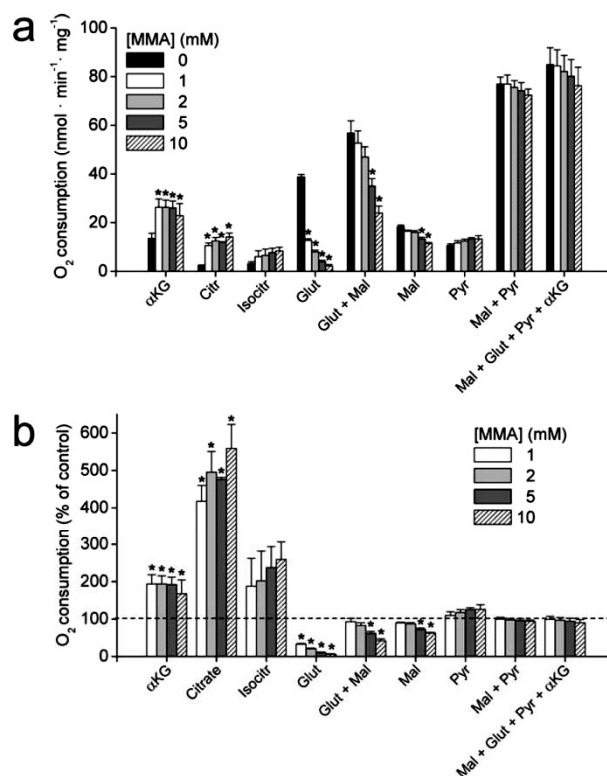


Fig. 1. Effect of MMA on brain mitochondrial oxygen consumption supported by NADH-linked substrates. Isolated forebrain mitochondria (0.5 mg/ml) from 8-week-old control rats were incubated in standard reaction medium containing different NADH-linked substrates ( $\alpha$ -ketoglutarate, citrate, isocitrate, glutamate, malate, or pyruvate). Five millimolar from each substrate was present when added separately, whereas equimolar concentrations were added when two (2.5 mM each) or four (1.25 mM each) substrates were used together. All assays were conducted in the presence of 800  $\mu\text{M}$  ADP. As indicated, varying concentrations of MMA (1–10 mM) were used. **a:** Data are shown as absolute rate values of oxygen consumption. **b:** Relative rate values of oxygen consumption are shown as percentages of the control. Data represent the mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments performed in duplicate. \*Significantly different from control at  $P < 0.01$ .

MMA on mitochondrial oxygen consumption under certain conditions is related to defects upstream of the complexes of the respiratory chain, such as inhibition of citric acid cycle enzyme activities or substrate transport. Experiments conducted without adding exogenous substrates showed no difference in mitochondrial oxygen consumption in the absence ( $4.6 \pm 0.2 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) or presence ( $3.8 \pm 0.4 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ;  $n = 5$ ) of 10 mM MMA.

### Lack of Inhibitory Effect of MMA on Mitochondrial Glutamate Transport

Our finding that MMA had an inhibitory effect on glutamate-supported respiration encouraged us to study



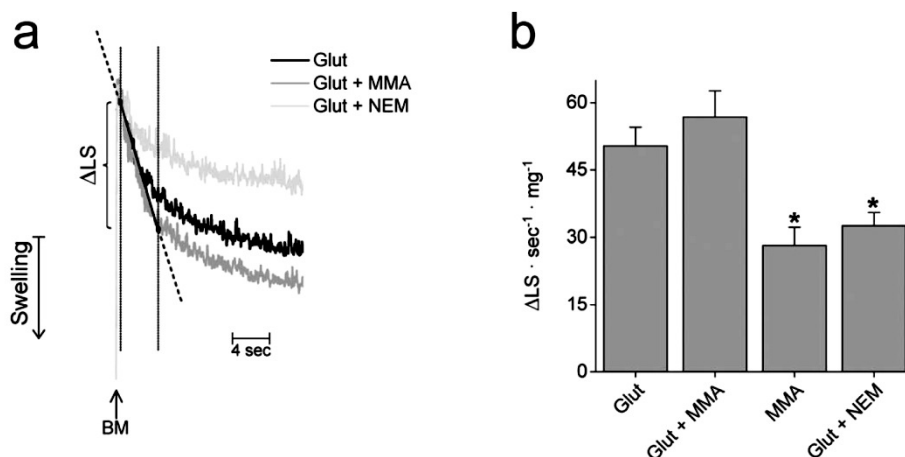


Fig. 2. Lack of inhibitory effect of MMA on mitochondrial glutamate transport. Isolated brain mitochondria (BM; 0.1 mg/ml) from 8-week-old control rats were incubated in reaction medium in the presence of 100 mM of glutamate (Glut) or MMA ammonium salts. When both salts were present, equimolar concentrations (50 mM) were added. Some experiments were conducted in the presence of the glutamate transporter inhibitor *N*-ethylmaleimide (NEM; 2 mM). **a**: Representative traces of rat brain mitochondrial swelling estimated

from light scattering (LS) measurements. Where indicated by the arrow, 0.1 mg/ml mitochondrial suspension (BM) was added to the reaction medium. **b**: Mitochondrial swelling rates in the presence of glutamate and/or MMA ammonium salts. Variations in light scattering ( $\Delta$ LS) between 1 and 5 sec after mitochondrial addition were used to quantify swelling. Data represent the mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments performed in duplicate. \*Significantly different from "Glut" at  $P < 0.01$ .

further the involvement of MMA in mitochondrial glutamate metabolism. Apart from being a building block for proteins and the major neurotransmitter in neuronal and nonneuronal cells, glutamate is avidly oxidized by the brain (Daikhin and Yudkoff, 2000; McKenna, 2007); indeed, the rate at which it is oxidized may be so robust that glutamate could theoretically substitute glucose as a fuel (Yu et al., 1982; Erecińska et al., 1988). Supporting the proposition that MMA impairs glutamate oxidative metabolism, a previous study by Toyoshima et al. (1996) based on experiments using glutamate labeled with  $^{14}\text{C}$  showed that MMA significantly reduced  $^{14}\text{CO}_2$  formation in rat liver mitochondria.

To study whether MMA interferes with mitochondrial glutamate transport, the influx of this substrate was evaluated by following mitochondrial swelling in ammonium-based medium. Under these conditions, mitochondrial swelling is a function of glutamate influx by both the glutamate/aspartate and the glutamate/ $\text{OH}^-$  exchangers (McKenna, 2007). A typical swelling pattern with a decrease in light scattering was observed when brain mitochondria were added to medium containing glutamate (Fig. 2a). When the same experiment was conducted in medium supplemented with *N*-ethylmaleimide, an inhibitor of the neutral glutamate/ $\text{OH}^-$  exchanger (Fiermonte et al., 2002), partial inhibition of mitochondrial swelling was observed. Notably, when mitochondria were incubated in medium containing glutamate and MMA, there was a trend for increased mitochondrial swelling, indicating that the mitochondrial influx of glutamate is not inhibited by MMA.

### MMA Has Only a Minor Inhibitory Effect on GDH and AST

In addition to the experiments described above, further experiments were performed to study the effect of MMA on mitochondrial glutamate metabolism. During glutamate-supported respiration in brain mitochondria, the main route of glutamate metabolism is transamination by AST, whereas its oxidative deamination by GDH is relatively rather limited (Dennis and Clark, 1977). Enzymatic assays for GDH and AST were performed using Triton X-100-permeabilized brain mitochondria. The results presented in Figure 3a show that, for the range of glutamate concentrations tested (0.3–10 mM), only the highest MMA concentration (10 mM) was capable of inhibiting GDH activity, and for this concentration only slight inhibition was observed.

AST activity was measured in the direction of aspartate and  $\alpha$ -ketoglutarate formation (Dennis and Clark, 1977). As observed for the GDH assay, only the highest MMA concentration (10 mM) slightly inhibited AST activity (Fig. 3b). Because the AST assay was determined by a reaction coupled to NADPH oxidation by GDH, the possibility that the observed inhibitory effect of MMA on AST activity was the result of an effect of this organic acid on GDH cannot be ruled out.

### Inhibitory Effect of MMA on $\alpha$ -Ketoglutarate Metabolism

As MMA was found to have no or only minor effects on mitochondrial glutamate influx and GDH and AST activities, the next experiments were designed to

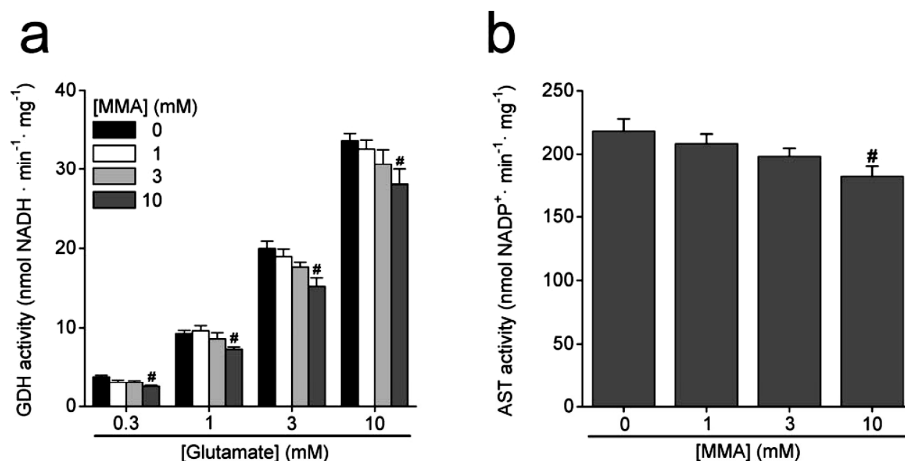


Fig. 3. MMA has only a minor inhibitory effect on glutamate dehydrogenase (GDH) and aspartate transaminase (AST) activities. **a:** For the GDH assay, rat brain mitochondria (0.15 mg/ml) were incubated in reaction medium containing different concentrations of glutamate (0.3, 1, 3, and 10 mM) in the absence or presence of varying concentrations of MMA (1–10 mM). **b:** For the AST assay, rat brain mi-

tochondria (0.25 mg/ml) were incubated in reaction medium in the absence or presence of varying concentrations of MMA (1–10 mM). GDH and AST activities are expressed as absolute rates of NADH and NADP<sup>+</sup> produced, respectively. Data represent the mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments performed in duplicate. <sup>#</sup>Significantly different from the control at  $P < 0.05$ .

evaluate the effect of MMA on mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate metabolism.  $\alpha$ KGDH is considered a rate-limiting mitochondrial enzyme in the citric acid cycle that converts  $\alpha$ -ketoglutarate to succinyl-CoA (Gibson et al., 2000).  $\alpha$ -Ketoglutarate can be generated inside the citric acid cycle as well as from glutamate oxidative deamination and transamination by glutamate dehydrogenase and aspartate transaminase, respectively (Gibson et al., 2005).

Permeabilized brain mitochondria were used to evaluate the effect of MMA on  $\alpha$ KGDH activity. When  $\alpha$ -ketoglutarate was used as substrate,  $K_m$  was  $0.57 \pm 0.06$  mM ( $n = 5$ ). MMA inhibited  $\alpha$ KGDH activity in a concentration-dependent manner. Inhibition of  $\alpha$ KGDH activity by 73% and 60% was observed when the assay was conducted with 0.1 and 0.25 mM  $\alpha$ -ketoglutarate, respectively, in the presence of the highest concentration of MMA used in the experiments (10 mM; Fig. 4a). The Lineweaver-Burk plot indicates that MMA inhibited  $\alpha$ KGDH activity by competing with  $\alpha$ -ketoglutarate (Fig. 4b).  $K_i$  was  $3.65 \pm 0.81$  mM ( $n = 4$ ) for MMA, calculated using the Dixon plot (result not shown).

Interestingly, Sauer et al. (2008) observed an inhibition of nearly 25% of  $\alpha$ KGDH activity when this enzyme was assayed in the presence of 1 mM methylmalonyl-CoA, the metabolic precursor of MMA.

In addition to direct inhibition of  $\alpha$ KGDH, the inhibitory effect of MMA on glutamate-supported respiration could also be due to the exchange of MMA for intramitochondrial-generated  $\alpha$ -ketoglutarate, depleting mitochondria from this respiratory substrate. Figure 5a shows representative traces of brain mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate efflux estimated by an indirect fluorometric methodology (Contreras and Satriestegui, 2009). Under

control conditions, using glutamate as respiratory substrate, only a minimal mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate efflux was detected (Fig. 5b). When the same experiment was conducted in medium supplemented with malate, a remarkable  $\alpha$ -ketoglutarate efflux was detected, supporting the finding that substantial  $\alpha$ -ketoglutarate carrier activity is present in brain mitochondria (Contreras and Satriestegui, 2009; De Palma et al., 2010). In addition, in the presence of MMA (0.5 mM), an increasing mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate efflux was also detected. The experiments on mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate efflux corroborate the proposition that this substrate can be exchanged for extramitochondrial MMA, depleting the mitochondria of  $\alpha$ -ketoglutarate.

### Mitochondrial MMA Accumulation and Its Effect on $\alpha$ -Ketoglutarate-Sustained Respiration

Next, we evaluated the inhibitory effect of MMA on mitochondrial respiration maintained by  $\alpha$ KGDH activity. The experiments were conducted in the presence of the dicarboxylate malonate, a substrate for the  $\alpha$ -ketoglutarate carrier (Sluse et al., 1972). Malonate promotes  $\alpha$ -ketoglutarate influx, minimizing  $\alpha$ -ketoglutarate/MMA exchange and avoiding the stimulatory effect of MMA on  $\alpha$ -ketoglutarate-supported oxygen consumption, as can be observed in Figure 1. In addition, the inhibition of succinate dehydrogenase by malonate ensures that oxygen consumption under these experimental conditions is not related to the activity of other citric acid cycle enzymes. We concluded that the presence of malonate and the use of limiting  $\alpha$ -ketoglutarate concentrations ( $\leq 2$  mM) allow the inhibitory effect of MMA on  $\alpha$ -ketoglutarate-supported oxygen consump-



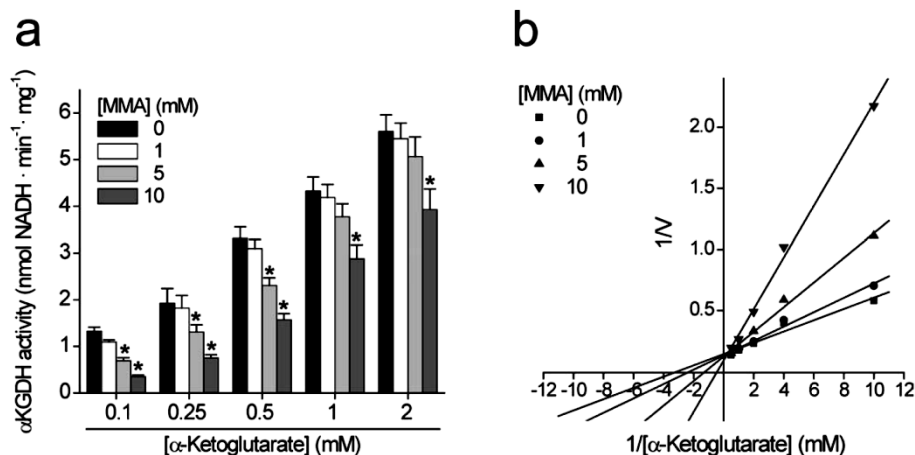


Fig. 4. Inhibitory effect of MMA on  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase activity. Measurements of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase activity were conducted in reaction medium containing 0.5 mg/ml rat brain mitochondria and  $\alpha$ -ketoglutarate (0.1, 0.25, 0.5, 1, or 2 mM) in the absence or presence of MMA (1–10 mM). **a**:  $\alpha$ -Ketoglutarate dehydro-

genase activity is expressed as absolute rate of NADH produced. **b**: Double-reciprocal plot (Lineweaver-Burk) showing the competitive profile of inhibition of enzymatic activity by MMA. Data represent the mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments performed in duplicate. \*Significantly different from the control at  $P < 0.01$ .

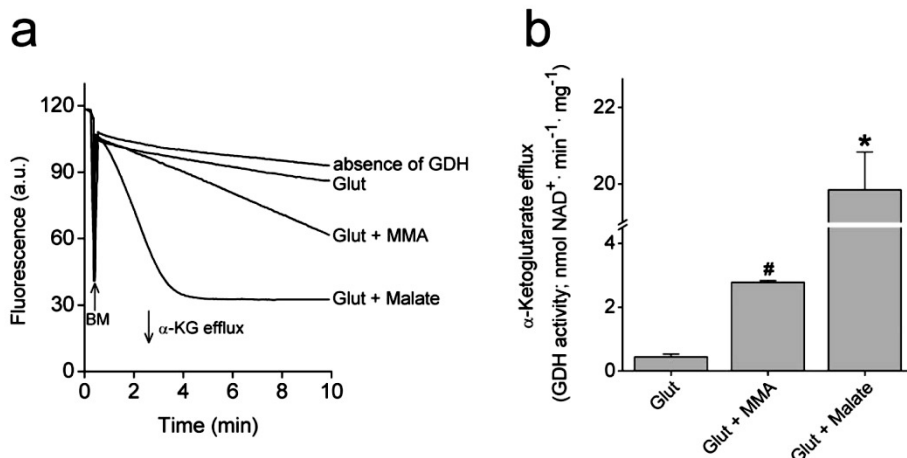


Fig. 5. Stimulatory effect of MMA on mitochondrial efflux of  $\alpha$ -ketoglutarate by the  $\alpha$ -ketoglutarate carrier. Isolated brain mitochondria (0.5 mg/ml) from 8-week-old control rats were incubated in reaction medium containing 3 mM glutamate (Glut) in the absence or presence of 0.5 mM MMA and 0.5 mM malate. **a**: Representative traces of NADH consumption by glutamate dehydrogenase (GDH) as a function of mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate efflux. Where indicated by

the arrow, the mitochondrial suspension (BM) was added to the reaction medium. **b**: Absolute rates of NAD<sup>+</sup> produced by glutamate dehydrogenase (GDH) as a function of mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate efflux. Data represent the mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments performed in duplicate. a.u., Fluorescence arbitrary units. #Significantly different from "Glut" at  $P < 0.05$ . \*Significantly different from "Glut" at  $P < 0.001$ .

tion to be evaluated. Notably, under these experimental conditions MMA promoted dose-dependent inhibition of mitochondrial respiration (Fig. 6) and produced approximately 70% inhibition when the lowest concentration of  $\alpha$ -ketoglutarate (0.25 mM) was tested in the presence of 10 mM MMA.

We also estimated MMA accumulation in brain mitochondria. When the organelles were incubated for 8 min in the presence of 2 mM MMA and absence of

exogenous substrates, intramitochondrial MMA concentration was  $5.86 \pm 0.56$  mM ( $n = 4$ ; considering a mitochondrial matrix volume of 0.9  $\mu$ l/mg protein; Brustovetsky et al., 2005). No difference in mitochondrial MMA accumulation was found when the mitochondria were incubated in the presence of MMA and either 3 mM glutamate (intramitochondrial MMA:  $6.54 \pm 0.79$  mM) or 1.5 mM  $\alpha$ -ketoglutarate (intramitochondrial MMA:  $6.63 \pm 0.57$  mM). MMA can enter and leave

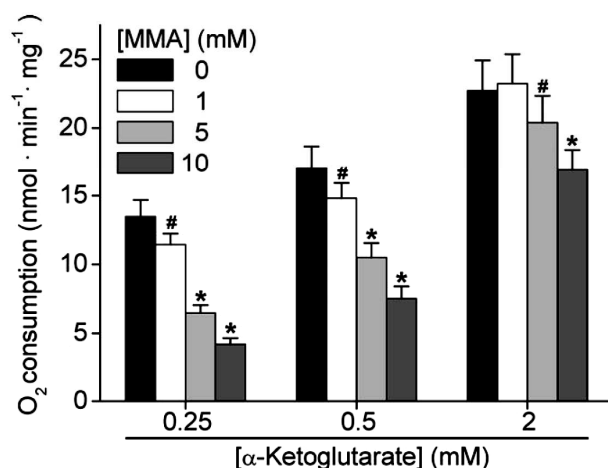


Fig. 6. Inhibitory effect of MMA on  $\alpha$ -ketoglutarate-supported brain mitochondrial oxygen consumption in the presence of malonate. Isolated forebrain mitochondria (0.5 mg/ml) from 8-week-old control rats were incubated in standard reaction medium containing 800  $\mu$ M ADP and  $\alpha$ -ketoglutarate (0.25, 0.5, or 2 mM). Mitochondrial oxygen consumption was measured in the absence or presence of MMA (1–10 mM). Measurements were conducted in the presence of 0.5 mM malonate to promote succinate dehydrogenase inhibition and  $\alpha$ -ketoglutarate/malonate exchange. Data represent the mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments performed in duplicate. #Significantly different from the control at  $P < 0.05$ . \*Significantly different from the control at  $P < 0.01$ .

mitochondria through three different transport systems (Halperin et al., 1971), allowing a considerable, constant intramitochondrial concentration of this metabolite to be achieved. This might explain why our results for intramitochondrial accumulation of MMA failed to show any effect of exogenous glutamate and  $\alpha$ -ketoglutarate. Interestingly, the concentration of the accumulated MMA was three times that of the initial extramitochondrial MMA used in the experiment. This result is in accordance with results from Toyoshima et al. (1995), who showed that liver mitochondria can take up and accumulate exogenous MMA, leading to up to nine times higher MMA concentrations inside the mitochondrial matrix than in the extramitochondrial environment. Our findings indicate that brain mitochondria are able to accumulate MMA in concentrations that are high enough to inhibit  $\alpha$ KGDH activity competitively.

Thus, we suggest that the inhibitory effect of MMA on brain glutamate oxidative metabolism is associated with mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate depletion as a result of inhibition of  $\alpha$ KGDH and with the exchange of extramitochondrial MMA for intramitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate. The diminished supply of intermediates to the citric acid cycle may explain the impairment of oxidative metabolism in methylmalonic acidemia (Wajner and Coelho, 1997; Morath et al., 2008; Melo et al., 2011). In addition, glutamatergic neurotransmission would also be compromised by the lack of mitochon-

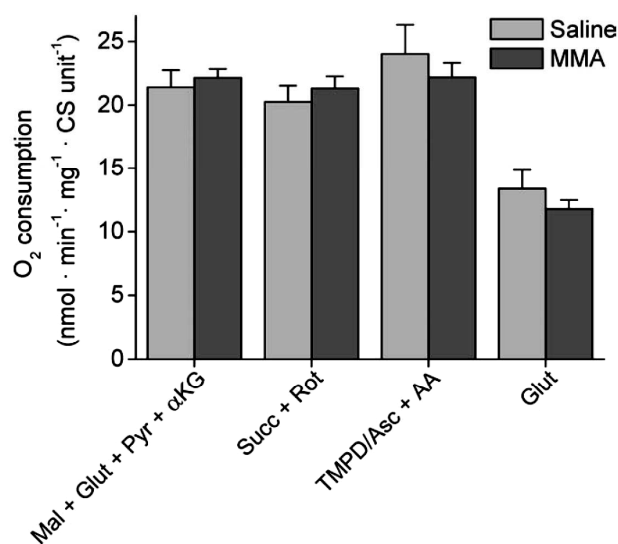


Fig. 7. Effect of chronic in vivo treatment with MMA on brain mitochondrial oxygen consumption. Isolated brain mitochondria (0.5 mg/ml) from 21-day-old rats chronically treated with MMA (or saline solution) were incubated in standard reaction medium containing a cocktail of NADH-linked substrates (malate, glutamate, pyruvate, and  $\alpha$ -ketoglutarate, 1.25 mM each). Other experiments were conducted in the presence of 5 mM succinate plus rotenone 2  $\mu$ M (Succ + Rot) and 200  $\mu$ M TMPD/1 mM ascorbate plus 1  $\mu$ M antimycin A (TMPD/Asc + AA) or 5 mM glutamate (Glut). All assays were conducted in the presence of 800  $\mu$ M ADP. Data are shown as oxygen consumption rates normalized to citrate synthase (CS) activity. Data represent the mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments performed in duplicate.

drial  $\alpha$ -ketoglutarate, because a large amount of this substrate is consumed during de novo glutamate synthesis (Daikhin and Yudkoff, 2000; McKenna, 2007).

#### Effect of Chronic In Vivo Treatment With MMA on Oxygen Consumption by Isolated Brain Mitochondria

There is evidence of oxidative metabolism dysfunction in the brain as a result of in vivo MMA treatment (Dutra et al., 1991a; Pettenuzzo et al., 2006), so we investigated the impact of this treatment on isolated brain mitochondria. Young rats were chronically treated with MMA using a protocol to achieve plasmatic concentrations of 2–2.5 mM (Dutra et al., 1991b), similar to those found in methylmalonic patients. After 16 days of MMA treatment, brain mitochondria were isolated, and oxygen consumption was measured in the presence of different respiratory substrates. Results for oxygen consumption were normalized to the activity of the enzyme citrate synthase, a quantitative marker for the presence of mitochondria. The results displayed in Figure 7 show no inhibitory effect of in vivo MMA treatment on mitochondrial respiration when a cocktail of NADH-linked substrates, glutamate, and succinate or TMPD/ascorbate

was used as electron donor. The absence of any MMA effect might have been due to the fact that this metabolite was removed when the mitochondria were isolated. These results indicate that in vivo treatment with MMA does not result in permanent changes in mitochondrial oxidative metabolism. The deleterious effects of MMA on mitochondrial bioenergetics may require its distribution in the mitochondrial compartment.

No differences in brain weight were observed between the experimental groups (control rats:  $1.48 \pm 0.05$  g; MMA-treated rats:  $1.40 \pm 0.05$  g;  $n = 6$ ). The total amount of mitochondrial protein obtained from control and MMA-treated rat brains corresponded to  $0.59\% \pm 0.10\%$  and  $0.56\% \pm 0.10\%$  of the rat brain weight, respectively. Citrate synthase activity in brain homogenates from control and MMA-treated rats was  $1.35 \pm 0.07$  U/mg and  $1.34 \pm 0.08$  U/mg ( $n = 6$ ), respectively. Citrate synthase activity in suspensions of isolated brain mitochondria was  $2.44 \pm 0.16$  U/mg for control and  $2.58 \pm 0.84$  U/mg for MMA-treated rats ( $n = 6$ ). These results indicate that the amounts of mitochondria obtained in the isolation procedure did not differ and that there was no mitochondrial selection during the isolation procedure.

## CONCLUSIONS

Altogether, our results support the idea that MMA has important effects on brain mitochondrial oxidative metabolism. Studying the inhibitory effect of MMA on mitochondrial glutamate metabolism, we found that this metabolite inhibits  $\alpha$ KGDH activity by competing with  $\alpha$ -ketoglutarate. In addition, the exchange of MMA for matrix  $\alpha$ -ketoglutarate depletes mitochondria from this substrate. These MMA effects would result in a reduced supply of intermediates to the citric acid cycle, which may explain the impairment of oxidative metabolism in methylmalonic acidemia. Chronic in vivo treatment with MMA did not result in permanent changes in mitochondrial function.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the expert technical support of Edilene S. Santos and thank Dr. Valdemir M. Carvalho (Fleury Medicine and Health) for his assistance with the MMA quantifications and Dr. Moacir Wajner for taking part in discussions. D.R.M. and S.R.M. were supported by FAPESP and CNPq fellowships, respectively.

## REFERENCES

- Brismar J, Ozand PT. 1994. CT and MR of the brain in disorders of the propionate and methylmalonate metabolism. *AJNR Am J Neuroradiol* 15:1459–1473.
- Brustovetsky T, Shalbuyeva N, Brustovetsky N. 2005. Lack of manifestations of diazoxide/5-hydroxydecanoatesensitive  $K_{ATP}$  channel in rat brain nonsynaptosomal mitochondria. *J Physiol* 568:47–59.
- Carvalho VM, Kok F. 2008. Determination of serum methylmalonic acid by alkylative extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 381:67–73.
- Chandler RJ, Zervas PM, Shanske S, Sloan J, Hoffmann V, DiMauro S, Venditti CP. 2009. Mitochondrial dysfunction in mutant methylmalonic acidemia. *FASEB J* 23:1252–1261.
- Cheeseman AJ, Clark JB. 1988. Influence of the malate-aspartate shuttle on oxidative metabolism in synaptosomes. *J Neurochem* 50:1559–1565.
- Contreras L, Satriestegui J. 2009. Calcium signaling in brain mitochondria: interplay of malate aspartate NADH shuttle and calcium uniporter/mitochondrial dehydrogenase pathways. *J Biol Chem* 284:7091–7099.
- Daikhin Y, Yudkoff M. 2000. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr* 130(Suppl 4S):1026S–1031S.
- De Palma A, Prezioso G, Spagnoletta A, Genchi G, Scalera V. 2010. The oxoglutarate/malate carrier of rat brain mitochondria operates by a uniport exchange mechanism. *J Bioenerg Biomembr* 42:371–379.
- Dennis SC, Clark JB. 1977. The pathway of glutamate metabolism in rat brain mitochondria. *Biochem J* 168:521–527.
- Dennis SC, Land JM, Clark JB. 1976. Glutamate metabolism and transport in rat brain mitochondria. *Biochem J* 156:323–331.
- Dutra JC, Wajner M, Wannmacher CF, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM. 1991a. Effects of methylmalonate and propionate on uptake of glucose and ketone bodies in vitro by brain of developing rats. *Biochem Med Metab Biol* 45:56–64.
- Dutra JC, Wajner M, Wannmacher CM, Wannmacher LE, Pires RF, Rosa-Júnior A. 1991b. Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. *Braz J Med Biol Res* 24:595–605.
- 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 Inher Metab Dis* 16:147–153.
- Erecińska M, Zaleska MM, Nissim I, Nelson D, Dagani F, Yudkoff M. 1988. Glucose and synaptosomal glutamate metabolism: studies with [ $^{15}$ N]glutamate. *J Neurochem* 51:892–902.
- Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt JS. 2001. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill. p2165–2193.
- Fiermonte G, Palmieri L, Todisco S, Agrimi G, Palmieri F, Walker JE. 2002. Identification of the mitochondrial glutamate transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J Biol Chem* 277:19289–19294.
- 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* 10:2039–2043.
- Gibson GE, Park LC, Sheu KF, Blass JP, Calingasan NY. 2000. The  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration. *Neurochem Int* 36:97–112.
- Gibson GE, Blass JP, Beal MF, Bunik V. 2005. The  $\alpha$ -ketoglutarate-dehydrogenase complex: a mediator between mitochondria and oxidative stress in neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31:43–63.
- Halperin ML, Schiller CM, Fritz IB. 1971. The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. A possible explanation for hypoglycemia in methylmalonic aciduria. *J Clin Invest* 50:2276–2282.
- Harting I, Seitz A, Geb S, Zwickler T, Porto L, Lindner M, Kölker S, Hörster F. 2008. Looking beyond the basal ganglia: the spectrum of MRI changes in methylmalonic acidemia. *J Inher Metab Dis* 31:368–378.
- Hayasaka K, Metoki K, Satoh T, Narisawa K, Tada K, Kawakami T, Matsuo N, Aoki T. 1982. Comparison of cytosolic and mitochondrial enzyme alterations in the livers of propionic or methylmalonic acidemia: a reduction of cytochrome oxidase activity. *J Exp Med* 137:329–334.



- Johnson RN, Chappell JB. 1974. The inhibition of mitochondrial dicarboxylate transport by inorganic phosphate, some phosphate esters and some phosphonate compounds. *Biochem J* 138:171–175.
- Kölker S, Okun JG. 2005. Methylmalonic acid—an endogenous toxin? *Cell Mol Life Sci* 62:621–624.
- Kowaltowski AJ, Maciel EN, Fornazari M, Castilho RF. 2006. Diazoxide protects against methylmalonate-induced neuronal toxicity. *Exp Neurol* 201:165–171.
- Maciel EN, Kowaltowski AJ, Schwalm FD, Rodrigues JM, Souza DO, Vercesi AE, Wajner M, Castilho RF. 2004. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by  $\text{Ca}^{2+}$  and respiratory chain complex II inhibition. *J Neurochem* 90:1025–1035.
- McKenna MC. 2007. The glutamate–glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res* 85:3347–3358.
- Melo DR, Kowaltowski AJ, Wajner M, Castilho RF. 2011. Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia. *J Bioenerg Biomembr* 43:39–46.
- 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.
- Morath MA, Okun JG, Müller IB, Sauer SW, Hörster F, Hoffmann GF, Kölker S. 2008. Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria—a pathophysiological approach. *J Inherit Metab Dis* 31:35–43.
- 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.
- Pettenuzzo LF, Ferreira Gda 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.
- Pinar-Sueiro S, Martínez-Fernández R, Lage-Medina S, Aldamiz-Echevarria L, Vecino E. 2010. *J Inherit Metab Dis* DOI: 10.1007/s10545-010-9084-8.
- Robinson J, Cooper JM. 1970. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal Biochem* 33:390–399.
- Rosenthal RE, Hamud F, Fiskum G, Varghese PJ, Sharpe S. 1987. Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:752–758.
- Sauer SW, Okun JG, Hoffmann GF, Koelker S, Morath MA. 2008. Impact of short- and medium-chain organic acids, acylcarnitines, and acyl-CoAs on mitochondrial energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1777:1276–1282.
- Schuck PF, Rosa RB, Pettenuzzo LF, Sitta A, Wannmacher CM, Wyse AT, Wajner M. 2004. Inhibition of mitochondrial creatine kinase activity from rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* 45:661–667.
- Shepherd JA, Garland PB. 1969. Citrate synthase from rat liver. *Methods Enzymol* 13:11–19.
- Sluse FE, Ranson M, Liébecq C. 1972. Mechanism of the exchanges catalysed by the oxoglutarate translocatory of rat-heart mitochondria. Kinetics of the exchange reactions between 2-oxoglutarate, malate and malonate. *Eur J Biochem* 25:207–217.
- Tanpaiboon P. 2005. Methylmalonic acidemia (MMA). *Mol Genet Metab* 85:2–6.
- Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Miyatake K, Nakano Y. 1995. Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. *J Nutr* 125:2846–2850.
- Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Pezacka EH, Jacobsen DW, Miyatake K, Nakano Y. 1996. Accumulation of methylmalonic acid caused by vitamin B12-deficiency disrupts normal cellular metabolism in rat liver. *Br J Nutr* 75:929–938.
- Venditti CP. 2005. Methylmalonic acidemia. In: *GeneReviews at GeneTests*, University of Washington, Seattle: Medical Genetics Information Resource [database online at <http://www.genetests.org>; accessed March, 2011].
- Wajner M, Coelho JC. 1997. Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production. *J Inherit Metab Dis* 20:761–768.
- Wajner M, Dutra JC, Cardoso SE, Wannmacher CM, Motta ER. 1992. Effect of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. *J Inherit Metab Dis* 15:92–96.
- Yu AC, Schousboe A, Hertz L. 1982. Metabolic fate of  $^{14}\text{C}$ -labeled glutamate in astrocytes in primary cultures. *J Neurochem* 39:954–960.
- Zhang X, Vincent AS, Halliwell B, Wong KP. 2004. A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 279:43035–43045.



## 7.2 Autorizações de “Copyright”

**Artigo I** da seção “Anexos - 7.1 Principais artigos relacionados à Tese”: A editora “Springer” concedeu sob requisição a licença para inclusão do artigo em tese ou dissertação do autor. Abaixo consta a página principal do termo de licença.

**SPRINGER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Jan 13, 2012

---

This is a License Agreement between Daniela R Melo ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

|                                     |                                                                                             |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| License Number                      | 2826090629060                                                                               |
| License date                        | Jan 11, 2012                                                                                |
| Licensed content publisher          | Springer                                                                                    |
| Licensed content publication        | Journal of Bioenergetics and Biomembranes                                                   |
| Licensed content title              | Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia |
| Licensed content author             | Daniela R. Melo                                                                             |
| Licensed content date               | Jan 1, 2011                                                                                 |
| Volume number                       | 43                                                                                          |
| Issue number                        | 1                                                                                           |
| Type of Use                         | Thesis/Dissertation                                                                         |
| Portion                             | Full text                                                                                   |
| Number of copies                    | 1                                                                                           |
| Author of this Springer article     | Yes and you are a contributor of the new work                                               |
| Order reference number              |                                                                                             |
| Title of your thesis / dissertation | ALTERAÇÕES DO METABOLISMO OXIDATIVO MITOCONDRIAL E NEURODEGENERAÇÃO POR METILMALONATO       |
| Expected completion date            | Feb 2012                                                                                    |
| Estimated size(pages)               | 100                                                                                         |
| Total                               | 0.00 USD                                                                                    |
| Terms and Conditions                |                                                                                             |

**Introduction**  
The publisher for this copyrighted material is Springer Science + Business Media. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

**Limited License**  
With reference to your request to reprint in your thesis material on which Springer Science and Business Media control the copyright, permission is granted, free of charge, for the use indicated in your enquiry. Licenses are for one-time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process.

**Artigo II** da seção “Anexos - 7.1 Principais artigos relacionados à Tese”: A editora “John Wiley and Sons” concedeu sob requisição a licença para inclusão do artigo em tese ou dissertação do autor. Abaixo consta a página principal do termo de licença.

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Feb 27, 2012

This is a License Agreement between Daniela R Melo ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley and Sons, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

|                              |                                                                                                                                         |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| License Number               | 2857180313827                                                                                                                           |
| License date                 | Feb 27, 2012                                                                                                                            |
| Licensed content publisher   | John Wiley and Sons                                                                                                                     |
| Licensed content publication | Journal of Neuroscience Research                                                                                                        |
| Licensed content title       | Methylmalonate impairs mitochondrial respiration supported by NADH-linked substrates: Involvement of mitochondrial glutamate metabolism |
| Licensed content author      | Daniela R. Melo,Sandra R. Mirandola,Nilson A. Assunção,Roger F. Castilho                                                                |
| Licensed content date        | Jan 1, 2012                                                                                                                             |
| Start page                   | n/a                                                                                                                                     |
| End page                     | n/a                                                                                                                                     |
| Type of use                  | Dissertation/Thesis                                                                                                                     |
| Requestor type               | Author of this Wiley article                                                                                                            |
| Format                       | Print and electronic                                                                                                                    |
| Portion                      | Full article                                                                                                                            |
| Will you be translating?     | No                                                                                                                                      |
| Order reference number       |                                                                                                                                         |
| Total                        | 0.00 USD                                                                                                                                |

Terms and Conditions

**TERMS AND CONDITIONS**

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or a society for whom a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular journal (collectively WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your Rightslink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>)

Terms and Conditions

1. The materials you have requested permission to reproduce (the "Materials") are protected by copyright.
2. You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sublicensable, non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Materials for the purpose specified in the licensing

### 7.3 Parecer de aprovação do Comitê de Ética



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

#### CERTIFICADO

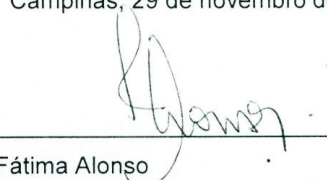
Certificamos que o Protocolo nº 1142-1, sobre "Caracterização da disfunção mitocondrial na Acidemia Metilmalônica", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Roger Frigério Castilho / Daniela Rodrigues de Melo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 29 de novembro de 2006.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1142-1, entitled "Characterization of the mitochondrial disfunction in the methylmalonic acidemia", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on November 29, 2006.

Campinas, 29 de novembro de 2006.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3788-6359  
Telefax: (19) 3788-6356  
E-mail: [ceea@cemib.unicamp.br](mailto:ceea@cemib.unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>

## 7.4 Currículo

**Nome:** Daniela Rodrigues de Melo

**Data de nascimento:** 14/03/1982

### **Educação:**

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura), 2001-2006

### **Publicações:**

Mirandola SR\*, **Melo DR**\*, Schuck PF, Ferreira GC, Wajner M, Castilho RF. Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. (\*Contribuíram igualmente para este trabalho) *Journal of Inherited Metabolic Disease* **31**: 44-54, 2008.

Mirandola SR, **Melo DR**, Saito A, Castilho RF. 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *Journal of Neuroscience Research* **88**: 630-639, 2010.

**Melo DR**, Kowaltowski AJ, Wajner M, Castilho RF. Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **43**: 39-46, 2011.

Zecchin KG, Rossato FA, Raposo HF, **Melo DR**, Alberici LC, Oliveira HC, Castilho RF, Coletta RD, Vercesi AE, Graner E. Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis. *Laboratory Investigation* **91**: 232-240, 2011.

Figueira TR, **Melo DR**, Vercesi AE, Castilho RF. Safranine as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. *Methods in Molecular Biology* **810**: 103-117, 2012.

Amaral AU, Cecatto C, Busanello EN, Ribeiro CA, **Melo DR**, Leipnitz G, Castilho RF, Wajner M. Ethylmalonic acid impairs brain mitochondrial succinate and malate transport.

*Molecular Genetics and Metabolism* **105**: 84-90, 2012.

**Melo DR**, Mirandola SR, Assunção NA, Castilho RF. Methylmalonate impairs mitochondrial respiration supported by NADH-linked substrates: The involvement of mitochondrial glutamate metabolism.

*Journal of Neuroscience Research* (2012 - doi: 10.1002/jnr.23020).