

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

**EFEITOS *IN VITRO* E *EX VIVO* DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS  
ACUMULADOS NAS ACIDEMIAS ISOVALÉRICA, 3-METILGLUTACÔNICA  
E 3-HIDROXI-3-METILGLUTÁRICA SOBRE VÁRIOS PARÂMETROS DO  
METABOLISMO ENERGÉTICO EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS  
JOVENS**

**CÉSAR AUGUSTO JOÃO RIBEIRO**

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

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas -  
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito  
parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.**

**Porto Alegre, 2009**

*“Só sei que nada sei.”*

*Sócrates*

*À Luciana e  
às minhas meninas.*

## AGRADECIMENTOS

À UFRGS, pública e gratuita, juntamente com este Departamento, que me acolheu desde 1999 e me proporcionaram uma formação de altíssima qualidade.

Aos funcionários deste Departamento, em especial à Cléia, pois sem ela seguramente as coisas aqui não funcionariam tão bem como funcionam.

Aos professores deste Departamento, pelos ensinamentos transmitidos durante todos esses anos.

Em especial aos professores do Grupo de Erros Inatos do Metabolismo, Clóvis, Dutra e Ângela, pelo companheirismo, carinho e experiências transmitidas nesses anos.

Aos *parceiros* Guilhian e Patrícia, agora também doutores, companheiros desde os tempos da faculdade, bons amigos nos bons e maus momentos.

Ao Fabrício e à Vanessa, pessoas muito especiais, que comigo aturaram o “cheirinho” desagradável do ácido isovalérico em uma parte desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório 38, o melhor laboratório desde Departamento, companheiros divertidos, dinâmicos e extremamente competentes.

Ao Professor Moacir, meu orientador desde sempre, pela experiência profissional e de pesquisa, carinho e orientação de vida nesses anos.

À minha família, meus pais Braz e Lourdes, pela formação de caráter e por todo o suporte durante a vida inteira, e à minha irmã Valéria, pelo carinho e companheirismo.

E por último, e definitivamente não menos importante, à Luciana, minha mulher, amada que vem me apoiando desde o início da faculdade e me deu as coisas mais importantes que tenho na vida: minhas filhas Maria Eduarda e Maria Fernanda, que chegaram em 2006 e 2008 para abrilhantar meu trabalho de doutorado.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

EIM – Erros inatos do metabolismo

IVAcidemia – Acidemia isovalérica

IVD – Isovaleril-CoA desidrogenase

IVA – Ácido isovalérico

3-OHIVA – Ácido 3-hidroxiisovalérico

IVG – Isovalerilglicina

MGTA – Acidemia 3-metilglutacônica

MGT – Ácido 3-metilglutacônico

MGA – Ácido 3-metilglutárico

CTE – Cadeia de transporte de elétrons

HL – 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA

SNC – Sistema nervoso central

CK – creatina quinase

icv – intracerebroventricular

## RESUMO

As acidemias isovalérica (IVAcidemia), 3-metilglutacônica (MGTA) e 3-hidroxi-3-metilglutárica (HMGA) são doenças hereditárias neurometabólicas que afetam o catabolismo da leucina. Os pacientes afetados pela IVAcidemia apresentam acúmulo e excreção urinária aumentada dos ácidos isovalérico (IVA), 3-hidroxiisovalérico (3-OHIVA) e da isovalerilglicina, ao passo que a MGTA é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo e aumento na excreção urinária dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT), 3-metilglutárico (MGA) e 3-OHIVA. Os indivíduos afetados pela HMGA apresentam acúmulo e elevada excreção dos ácidos 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMG), MGA, MGT e 3-OHIVA. Os pacientes afetados por essas doenças apresentam sintomas predominantemente neurológicos cujos mecanismos fisiopatogênicos envolvidos no dano cerebral são pouco conhecidos. No presente estudo, investigamos os efeitos *in vitro* dos metabólitos acumulados na IVAcidemia (IVA, 3-OHIVA e IVG), bem como da administração intracerebroventricular de IVA sobre importantes parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens. Observamos efeitos inibitórios do IVA sobre o ciclo do ácido cítrico (produção de CO<sub>2</sub> e citrato sintase), bem como sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, sugerindo que esse ácido orgânico pode causar disfunção mitocondrial e prejudicar a neurotransmissão. Além disso, demonstramos que os efeitos inibitórios causados pelo IVA, tanto *in vitro* quanto *ex vivo*, sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase foram prevenidos pela pré-incubação com trolox e creatina (ensaios *in vitro*) e pelo pré-tratamento (experimentos *ex vivo*) com creatina, respectivamente, sugerindo o envolvimento da formação de espécies reativas nesse efeito inibitório.

Além disso, estudamos os efeitos *in vitro* dos metabólitos acumulados na MGTA sobre parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens. Nossos resultados demonstraram que tanto o MGT quanto o MGA não causaram qualquer alteração *in vitro* nos parâmetros de metabolismo energético examinados (produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose, atividade dos complexos da cadeia de transporte de elétrons e das enzimas creatina quinase e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase), sugerindo assim que as alterações neurológicas apresentadas pelos pacientes afetados por essa doença não parecem ser devidas à redução na produção, na transferência ou na utilização de energia pelo cérebro.

Finalmente, estudamos também os efeitos *in vitro* e da administração intracerebroventricular *in vivo* do HMG sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens. Demonstramos que o HMG não causa qualquer alteração tanto *in vitro* quanto *ex vivo* nos parâmetros analisados em córtex cerebral de ratos, indicando assim que as alterações neurológicas apresentadas pelos pacientes não parecem ser devidas a inibições na produção, na transferência ou na utilização de energia pelo cérebro.

Tomados em seu conjunto, os resultados presentes apontam para um efeito neurotóxico do IVA *in vitro* e *in vivo*, inibindo o metabolismo energético e provavelmente a neurotransmissão em córtex cerebral. Considerando-se que esse ácido orgânico acumula-se predominantemente na IVAcidemia, a mais severa das três doenças estudadas, é possível concluir que as convulsões frequentes e a atrofia cortical severa que acomete os pacientes afetados por essa doença possam ser devidos à inibição da produção de energia e da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, uma enzima crucial para a neurotransmissão glutamatérgica.

**ABSTRACT**

Isovaleric (IVAcidemia), 3-methylglutaconic (MGTA) and 3-hydroxy-3-methylglutaric (HMGA) acidemias are inborn neurometabolic diseases affecting leucine catabolism. IVAcidemia is characterized by accumulation and high urinary excretion of isovaleric (IVA) and 3-hydroxyisovaleric (3-OHIVA) acids and isovalerylglycine (IVG), whereas MGTA is biochemically characterized by accumulation of the branched-chain organic acids 3-methylglutaconic (MGT), 3-methylglutaric (MGA) and OHIVA. HMGA is characterized by high urinary excretion of the organic acids 3-hydroxy-3-methylglutaric (HMG), MGA, MGT and 3-OHIVA. Patients affected by these acidemias predominantly present neurologic symptoms whose mechanisms involved in the pathophysiology of cerebral damage are virtually unknown. In the present study, we investigated the *in vitro* effects of the metabolites accumulating in IVAcidemia (IVA, 3-OHIVA and IVG), as well as the effects of intracerebroventricular injection of IVA on important parameters of energy metabolism in cerebral cortex of young rats. We observed that IVA inhibited citric acid cycle activity (CO<sub>2</sub> production and citrate synthase activity), as well as the activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, suggesting that this organic acid can induce mitochondrial dysfunction and disturb neurotransmission. Moreover, we demonstrated that the *in vitro* and *ex vivo* inhibitory effects caused by IVA on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity were prevented by pre-incubation with trolox and creatine (*in vitro* experiments) and pre-treatment with creatine (*in vivo* experiments), suggesting the participation of reactive species formation on this inhibitory effect.

Next, we studied the *in vitro* effect of the metabolites accumulating in MGTA on energy metabolism parameters on cerebral cortex of young rats. Our results showed that both MGT and MGA did not alter the parameters analyzed (CO<sub>2</sub> production from glucose, the activities of the electron transfer chain complexes and of the enzymes creatine kinase and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase), suggesting that the neurological alterations presented by patients affected by MGTA are not due to reduction on energy production, transfer or utilization by the brain.

Finally, we also studied the *in vitro* and of intracerebroventricular administration effects of HMG on energy metabolism parameters in cerebral cortex of young rats. We demonstrated that HMG did not alter both *in vitro* and *ex vivo* the analyzed parameters on cerebral cortex of rats, indicating that the neurological alterations presented by affected patients are not caused by inhibition of production, transfer or utilization of energy by the brain.

Taking together, our results point to a neurotoxic effect of IVA *in vitro* and *in vivo*, by inhibit energy metabolism and probably neurotransmission in cerebral cortex. Considering that this organic acid accumulates in IVAcidemia, the most severe of the diseases studied, it is feasible to conclude that convulsions and cortical atrophy presented by affected patients can be due to inhibition of energy production and of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity, a crucial enzyme for glutamatergic neurotransmission.

## SUMÁRIO

<i>I- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</i> .....	1
I.1. INTRODUÇÃO .....	2
I.1.1. Erros Inatos do Metabolismo .....	2
I.1.2. Acidemias Orgânicas .....	3
I.1.3. Metabolismo da Leucina .....	4
I.1.4. Erros Inatos do Metabolismo da Leucina .....	7
I.1.4.1. Acidemia Isovalérica .....	7
I.1.4.1.1. Manifestações clínicas .....	8
I.1.4.1.2. Diagnóstico .....	10
I.1.4.1.3. Tratamento .....	12
I.1.4.1.3. Fisiopatologia .....	13
I.1.4.2. Acidemia 3-metilglutacônica .....	14
I.1.4.2.1. Acidemia 3-metilglutacônica (MGTA) tipo I .....	14
I.1.4.2.1.1. Manifestações clínicas .....	14
I.1.4.2.1.2. Diagnóstico .....	15
I.1.4.2.1.3. Tratamento .....	15
I.1.4.2.2. Acidemia 3-metilglutacônica (MGTA) tipo II .....	15
I.1.4.2.3. Acidemia 3-metilglutacônica (MGTA) tipo III .....	16
I.1.4.2.4. Acidemia 3-metilglutacônica (MGTA) tipo IV .....	16
I.1.4.2.5. Acidemia 3-metilglutacônica (MGTA) tipo V .....	17
I.1.4.2.6. Fisiopatologia .....	17
I.1.4.3. Acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica .....	19
I.1.4.3.1. Manifestações clínicas .....	20
I.1.4.3.2. Diagnóstico .....	21
I.1.4.3.3. Tratamento .....	22
I.1.4.3.4. Fisiopatologia .....	22
I.1.5. Metabolismo Energético no Cérebro de Mamíferos .....	23
I.1.5.1. Fosforilação Oxidativa .....	24
I.1.5.2. Creatina Quinase .....	25
I.1.5.3. Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase .....	26
I.2. OBJETIVOS .....	28
I.2.1. Objetivo Geral .....	28
I.2.2. Objetivos Específicos .....	28
<i>II- RESULTADOS</i> .....	30



Capítulo I. Isovaleric acid reduces Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats.....	31
Capítulo II. Creatine administration prevents Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase inhibition induced by intracerebroventricular administration of isovaleric acid in cerebral cortex of young rats.....	44
Capítulo III. Efeitos <i>in vitro</i> dos compostos acumulados na acidemia 3-metilglutacônica sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.....	53
Capítulo IV. Efeitos <i>in vitro</i> e da administração intracerebroventricular do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.....	75
<i>III- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</i> .....	99
III.1- DISCUSSÃO.....	100
III.2- CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

## ***I- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS***

## **I.1. INTRODUÇÃO**

### **I.1.1. Erros Inatos do Metabolismo**

O termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi utilizado pela primeira vez por Archibald Garrod em 1908 durante estudos realizados com pacientes com alcaptonúria, doença em que os pacientes afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. O pesquisador observou que um ou mais indivíduos da mesma família eram afetados sem que seus pais apresentassem a doença. Baseado também na observação da maior incidência de consanguinidade entre os pais dos pacientes e nas leis de Mendel, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio. Através da determinação do ácido homogentísico na urina de pacientes com alcaptonúria e da observação de que esta substância era um metabólito normal da degradação da tirosina, Garrod relacionou este acúmulo a um bloqueio no metabolismo do ácido homogentísico. Verificou-se mais tarde que tais alterações resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, usualmente uma enzima (Scriver *et al.*, 2001). Presumiu-se então que em consequência deste bloqueio metabólico pode ocorrer o acúmulo de precursores tóxicos da reação catalisada pela enzima envolvida, com a formação de rotas metabólicas alternativas e a deficiência de produtos essenciais ao organismo (Bickel, 1987).

Atualmente, mais de 500 EIM foram descritos e caracterizados bioquimicamente, a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Scriver *et al.*, 2001). Embora individualmente raras, essas doenças em seu conjunto afetam aproximadamente um a cada 500 a 1000 recém nascidos vivos (Baric *et al.*, 2001).

### **I.1.2. Acidemias Orgânicas**

As acidemias ou acidúrias orgânicas são erros inatos do metabolismo nos quais um ou mais ácidos orgânicos acumulam-se nos tecidos dos pacientes afetados devido à deficiência da atividade de uma enzima do metabolismo de aminoácidos, lipídeos ou carboidratos (Chalmers e Lawson, 1982). Vários ácidos orgânicos estão presentes no sangue e na urina de indivíduos normais, porém em concentrações reduzidas. Nos pacientes com estes distúrbios, estes ácidos encontram-se em altas concentrações principalmente na urina.

Devido ao desconhecimento dessas patologias pela classe médica e a falta de laboratórios especializados na análise de ácidos orgânicos, a frequência destas doenças na população geral é pouco conhecida. Na Holanda, país considerado referência para o diagnóstico de erros inatos do metabolismo, a incidência destas doenças é estimada em 1: 2.200 habitantes, enquanto que na Alemanha, Israel e Inglaterra é de aproximadamente 1:6.000 – 1:9.000 recém-nascidos (Hoffmann *et al.*, 2004). Na Arábia Saudita, onde a taxa de consanguidade é elevada, a frequência é de 1: 740 nascidos vivos (Rashed *et al.*, 1994).

No início da década de 80 foi demonstrado que estes distúrbios eram os erros inatos do metabolismo mais frequentes em crianças severamente enfermas (Chalmers *et al.*, 1980), o que motivou maiores estudos clínico-laboratoriais e epidemiológicos nos anos que se seguiram.

Clinicamente os pacientes afetados apresentam como sintomatologia mais comum disfunção neurológica em suas diversas formas de expressão, incluindo regressão neurológica, convulsões, coma, ataxia, hipotonia, hipertonia, irritabilidade, tremores, movimentos coreatéticos, tetraparesia espástica, atraso no desenvolvimento psicomotor e outros. As mais frequentes manifestações laboratoriais são cetose,

cetonúria, neutropenia, trombocitopenia, acidose metabólica, baixos níveis de bicarbonato, hiperglicinemia, hiperglicinúria, hiperamonemia, hipo/hiperglicemia, acidemia láctica, aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres, bem como cheiro peculiar na urina e/ou suor (Saudubray *et al.*, 2006; Scriver *et al.*, 2001). Com a utilização da tomografia computadorizada e ressonância magnética nuclear, foram verificadas em pacientes afetados por estas doenças alterações de substância branca (hipomielinização e/ou desmielinização), atrofia cerebral generalizada, degeneração de gânglios da base (necrose ou calcificação), megaencefalia, atrofia frontotemporal e atrofia cerebelar (Mayatepek *et al.*, 1996).

### **I.1.3. Metabolismo da Leucina**

O aminoácido leucina, juntamente com a isoleucina e valina, constituem o grupo de aminoácidos de cadeia ramificada que são metabolizados em vários tecidos, podendo cruzar com facilidade a barreira hematoencefálica (Oldendorf, 1971). O metabolismo da leucina tem como produtos finais os corpos cetônicos acetoacetato e beta-hidroxi-butilato. Assim, no cérebro a leucina pode ser considerada como uma fonte endógena de corpos cetônicos, que participam juntamente com a glicose como fonte de energia para o cérebro (Morris, 2005).

A figura 1 representa esquematicamente a rota de catabolismo da leucina que é reversivelmente transaminada a ácido 2-cetoisocapróico (CIC) em uma reação catalisada pela enzima transaminase dos aminoácidos de cadeia ramificada. O CIC sofre descarboxilação oxidativa a isovaleril-CoA em uma reação catalisada pelo complexo da desidrogenase dos 2-cetoácidos de cadeia ramificada. A seguir, a isovaleril-CoA é convertida a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA em três reações enzimáticas, catalisadas pelas enzimas isovaleril-CoA desidrogenase, 3-metilcrotonil-CoA carboxilase e 3-

metilglutaconil-CoA hidratase. O produto da última reação é 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, que clivado em acetoacetato e acetil-CoA em uma reação catalisada pela enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase.

Além dessa via de degradação, a leucina pode ser metabolizada em uma rota alternativa, a via de catabolismo da  $\beta$ -leucina. Essa rota metabólica inicia com a migração em uma reação cobalamina-dependente do grupo 2-amino para a posição 3 e leva a formação dos metabólitos acetil-CoA e isobutiril-CoA, este último intermediário do catabolismo da valina. Essa via metabólica representa aproximadamente 1% do total de leucina oxidada no tecido nervoso (Poston, 1984).

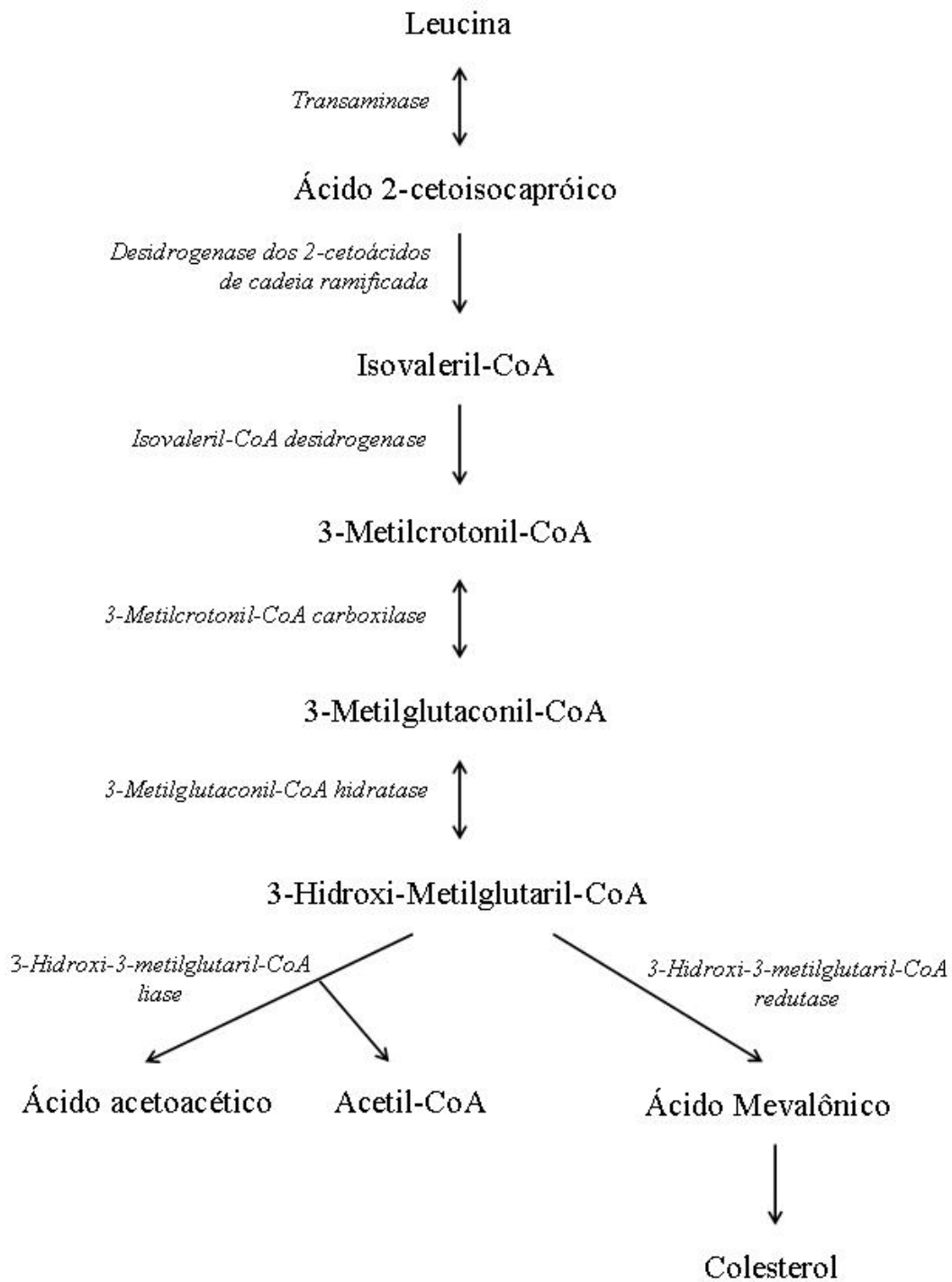


Figura 1. Catabolismo da leucina. Adaptado de Sweetman e Williams (2001).

## **I.1.4. Erros Inatos do Metabolismo da Leucina**

### **1.1.4.1. Acidemia Isovalérica**

A acidemia isovalérica (IVAcidemia, OMIM # 243500) é uma desordem metabólica autossômica recessiva da via de catabolismo da leucina inicialmente descrita por Tanaka e colaboradores em 1966 (Tanaka *et al.*, 1966). Bioquimicamente, a IVAcidemia é causada pela deficiência na atividade da enzima mitocondrial isovaleril-CoA desidrogenase (IVD), uma flavoenzima homotetramérica mitocondrial da família das desidrogenases de acil-CoAs (Tanaka *et al.*, 1966), que catalisa a desidrogenação  $\alpha$ - $\beta$  do isovaleril-CoA produzindo  $\beta$ -metilcrotonil-CoA. A IVAcidemia foi o primeiro distúrbio do metabolismo de ácidos orgânicos diagnosticado por cromatografia gasosa (CG), sendo esta técnica até o momento o melhor método analítico para ácidos orgânicos. Mais de 70 casos de IVAcidemia já foram relatados. Com o desenvolvimento da metodologia da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em Tandem (MS/MS ou Tandem MS) esta se tornou fundamental para o diagnóstico da IVAcidemia pela detecção de elevações da isovalerilcarnitina no sangue (Dionisi-Vici *et al.*, 2006; Ensenauer *et al.*, 2004; Millington *et al.*, 1990; Vockley e Ensenauer, 2006).

A deficiência na atividade da IVD leva ao acúmulo de isovaleril-CoA, ácido isovalérico (IVA), ácido 3-hidroxiisovalérico (3-OHIVA) e seus derivados de carnitina (isovalerilcarnitina) e glicina (isovalerilglicina, IVG) nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes (Tanaka *et al.*, 1966). A concentração normal de IVA no plasma é menor do que 10  $\mu$ M e durante o período de remissão da doença em pacientes em tratamento varia de 10 a 50  $\mu$ M. No entanto, em episódios de descompensação esses níveis alcançam até 100 a 500 vezes os níveis normais (600 a 5.000  $\mu$ M) no sangue. A quantidade de IVA excretado na urina dos pacientes afetados é na ordem de 8 a 300



$\mu\text{mol}/\text{dia}$ , enquanto em indivíduos normais é inferior a  $2 \mu\text{mol}/\text{dia}$  (Sweetman e Williams, 2001).

O metabólito encontrado em maiores concentrações urinárias na deficiência da atividade da IVD é a IVG, um composto amídico produzido pela conjugação do ácido isovalérico com a glicina (Tanaka e Isselbacher, 1967). Essa reação é catalisada pela enzima mitocondrial glicina N-acilase, que também forma benzoilglicina (ácido hipúrico) a partir de benzoil-CoA e glicina (Bartlett e Gompertz, 1974; Gregersen *et al.*, 1986). A excreção urinária de IVG pelos pacientes com IVAcidemia varia de 2.000 a 15.000  $\mu\text{mol}/\text{dia}$ , comparado com excreções normais de menos do que  $15 \mu\text{mol}/\text{dia}$ . A excreção dos metabólitos acumulados é maior durante episódios agudos, mas se mantém elevada durante a remissão da doença. Durante episódios agudos, quando a quantidade de isovaleril-CoA é muito aumentada, excede-se a capacidade catalítica da glicina N-acilase, e então as concentrações de IVA livre se tornam elevadas. Um segundo metabólito do IVA é o 3-OHIVA (Tanaka *et al.*, 1968), que é excretado em quantidades elevadas na urina principalmente durante episódios agudos, podendo atingir  $3.000 \mu\text{mol}/\text{dia}$ . A isovaleril-CoA pode formar também isovalerilcarnitina, que é importante para o diagnóstico da doença com a metodologia MS/MS (Sweetman e Williams, 2001).

#### **I.1.4.1.1. Manifestações clínicas**

Inicialmente, duas formas clínicas da IVAcidemia foram relatadas, com aproximadamente metade dos pacientes apresentando a forma neonatal grave aguda e a outra metade dos pacientes a forma intermitente e crônica. Recentemente, foi identificado um terceiro tipo de IVAcidemia com expressão fenotípica leve (Ensenauer

*et al.*, 2004). As três formas são devidas ao mesmo defeito bioquímico, ou seja, a deficiência da atividade da IVD (Sweetman e Williams, 2001).

Na forma aguda, 3 a 6 dias após o nascimento os pacientes apresentam recusa alimentar e vômitos, tornando-se desidratados, desatentos e letárgicos. Podem também se apresentar hipotérmicos, com tremores e convulsões (Cohn *et al.*, 1978; Elsas e Naglak, 1988). Um odor de pés suados devido à elevação da concentração de IVA é característico. Também ocorre acidose metabólica com moderada cetonúria, acidemia láctica, hiperamonemia, trombocitopenia, neutropenia ou pancitopenia e hipocalcemia (Fischer *et al.*, 1981; Hou e Wang, 1990; Mendiola *et al.*, 1984; Wilson *et al.*, 1984). Os pacientes podem tornar-se cianóticos e entram em coma seguido de morte. Mais da metade dos pacientes inicialmente relatados com a forma aguda não sobrevivem, mas com o diagnóstico precoce e com a terapia baseada em restrição dietética protéica de leucina, suplementada pela administração de glicina e carnitina, a evolução dos pacientes tem sido muito mais favorável (Cohn *et al.*, 1978; Naglak *et al.*, 1988).

Na forma crônica, o quadro clínico é menos grave, sendo que o primeiro episódio da doença geralmente ocorre durante o primeiro ano de vida. Os episódios subsequentes frequentemente ocorrem após infecções respiratórias ou aumento da ingestão de alimentos ricos em proteínas, e tipicamente envolvem vômitos, letargia progredindo para o coma, acidose com cetonúria e o característico odor de pés suados (Shih *et al.*, 1984; Sweetman e Williams, 2001). Nestas situações enfatize-se a necessidade de restrição de proteínas e infusão de glicose. Achados adicionais que podem ocorrer com os episódios incluem diarréia, trombocitopenia, neutropenia, pancitopenia, e em alguns casos alopecia e hiperglicemia; o último pode ser erroneamente confundido com cetoacidose diabética (Attia *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1981). Hiperglicemia pode ocorrer em várias acidemias orgânicas, incluindo a

IVAcidemia. Alguns pacientes com a forma crônica intermitente da IVAcidemia têm desenvolvimento psicomotor normal, mas alguns têm o desenvolvimento atrasado e lento ou mesmo retardo mental severo (Budd *et al.*, 1967; Duran *et al.*, 1982; Shih *et al.*, 1984). Muitos pacientes adquirem uma aversão natural para alimentos ricos em proteínas (Gerdes *et al.*, 1988).

A terceira variante menos comum é a forma intermediária causada por pequenas alterações na função da enzima IVD levando a um acúmulo dos metabólitos em concentrações menores do que nas outras duas formas. Além disso, os pacientes acometidos por essa forma de IVAcidemia são assintomáticos (Mohsen *et al.*, 1998; Nasser *et al.*, 2004), e a necessidade de terapia para esses pacientes ainda não está definida (Vockley e Ensenauer, 2006).

Dentre as anormalidades neuropatológicas apresentadas pelos pacientes acometidos pela IVAcidemia são encontradas alterações no globo pálido e trato corticoespinhal do mesencéfalo, bem como edema cerebral difuso, hemorragia cerebelar massiva, herniação transtentorial e degeneração focal de “clusters” de células gliais nas substâncias branca e cinza (Fischer *et al.*, 1981; Sogut *et al.*, 2004).

#### **I.1.4.1.2. Diagnóstico**

O diagnóstico da IVAcidemia requer análise de ácidos orgânicos, visto que os aspectos clínicos são comuns para várias acidemias orgânicas. Um odor de pés suados durante os episódios agudos pode ser sugestivo de IVAcidemia, mas deve ser distinguido de um odor similar que pode ocorrer na acidúria glutárica tipo 2 devido ao acúmulo dos ácidos isobutírico, 2-metilbutírico e isovalérico. A possibilidade da IVAcidemia deve ser considerada em recém-nascidos ou em crianças que apresentem uma combinação de recusa alimentar, vômitos, letargia, coma, acidose metabólica,

cetose, hiperamonemia, hipocalcemia, neutropenia, trombocitopenia, e pancitopenia. A análise de ácidos orgânicos voláteis de cadeia curta no plasma mostra elevação do IVA sem elevação dos outros ácidos de cadeia curta, sugerindo o diagnóstico de IVAcidemia. No entanto, análises acuradas dos ácidos orgânicos de cadeia curta no plasma são difíceis e com frequência não estão disponíveis. Assim, prefere-se a análise geral de ácidos orgânicos na urina que mostram elevações da IVG e do 3-OHIVA (Tanaka *et al.*, 1980). Além disso, também se encontram grandes elevações não específicas de lactato, bem como dos ácidos 3-hidroxi-butírico e acetoacético. Durante a remissão, o único metabólito com concentrações muito elevadas é a IVG (1000 a 3000 mmol/mol de creatinina).

A análise dos ésteres de carnitina no sangue e urina é complementar à análise de ácidos orgânicos para o diagnóstico da IVAcidemia. As acil-CoAs estão em equilíbrio com as suas acilcarnitinas, sendo as últimas presentes no plasma e prontamente excretadas na urina. A isovalerilcarnitina, portanto, em pequenas concentrações (10 a 20 mmol/mol de creatinina) tem sido identificada por MS em Tandem na urina de pacientes com IVAcidemia mesmo durante a remissão. A administração oral de 100mg/kg de L-carnitina aumenta a excreção de isovalerilcarnitina até aproximadamente 3200 mmol/mol de creatinina, sugerindo que a administração de carnitina aumentaria a confiabilidade do diagnóstico da acidemia isovalérica por detecção de acilcarnitinas na urina.

O diagnóstico da IVAcidemia pode ser confirmado pela deficiência severa da atividade da IVD em fibroblastos através do ensaio da liberação de trítio a partir de [2,3-<sup>3</sup>H]isovaleril-CoA na presença do inibidor da IVD (Hyman e Tanaka, 1986).

O diagnóstico pré-natal da IVAcidemia pode ser feito pela medida da atividade da IVD em cultura de amniócitos ou pela detecção de concentrações elevadas de IVA e

IVG no líquido amniótico após aminocentese (Hine *et al.*, 1986). A IVG é quase indetectável nos líquidos amnióticos normais, porém em mulheres com fetos afetados com IVAcidemia, este composto aparece muito elevado (3,50 a 6,02  $\mu\text{M}$ ). Portanto a quantificação deste composto no líquido amniótico permite um diagnóstico rápido e preciso de IVAcidemia.

#### **I.1.4.1.3. Tratamento**

O tratamento de pacientes afetados pela IVAcidemia durante os episódios agudos é praticamente o mesmo dos afetados por outras acidemias orgânicas e consta fundamentalmente de hidratação, infusão de glicose para prover calorias e reduzir o catabolismo protéico endógeno e infusão de bicarbonato de sódio para controlar a acidose (Tanaka, 1986; Tanaka e Rosenberg, 1983). O tratamento crônico durante a recuperação e remissão geralmente consiste na restrição dietética de proteína (1,5 g de proteína/Kg por dia) e de leucina. Este tratamento tem sido efetivo na diminuição da frequência dos episódios de descompensação metabólica.

Por outro lado, a concentração de glicina no plasma de pacientes com IVAcidemia tende a diminuir durante episódios agudos, sugerindo que a glicina foi utilizada para a síntese da IVG (Krieger e Tanaka, 1976). Assim, o aumento da concentração de glicina plasmática através da ingestão de glicina (250 mg/Kg por dia de glicina dividida em 3 doses) é aconselhável no tratamento desses pacientes a longo prazo, o que provocaria um aumento da razão IVG/IVA por aumento da concentração de IVG. Por outro lado, verificou-se que a suplementação de glicina com sobrecarga de leucina para um paciente com IVAcidemia preveniu o aumento do IVA no plasma e aumentou a excreção de IVG (Krieger e Tanaka, 1976).

Além disso, vários pacientes com IVAcidemia apresentam deficiência de carnitina total e uma alta percentagem de carnitina esterificada no plasma e na urina (de Sousa *et al.*, 1986; Mayatepek *et al.*, 1991; Roe *et al.*, 1984). Assim, é aconselhável tratá-los rotineiramente com L-carnitina (100 mg/Kg por dia dividida em duas doses) (Lee *et al.*, 1998).

#### **I.1.4.1.3. Fisiopatologia**

Pouco se sabe sobre a fisiopatogenia do dano cerebral que ocorre nos pacientes afetados pela IVAcidemia. Apesar do grande número de metabólitos excretados já identificados, sua ocorrência não explica os sintomas clínicos dos pacientes, e é possível que esses metabólitos sejam tóxicos e responsáveis por pelo menos parte dos sintomas apresentados pelos pacientes. Considerando que as alterações neurológicas são pronunciadas na IVAcidemia, os mecanismos do dano cerebral nessa doença são pouco conhecidos.

Assim, a investigação do papel dos metabólitos acumulados na IVAcidemia no funcionamento e desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) poderá levar a um melhor entendimento da relação entre as condições clínicas e a fisiopatologia dessa doença. Nesse contexto, resultados recentes demonstraram que a IVG induz estresse oxidativo em maior grau em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens, enquanto o IVA provoca dano oxidativo protéico (Solano *et al.*, 2008). Além disso, foi demonstrado que o 3-OHIVA, que se acumula na IVAcidemia, bem como nas acidemias 3-metilglutacônica e 3-hidroxi-3-metilglutárica, induz a produção de espécies reativas de oxigênio (Leipnitz *et al.*, 2008a; Leipnitz *et al.*, 2009).

Considerando que os metabólitos acumulados na IVAcidemia são produzidos dentro da mitocôndria, e que alterações no metabolismo energético foram descritas em

diversas desordens neurodegenerativas (Parker *et al.*, 1990; Parker *et al.*, 1994; Swerdlow *et al.*, 1997; Swerdlow *et al.*, 1996), é possível que esses metabólitos acumulados alterem a produção ou a utilização de energia no tecido nervoso, causando assim as alterações neurológicas apresentadas pelos pacientes afetados pela IVAcidemia.

#### **I.1.4.2. Acidemia 3-metilglutacônica**

A acidemia 3-metilglutacônica (MGTA) corresponde a um grupo heterogêneo de doenças metabólicas caracterizado pelo acúmulo dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) e 3-metilglutárico (MGA). Atualmente, são conhecidos cinco tipos distintos de MGTA.

##### **I.1.4.2.1. Acidemia 3-metilglutacônica (MGTA) tipo I**

A MGTA tipo I (OMIM # 250950) ou deficiência da enzima 3-metilglutaconil-CoA hidratase (EC 4.2.4.18) é um erro inato do metabolismo da leucina, cujos sintomas variam de mínimos a severos. O bloqueio enzimático leva ao acúmulo e elevada excreção urinária do MGT, atingindo concentrações em torno de 500 – 1000 mmol/mol de creatinina (Gunay-Aygun, 2005). O MGA, derivado da hidrogenação do 3-metilglutaconil-CoA, bem como o 3-OHIVA, que é derivado do 3-metilcrotonil-CoA, também se encontram elevados nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes afetados por essa doença (Sweetman e Williams, 2001).

##### **I.1.4.2.1.1. Manifestações clínicas**

Os sinais clínicos dessa desordem são variados e inespecíficos, incluindo retardo no desenvolvimento psicomotor e neurológico, retardo na linguagem, microcefalia leve, hepatomegalia e distonia, bem como hipoglicemia e acidose metabólica (Arn e

Funanage, 2006; IJlst *et al.*, 2002; Shoji *et al.*, 1999; Sweetman e Williams, 2001). Dentre os achados neuropatológicos, observa-se atrofia dos gânglios basais, com lesões principalmente no globo pálido e núcleo caudato (Arbelaez *et al.*, 1999). Os tecidos predominantemente afetados são os com maior dependência do metabolismo oxidativo, como o SNC, fígado e os músculos esquelético e cardíaco (Gunay-Aygun, 2005).

#### **I.1.4.2.1.2. Diagnóstico**

O diagnóstico da MGTA tipo I é realizado a partir da análise quantitativa dos ácidos orgânicos na urina, com acúmulo predominante do MGT e também de MGA e 3-OHIVA. O diagnóstico deve ser confirmado medindo-se a atividade da enzima metilglutaconil-CoA hidratase em leucócitos ou fibroblastos. O diagnóstico pré-natal é possível através do acúmulo do 3-OHIVA e do MGT no líquido amniótico (Sweetman e Williams, 2001).

#### **I.1.4.1.3. Tratamento**

O tratamento é realizado com a restrição dietética da leucina e diminuição da ingesta protéica. Além disso, um estudo evidenciou que a adição de L-carnitina melhorou o estado nutricional e a hepatomegalia nos pacientes afetados pela doença (Jooste *et al.*, 1994).

#### **I.1.4.2.2. Acidemia 3-metilglutacônica (MGTA) tipo II**

A MGTA tipo II (OMIM # 302060) ou síndrome de Barth é uma desordem ligada ao cromossomo X caracterizada pelo acúmulo de MGT e MGA e por atividade normal da enzima metilglutaconil-CoA hidratase. É uma doença possivelmente



relacionada a um defeito no metabolismo da cardiolipina devido a mutações no gene *TAZ* (tafazina) (Bione *et al.*, 1996). O quadro clínico é caracterizado por cardiomiopatia, neutropenia e miopatia esquelética (Arn e Funanage, 2006; Barth *et al.*, 1983; Barth *et al.*, 2004). A disfunção cardíaca é atribuída à dilatação biventricular e hipertrofia. Também há deposição de lipídios nos músculos esquelético e cardíaco com diminuição nos níveis de carnitina e anormalidades mitocondriais (Sweetman e Williams, 2001). Além disso, estudos prévios demonstraram diminuição nas atividades dos complexos I, III, IV e V da cadeia de transporte de elétrons (CTE) em músculo esquelético dos pacientes afetados (Barth *et al.*, 1983; Besley *et al.*, 1995; Christodoulou *et al.*, 1994; De Kremer *et al.*, 2001; Ibel *et al.*, 1993).

#### **I.1.4.2.3. Acidemia 3-metilglutacônica (MGTA) tipo III**

A MGTA tipo III (OMIM # 258501) ou síndrome da atrofia óptica de Costeff foi detectada inicialmente em indivíduos do Iraque e Israel, é relacionada a mutações no gene *OPA3*, sendo caracterizada por dano neurológico (Anikster *et al.*, 2001; Arn e Funanage, 2006). Similarmente à MGTA tipo II, apenas o MGT e o MGA se encontram acumulados nos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes e a atividade da enzima 3-metilglutaconil-CoA hidratase é normal.

O quadro clínico da MGTA tipo III é caracterizado por atrofia óptica bilateral infantil, coreoatetose, retardo mental, ataxia cerebelar, defeitos cognitivos e outros sintomas neurológicos (Anikster *et al.*, 2001; Arn e Funanage, 2006; Gunay-Aygun, 2005; Sweetman e Williams, 2001).

#### **I.1.4.2.4. Acidemia 3-metilglutacônica (MGTA) tipo IV**

Na MGTA tipo IV ou não-classificada (OMIM # 250951), há heterogeneidade de sintomas, incluindo retardo mental e psicomotor, espasticidade, hipertonia,

hipotonia, convulsões, atrofia óptica, surdez, cardiomiopatia e disfunção hepática. Os pacientes apresentam elevação nas concentrações de ácido láctico e intermediários do ciclo de Krebs, bem como defeitos na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (Besley *et al.*, 1995; Ibel *et al.*, 1993; Ruesch *et al.*, 1996), tais como diminuição das atividades dos complexos I, II, III, IV e V (Gibson *et al.*, 1993; Gunay-Aygun, 2005; Sperl *et al.*, 2006; Sweetman e Williams, 2001; Wortmann *et al.*, 2006). O MGT e o MGA se encontram predominantemente acumulados na MGTA tipo IV. Por outro lado, a deficiência enzimática que leva a essa condição não é conhecida.

#### **I.1.4.2.5. Acidemia 3-metilglutacônica (MGTA) tipo V**

A MGTA tipo V (OMIM # 610198) é uma doença autossômica recessiva recentemente descrita por (Davey *et al.*, 2006). Essa forma da MGTA foi identificada em populações das planícies do Canadá e do nordeste dos Estados Unidos da América, sendo caracterizada por cardiomiopatia dilatada, ataxia cerebelar não-progressiva, disgenesia testicular e retardo no crescimento. Em comparação com as outras formas da MGTA, as concentrações de MGT e MGA encontram-se menos aumentadas. Foi sugerido que a mutação responsável por essa desordem ocorre no gene *DNAJC19*, causando defeitos na importação de proteínas mitocondriais (Davey *et al.*, 2006; Wortmann *et al.*, 2009).

#### **I.1.4.2.6. Fisiopatologia**

As características clínicas dos diversos tipos de MGTA são diversas, mas tecidos com alta demanda por metabolismo oxidativo, como SNC e músculos esquelético e cardíaco, são predominantemente afetados. Considerando que os sintomas neurológicos são comuns na MGTA, os mecanismos envolvidos no dano cerebral nessa doença ainda

não estão completamente estabelecidos. Nesse contexto, é possível que o acúmulo de MGT e MGA seja importante mecanismo responsável pela fisiopatologia da MGTA.

Além disso, já foram observadas disfunções mitocondriais em indivíduos portadores das formas II-V da MGTA. Na MGTA tipo II ou síndrome de Barth causada por mutações no gene *TAZ*, observam-se anormalidades mitocondriais e disfunção na CTE (Barth *et al.*, 1983; Besley *et al.*, 1995; Christodoulou *et al.*, 1994; De Kremer *et al.*, 2001; Ibel *et al.*, 1993). Já a MGTA tipo III ou síndrome de Costeff ocorre devido a mutações no gene *OPA3*. Um estudo publicado recentemente descreve um modelo de camundongos *knockout* para o gene da proteína OPA3, onde os animais homozigotos apresentam características fenotípicas similares às da MGTA tipo III, com perda de células ganglionais da retina e desmielinização dos axônios do nervo óptico causando atrofia óptica, além de disfunção extrapiramidal, espasticidade e ataxia (Davies *et al.*, 2008). Os pacientes acometidos pela MGTA tipo IV ou não-classificada apresentam, na maioria dos casos, disfunção na fosforilação oxidativa, que leva à diminuição na produção de ATP. Foi recentemente demonstrado que pacientes portadores da MGTA tipo IV apresentam defeito na atividade de pelo menos um dos complexos da CTE de elétrons em biópsia muscular e/ou cultura de fibroblastos (Wortmann *et al.*, 2009). Assim, a depleção de energia poderia estar envolvida nos danos característicos da MGTA tipo IV. Com relação à MGTA tipo V, foi identificada nos pacientes portadores uma mutação no gene *DNAJC19* (Davey *et al.*, 2006), que codifica uma proteína com similaridade à proteína TIM14, participante do sistema de importação de proteínas mitocondriais em leveduras. Dessa forma, é possível que o defeito nesse gene altere o transporte de proteínas mitocondriais e possa ser responsável pela patogênese da MGTA tipo V.

### **I.1.4.3. Acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica**

A acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica (HMGA, OMIM # 246450), causada pela deficiência da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase (HL; EC 4.1.3.4), é uma acidemia orgânica de herança autossômica recessiva inicialmente descrita por Faull e colaboradores (Faull *et al.*, 1976a; Faull *et al.*, 1976b). A HL catalisa a clivagem de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) a acetoacetato e acetil-CoA, sendo é a última reação da síntese de corpos cetônicos e do catabolismo da leucina (Figura 1). Há 90-100 casos de HMGA descritos, sendo que, com exceção da Arábia Saudita e Península Ibérica (Portugal e Espanha), onde a doença é muito prevalente, a HMGA é rara em outros países (Menaio *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2007). No Brasil foram descritos 15 pacientes portadores da HMGA (Vargas *et al.*, 2007).

Duas isoformas da HL são encontradas, uma localizada na mitocôndria e a outra nos peroxissomos. A HL mitocondrial madura é um homodímero. O gene da enzima está localizado no cromossomo 1 (1p35.1-36.1), sendo composto por 9 éxons e 8 íntrons. A isoforma mitocondrial é composta por 298 resíduos de aminoácidos e contém uma sequência peptídica de 27 resíduos de aminoácidos na extremidade N-terminal, que sinaliza a entrada da enzima na mitocôndria. Dentro da mitocôndria, o peptídeo é removido, formando a enzima madura com 298 resíduos de aminoácidos. Por outro lado, a isoforma peroxissomal possui 325 resíduos de aminoácidos. Existe uma grande diversidade e heterogeneidade de mutações na deficiência da HL, porém, o padrão de mutações é homogêneo dentro de comunidades específicas. Neste particular, as mutações c.122G>A e c.109G>A são prevalentes na Arábia Saudita e Península Ibérica, respectivamente. Por outro lado, não há correlação entre o genótipo, a atividade enzimática e o prognóstico dos pacientes (Al-Sayed *et al.*, 2006; Pie *et al.*, 2007; Sweetman e Williams, 2001).

O principal metabólito acumulado na HMGA é o ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMG) derivado da hidrólise do HMG-CoA. Na urina de pacientes controlados com dieta, as concentrações de HMG variam entre 200-4000 mmol/mol de creatinina (valores normais nos primeiros meses de vida: 50-90 mmol/mol de creatinina). Contudo, durante crises de descompensação metabólica, esse metabólito pode alcançar níveis de 1500-19000 mmol/mol de creatinina. O MGT também se encontra acumulado nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes com HMGA devido à reversibilidade da reação catalisada pela enzima 3-metilglutaconil-CoA hidratase. Além disso, o MGT pode ser hidrogenado a MGA, que também se encontra com concentrações elevadas na doença. Também devido à reversibilidade da enzima 3-metilcrotonil-CoA carboxilase, altas concentrações de 3-metilcrotonil-CoA são encontradas e este metabólito pode ainda ser hidratado, gerando 3-OHIVA. Além disso, durante as crises de descompensação metabólica também são detectadas altas concentrações dos ácidos glutárico e adípico. Outros metabólitos importantes encontrados acumulados na urina e no sangue dos pacientes são as acilcarnitinas derivadas dos ácidos acumulados (Bonafe *et al.*, 2000; Sweetman e Williams, 2001).

#### **I.1.4.3.1. Manifestações clínicas**

As manifestações clínicas da HMGA se apresentam usualmente no período neonatal (Sweetman e Williams, 2001). Durante episódios agudos de descompensação metabólica (jejum prolongado ou outras situações catabólicas) os pacientes apresentam vômitos, diarreia, desidratação, hipotonia, hipotermia, letargia e apnéia que pode progredir ao coma (Funghini *et al.*, 2001; Pospisilova *et al.*, 2003; Sweetman e Williams, 2001). Outros sintomas incluem hepatomegalia com hiperamonemia, macrocefalia, microcefalia, pancreatite aguda, retardo no desenvolvimento e

cardiomiopatia. Enfatize-se que a deficiência da HL é fatal em aproximadamente 20 % dos casos. Os pacientes também apresentam acidose metabólica com hipoglicemia hipocetótica e elevação de transaminases no plasma. Os achados de ressonância magnética evidenciam lesões na substância branca cerebral que, em alguns casos, podem ser reversíveis com o tratamento baseado na restrição alimentar de leucina (Yalcinkaya *et al.*, 1999; Yilmaz *et al.*, 2006; Zafeiriou *et al.*, 2007). Além disso, os pacientes com a doença apresentam alterações dos núcleos caudato, dentado e globo pálido, bem como do trato corticoespinhal (Yalcinkaya *et al.*, 1999; Yilmaz *et al.*, 2006).

#### **I.1.4.3.2. Diagnóstico**

A deficiência da HL deve ser investigada principalmente em pacientes que apresentam hipoglicemia hipocetótica e acidose metabólica. Geralmente a HMGA é diagnosticada através do aumento dos metabólitos acumulados HMG, MGT, MGA e 3-OHIVA nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes (especialmente na urina) medidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. A determinação da atividade da HL também é importante para a confirmação do diagnóstico, podendo ser medida espectrofotometricamente em leucócitos, fibroblastos e plaquetas. O diagnóstico molecular também é útil para a confirmação do diagnóstico e é um instrumento importante para o diagnóstico pré-natal em gestações futuras (Sweetman e Williams, 2001).

#### **I.1.4.3.3. Tratamento**

A HMGA possui tratamento efetivo. Os pacientes devem evitar situações de jejum e ingesta excessiva de gordura. Além disso, a administração de glicose deve ser feita em vigência de episódios de hipoglicemia que ocorre geralmente durante as crises. A restrição de leucina em 87 mg/Kg/dia, além de diminuição da ingesta de gorduras e a administração de L-carnitina (100 mg/Kg dia) previne os sintomas dos pacientes com HMGA (Dasouki *et al.*, 1987).

#### **I.1.4.3.4. Fisiopatologia**

A patogênese na HMGA é desconhecida. Acredita-se que a hipoglicemia que ocorre principalmente durante as crises de descompensação metabólica possa contribuir para a patogênese do dano cerebral nos afetados pela HMGA. A produção insuficiente de glicose devido à inibição da gliconeogênese por HMG-CoA e o elevado consumo de glicose pela falta de corpos cetônicos circulantes podem estar implicados nas alterações neurológicas características da doença. Assim, a hipoglicemia associada à diminuição na síntese de corpos cetônicos faz com que o cérebro fique sem a quantidade necessária de substratos energéticos. Assim, uma das possíveis consequências da falta de energia no cérebro é a hipomielinização com lesões na substância branca, além de outros danos neurológicos encontrados em pacientes afetados pela HMGA. Além disso, a hipoglicemia pode inibir a CTE, causando depleção de ATP, bem como induzir a geração de espécies reativas através da ativação de receptores glutamatérgicos por aumento no influxo de cálcio (Singh *et al.*, 2004; Suh *et al.*, 2007).

Por outro lado, é possível que os metabólitos acumulados em tecidos e líquidos biológicos dos pacientes afetados por essas doenças sejam tóxicos e responsáveis por pelo menos parte dos sintomas apresentados, embora os mecanismos pelos quais esses

ácidos orgânicos possam levar aos sintomas característicos dessas desordens ainda não foram desvendados. É possível, então, que a hipoglicemia e a hipocetonemia atuem sinergicamente com os ácidos orgânicos potencialmente neurotóxicos que se acumulam nesta doença, levando ao dano cerebral.

### **I.1.5. Metabolismo Energético no Cérebro de Mamíferos**

O cérebro possui uma intensa atividade metabólica, porém suas reservas energéticas são extremamente pequenas em relação à sua demanda. Assim, há necessidade contínua de substratos energéticos para o cérebro de mamíferos, sendo a glicose o principal deles, onde, em contraste com outros tecidos, não necessita de insulina para ser captada e oxidada (Dickinson, 1996). O padrão de utilização de glicose varia conforme a etapa de desenvolvimento do SNC, o estado nutricional do indivíduo e o destino de sua cadeia de átomos de carbono (Erecinska *et al.*, 2004; Lieberman e Marks, 2008). Situações de jejum prolongado fazem com que o SNC passe a utilizar corpos cetônicos para a obtenção de energia, a fim de poupar o organismo de um catabolismo protéico exacerbado resultante da necessidade da manutenção da glicemia via gliconeogênese (Lieberman e Marks, 2008). A glicose captada pelo cérebro é, também, fonte de carbono para a síntese de diversas outras biomoléculas essenciais (por exemplo, neurotransmissores), o que reforça a idéia de que a utilização de glicose não está atrelada somente à produção de energia.

Mitocôndrias de mamíferos são organelas intracelulares ubíquas, responsáveis pela produção de ATP pelo metabolismo aeróbico, mas também desempenham outras funções intracelulares além da produção de ATP, tendo um papel crítico no processo de apoptose e servindo como um tampão de cálcio. Tecidos com alta atividade oxidativa,



tais como cérebro, músculos esquelético e cardíaco, apresentam altas concentrações de mitocôndrias (Orth e Schapira, 2001).

O ciclo do ácido cítrico que ocorre nas mitocôndrias é a via comum de oxidação dos glicídios, aminoácidos e ácidos graxos. O metabolismo energético cerebral se mostra essencialmente oxidativo, sendo a glicose o principal substrato utilizado (Clark *et al.*, 1993), entrando no ciclo sob a forma de acetil-CoA, que é então oxidada completamente a CO<sub>2</sub>. Quando não há hipóxia, a fosforilação oxidativa é dependente da concentração de ATP, ADP e fosfato inorgânico (Pi) e da razão mitocondrial de NADH/NAD<sup>+</sup> que é determinada pela atividade da CTE e pela transferência de elétrons provenientes de reações catalisadas por enzimas mitocondriais. A cadeia transportadora de elétrons oxida o NADH e o FADH<sub>2</sub> e bombeia prótons para o espaço intermembrana da mitocôndria, formando assim um gradiente de prótons que através da passagem pela ATP-sintase, produz ATP na fosforilação oxidativa (Erecinska e Silver, 1994).

#### **I.1.5.1. Fosforilação Oxidativa**

A fosforilação oxidativa é o processo principal da produção de energia celular. Todos os passos oxidativos na degradação de carboidratos, gorduras e aminoácidos convergem a esse estágio final da respiração celular, em que a energia da oxidação, provida pelo fluxo de elétrons através das enzimas da CTE, promove a síntese de ATP (Nelson e Cox, 2008). A CTE, composta por quatro complexos enzimáticos (complexos I-IV) além da ATPase (complexo V), recebe elétrons das coenzimas NADH e FADH<sub>2</sub>, e os transfere através de uma série de reações de oxidação-redução até o oxigênio molecular e simultaneamente acopla essa reação exergônica à translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna (Wallace, 1999). O fluxo de prótons (gradiente eletroquímico de prótons) gerado durante o transporte de elétrons na CTE

leva à formação de ATP a partir de ADP e Pi pelo complexo V (ATP sintase) (Babcock e Wikstrom, 1992; Wallace, 1999).

Os complexos da CTE são formados por várias cadeias polipeptídicas associadas a grupos transportadores de elétrons: NADH desidrogenase (complexo I), succinato: ubiquinona oxirredutase (complexo II), complexo citocromo b-c<sub>1</sub> (complexo III) e citocromo c oxidase (complexo IV), além de elementos móveis que se localizam entre os complexos. São eles a coenzima Q (CoQ), um componente não protéico lipossolúvel que carrega elétrons entre os complexos I e III, e o citocromo c, uma proteína localizada na face externa da membrana que transfere os elétrons do complexo III para o complexo IV (Lieberman e Marks, 2008).

#### **I.1.5.2. Creatina Quinase**

A creatina quinase (CK) consiste de um grupo de isoenzimas com um papel central no metabolismo energético, principalmente para tecidos com alta demanda energética, como cérebro, músculo cardíaco e esquelético, onde funciona como um efetivo sistema de tampão e transferência intracelular de energia. A CK catalisa a transfosforilação reversível entre ATP e creatina a ADP e fosfocreatina [ $\text{MgATP}^- + \text{creatina} \leftrightarrow (\text{fosfocreatina})^- + \text{MgADP}^- + \text{H}^+$ ], ajudando a manter os níveis dos substratos fosforilados. Sabe-se que durante a excitação nervosa e neuromuscular ocorre um aumento de dez vezes no *turnover* celular de ATP, e que durante essas mudanças rápidas, o sistema creatina/fosfocreatina é necessário tanto como um tampão energético quanto como um sistema de transporte entre os locais de produção e consumo de ATP pelas ATPases para evitar grandes flutuações nos níveis de ATP/ADP celulares nesses tecidos excitáveis (Bessman e Carpenter, 1985; Schnyder *et al.*, 1991; Wallimann *et al.*, 1992).

As isoformas da CK estão localizadas em sítios de demanda e produção energética. A isoforma citosólica (Ci-CK) consiste de dímeros e é expressa de uma maneira tecido-específica, isto é, cérebro-específica (BB-CK), músculo esquelético-específica (MM-CK) e um heterodímero músculo cardíaco-específico (MB-CK) (O'Gorman *et al.*, 1996; Schnyder *et al.*, 1991; Wallimann *et al.*, 1992). As formas mitocondriais da CK (Mi-CK) são dispostas em octâmeros e são compostas da isoforma sarcomérica músculo-específica Mib-CK e da forma ubíqua Mia-CK, que é encontrada nas mitocôndrias do tecido cerebral (Gross *et al.*, 1996; Saks *et al.*, 1985; Schlegel *et al.*, 1988; Wallimann *et al.*, 1992).

Devido à sua localização próxima a sítios onde se dá a geração de energia e transporte de íons através de membranas, o sistema CK/fosfocreatina desempenha um papel fundamental na homeostase energética neuromuscular. Assim, é presumível que alterações na função da CK levem ao desenvolvimento de vários estados patológicos envolvendo o cérebro, músculo esquelético e músculo cardíaco (Aksenov *et al.*, 2000; Aksenov *et al.*, 1997; Aksenova *et al.*, 1999; David *et al.*, 1998; Hamman *et al.*, 1995).

### **I.1.5.3. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase**

A Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase é uma enzima transmembrana que catalisa o transporte ativo de sódio e potássio através da membrana celular. Esse transporte é de grande importância já que mais de um terço do ATP consumido é utilizado para bombear tais íons (Aperia, 2007). A Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase está presente em praticamente todas as células, incluindo o cérebro e os músculos esquelético e cardíaco (Aperia, 2007).

A Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase desempenha um papel fundamental no SNC, sendo responsável pela manutenção dos gradientes iônicos e pela propagação do impulso nervoso já que as funções neuronais responsáveis por geração, transmissão e

propagação do impulso nervoso dependem da atividade do neurônio e esta está intimamente ligada aos íons e seus potenciais de ação através da membrana (Kaplan, 2002).

Considerando a importância da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase para o funcionamento normal do organismo e do SNC, e seu papel fundamental na manutenção do gradiente elétrico da membrana celular, a inibição dessa enzima tem sido associada a fisiopatologia de diversas doenças, como a isquemia cerebral (Wyse *et al.*, 2000), epilepsia (Grisar, 1984), distúrbios neurodegenerativos (Yu, 2003), crises convulsivas (Renkawek *et al.*, 1992) e doença de Alzheimer (Hattori *et al.*, 1998).

## I.2. OBJETIVOS

### I.2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi inicialmente verificar os efeitos dos ácidos isovalérico (IVA), 3-hidroxiisovalérico (3-OHIVA), 3-metilglutacônico (MGT), 3-metilglutárico (MGA) e 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMGA), bem como da isovalerilglicina (IVG) sobre parâmetros de metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens na expectativa de melhor entender os mecanismos neurotóxicos desses compostos acumulados nas acidemias isovalérica, 3-metilglutacônica e 3-hidroxi-3-metilglutárica.

### I.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar os efeitos *in vitro* dos ácidos isovalérico (IVA), 3-hidroxiisovalérico (3-OHIVA), bem como da isovalerilglicina (IVG) sobre a produção de CO<sub>2</sub>, bem como sobre as atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons I-IV e das enzimas creatina quinase e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.
- Determinar os efeitos *ex vivo* da administração intracerebroventricular do ácido isovalérico (IVA) sobre a produção de CO<sub>2</sub>, bem como sobre as atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons I-IV e das enzimas creatina quinase e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.
- Determinar os efeitos *in vitro* dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) e 3-metilglutárico (MGA) sobre a produção de CO<sub>2</sub>, bem como sobre as atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons I-IV e das enzimas creatina quinase e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.

- Determinar os efeitos *in vitro* do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMGA) sobre a produção de CO<sub>2</sub>, bem como sobre as atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons I-IV e das enzimas creatina quinase e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.
- Determinar os efeitos *ex vivo* da administração intracerebroventricular do ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMGA) sobre a produção de CO<sub>2</sub>, bem como sobre as atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons I-IV e das enzimas creatina quinase e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.

## ***II- RESULTADOS***

## **Capítulo I.**

**Isovaleric acid reduces Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  
activity in synaptic membranes from cerebral  
cortex of young rats.**

César Augusto João Ribeiro, Fabrício Balestro, Vanessa Grado Moacir Wajner

Artigo científico publicado no periódico

*Cellular and Molecular Neurobiology* 27:529-540, 2007



## Isovaleric Acid Reduces Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activity in Synaptic Membranes from Cerebral Cortex of Young Rats

César A. J. Ribeiro,<sup>1</sup> Fabrício Balestro,<sup>1</sup> Vanessa Grando,<sup>1</sup> and Moacir Wajner<sup>1,2,3,4</sup>

Received October 25, 2006; accepted March 1, 2007; Published online: March 30, 2007

### SUMMARY

1. Patients affected by isovaleric acidemia (IVA) suffer from acute episodes of encephalopathy. However, the mechanisms underlying the neuropathology of this disease are poorly known. The objective of the present study was to investigate the *in vitro* effects of the metabolites that predominantly accumulate in IVA, namely isovaleric acid (IVA), 3-hydroxyisovaleric acid (3-OHIVA) and isovalerylglycine (IVG), on important parameters of energy metabolism, such as <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production from acetate and the activities of the respiratory chain complexes I–IV, creatine kinase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in synaptic plasma membranes from cerebral cortex homogenates of 30-day-old rats.

2. We observed that 3-OHIVA acid and IVG did not affect all the parameters analyzed. Similarly, <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production from acetate (Krebs cycle activity), the activities of creatine kinase, and of the respiratory chain complexes was not modified by IVA. In contrast, IVA exposition to cortical homogenates provoked a marked inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. However, this activity was not changed when IVA was directly exposed to purified synaptic plasma membranes, suggesting an indirect effect of this organic acid on the enzyme. Furthermore, pretreatment of cortical homogenates with α-tocopherol and creatine totally prevented IVA-induced inhibition on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity from synaptic plasma membranes, whereas glutathione (GSH) and the NO synthase inhibitor N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) did not alter this inhibition.

3. These data indicate that peroxide radicals were probably involved in this inhibitory effect. Since Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase is a critical enzyme for normal brain development and functioning and necessary to maintain neuronal excitability, it is presumed that the inhibitory effect of IVA on this activity may be involved in the pathophysiology of the neurological dysfunction of isovaleric acidemic patients.

**KEY WORDS:** Na<sup>+</sup>; K<sup>+</sup>-ATPase; energy metabolism; isovaleric acid; isovaleric acidemia; respiratory chain; citric acid cycle; cerebral cortex.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil.

<sup>4</sup>To whom correspondence should be addressed at Prof. Moacir Wajner, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; e-mail: mwajner@ufrgs.br.

## INTRODUCTION

Isovaleric acidemia (IVAcidemia, MIM 243500) is an autosomal recessive inherited metabolic disorder of leucine metabolism caused by a deficiency of isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVD; E.C. 1.3.99.10), a homotetrameric mitochondrial flavoenzyme of the family of acyl-CoA dehydrogenases (Tanaka *et al.*, 1966). IVAcidemia is considered a severe, potentially life-threatening disorder that manifests with acute neonatal encephalopathy with recurrent episodes of vomiting, lethargy, and coma in about half of the affected individuals with poor feeding; tachypnea, dehydration, and varying degrees of developmental delay in the other half of the patients (Sweetman and Williams, 2001). IVD deficiency leads to accumulation of the isovaleryryl-CoA derivatives, i.e., isovaleric acid (IVA), 3-hydroxyisovaleric acid (3-OHIVA) and isovalerylglycine (IVG), which are highly excreted in the urine and detected by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) or in plasma and blood spots identified by MS/MS (IVG and isovalerylcarnitine). The diagnosis of IVA is based on clinical symptoms and the presence of high amounts of predominantly IVG and 3-OHIVA, with some other metabolites appearing at lower amounts in urine (Tanaka and Isselbacher, 1967; Tanaka *et al.*, 1980). The incidence of IVAcidemia varies from 1/62,500 live births in Germany (Schulze *et al.*, 2003) to 1/250,000 in the United States (Zytkovicz *et al.*, 2001; Chase *et al.*, 2003).

Despite the large number of already identified excreted metabolites, their occurrence does not explain the clinical symptoms of the affected patients, so that the investigation on the role of these metabolites on the functioning and development of the central nervous system will eventually lead to a better understanding of the relationship between the clinical conditions and their biological abnormalities, as well as the pathophysiology of this disorder.

Since the major metabolites accumulating in IVAcidemia are produced inside the mitochondria, it seems appropriate to evaluate the role of these compounds on cellular energy metabolism, which basically occurs in this organelle. Thus, the present study was undertaken to investigate the *in vitro* influence of IVA, 3-OHIVA and IVG on important parameters of energy metabolism, such as  $^{14}\text{CO}_2$  production from [1- $^{14}\text{C}$ ] acetate and the activities of the respiratory chain complexes I–IV, creatine kinase and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in cerebral cortex homogenates of young rats in order to clarify the mechanisms involved in the neuropathology of IVAcidemia. The effect of antioxidants on the inhibition caused by IVA on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity was also investigated.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, except for [1- $^{14}\text{C}$ ] acetate, which was purchased from Amersham International plc, UK.

### Animals

A total of 140 thirty-day-old Wistar rats obtained from the Central Animal House of the Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, were used. Rats were kept with dams until weaning at 21 days of age. The animals had free access to water and to a standard commercial chow and were maintained on a 12:12 h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) colony room. The "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication 85-23, revised 1985) were followed in all experiments. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

### Cerebral Cortex Preparation

Thirty-day-old rats were sacrificed by decapitation, the brain was rapidly removed and the cerebral cortex was homogenized in the specific buffer used for each technique. For  $^{14}\text{CO}_2$  production, the cerebral cortex was homogenized (1:10, w/v) in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4. For determination of the activities of the respiratory chain complexes II, I-III and IV, the cortex was homogenized (1:20, w/v) in SETH buffer, pH 7.4 (250 mM sucrose, 2.0 mM EDTA, 10 mM Trizma base and 50 UI mL<sup>-1</sup> heparin). The homogenates were centrifuged at  $800 \times g$  for 10 min, and the supernatants were kept at  $-70^\circ\text{C}$  until being used for enzyme activity determination. For total creatine kinase activity determination, the cerebral cortex was homogenized (1:1000 w/v) in isosmotic saline solution. The mitochondrial fractions prepared according to Cassina and Radi (1996) were used for the determination of the activities of complexes I of the respiratory chain. The period between tissue preparation and measurement of these parameters was always less than 5 days.

The biochemical parameters were determined in the presence of various concentrations of IVA (0.01–5.0 mM), 3-OHIVA (0.01–1.0 mM) or IVG (0.01–1.0 mM), whereas the control group did not contain any of these metabolites in the incubation medium. The solutions of the organic acids and of IVG were prepared on the day of the experiments and had their pH adjusted to 7.4. Some experiments were performed in the presence of 1 mM Trolox ( $\alpha$ -tocopherol), glutathione (GSH), creatine or the nitric oxide synthase inhibitor N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME).

### Preparation of Synaptic Plasma Membrane from Rat Cerebral Cortex

Cerebral cortex was homogenized in 10 volumes of 0.32 mM sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 1.0 mM EDTA. Cortical homogenates were preincubated at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h in the presence of 1.0–5.0 mM IVA, 1.0 mM 3-OHIVA or 1.0 mM IVG and the synaptic plasma membranes were prepared afterwards according to the method of Jones and Matus (1974) using a discontinuous sucrose density gradient consisting of successive layers of 0.3, 0.8 and 1.0 M. After centrifugation at  $69,000 \times g$  for 2 h, the fraction at the 0.8–1.0 M sucrose interface was taken as the membrane enzyme preparation. In other experiments, synaptic membranes were first purified from cortical homogenates and then incubated with the same doses of these metabolites.

### **$^{14}\text{CO}_2$ Production**

$^{14}\text{CO}_2$  production was measured according to Dutra *et al.* (1995). Briefly, homogenates prepared in Krebs–Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4, were added to small flasks (11 cm<sup>3</sup>) in a volume of 0.45 mL. The flasks were preincubated at 35°C for 15 min in the presence of 3-OHIVA (0.1–1.0 mM), IVG (0.1–1.0 mM) or IVA (0.01–5 mM) in a metabolic shaker (90 oscillations min<sup>-1</sup>) with 625  $\mu\text{M}$  *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside in order to permeate the mitochondrial membranes. Controls did not contain the tested metabolites in the incubation medium. After preincubation, 0.055  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ] acetate and 1.0 mM of unlabeled acetate were added to the incubation medium. The total volume of incubation was 550  $\mu\text{L}$ . The flasks were gassed with an O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5) mixture and sealed with rubber stoppers and Parafilm M. Glass center wells containing a folded 60 mm/4 mm piece of Whatman 3 filter paper were hung from the stoppers. After 60 min of incubation at 35°C in a metabolic shaker (90 oscillations min<sup>-1</sup>), 0.2 mL of 50% trichloroacetic acid was supplemented to the medium and 0.1 mL of benzethonium hydroxide was added to the center of the wells with needles introduced through the rubber stopper. The flasks were left to stand for 30 min to complete  $^{14}\text{CO}_2$  trapping and then, were opened. The filter papers were removed and added to vials containing scintillation fluid, and radioactivity was counted. Results were calculated as pmol  $^{14}\text{CO}_2$  h<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup> and expressed as the percentage of controls.

### **Spectrophotometric Analysis of the Respiratory Chain Complexes I–IV**

The activities of succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP)-oxidoreductase (complex II) and succinate:cytochrome *c* oxidoreductase (complex II–III) were determined in homogenates from cerebral cortex according to Fischer *et al.* (1985) and that of cytochrome *c* oxidase (complex IV) according to Rustin *et al.* (1994). The methods described to measure these activities were slightly modified, as described in detail in a previous report (da Silva *et al.*, 2002). NADH dehydrogenase (complex I) was measured in mitochondrial preparations from cerebral cortex. Complex I was determined by the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at  $\lambda = 420$  nm ( $\epsilon = 1$  mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) according to Cassina and Radi (1996). The metabolites evaluated were added to the reaction medium at the beginning of the assays, while none was added to the controls. The activities of the respiratory chain complexes were calculated as nmol min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup> or mmol min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup> and the results were expressed as the percentage of controls.

### **Creatine Kinase Activity**

Creatine kinase (CK) activity was measured in total homogenates according to Hughes (1962) with slight modifications (Schuck *et al.*, 2002). Briefly, the reaction mixture consisted of 50 mM Tris buffer, pH 7.5, containing 7.0 mM phosphocreatine, 7.5 mM MgSO<sub>4</sub>, and 0.5–1.0  $\mu\text{g}$  protein in a final volume of 0.1 mL. The metabolites 3-OHIVA (0.01–1.0 mM), IVG (0.01–1.0 mM), or IVA (0.01–5 mM) were supplemented to the medium and submitted to a preincubation at 37°C for 15 min. The

reaction was then started by the addition of 4.0 mM ADP and stopped after 10 min by the addition of 0.02 mL of 50 mM *p*-hydroxy-mercuribenzoic acid. The creatine formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes (1962). The colour was developed by the addition of 0.1 mL of 20%  $\alpha$ -naphthol and 0.1 mL of 20% diacetyl in a final volume of 1.0 mL and read after 20 min at  $\lambda = 540$  nm. Results were expressed as  $\mu\text{mol of creatine min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ .

### Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activity

The reaction mixture for the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase assay contained 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 40 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, and purified synaptic membranes (approximately, 3  $\mu\text{g}$  of protein) in a final volume of 200  $\mu\text{L}$ . The enzymatic assay occurred at 37 °C within 5 min and started concentrating by the addition of ATP (disodium salt, vanadium free) to a final concentration of 3 mM. The reaction was stopped by the addition of 200  $\mu\text{L}$  of 10% trichloroacetic acid. The ouabain-insensitive Mg<sup>2+</sup>-ATPase was assayed under the same conditions with the addition of 1 mM ouabain. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays (Tsakiris and Deliconstantinos, 1984). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan *et al.* (1986). In some experiments, 3-OHIVA (1.0 mM), IVG (1.0 mM), or IVA (1.0–5.0 mM) were preincubated for 1 h with cortical homogenates and the synaptic membrane prepared afterwards, whereas in others these metabolites were directly incubated with the purified synaptic membranes. Enzyme-specific activities were expressed as nmol Pi released  $\text{min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$  and results were expressed as the percentage of controls.

### Protein Determination

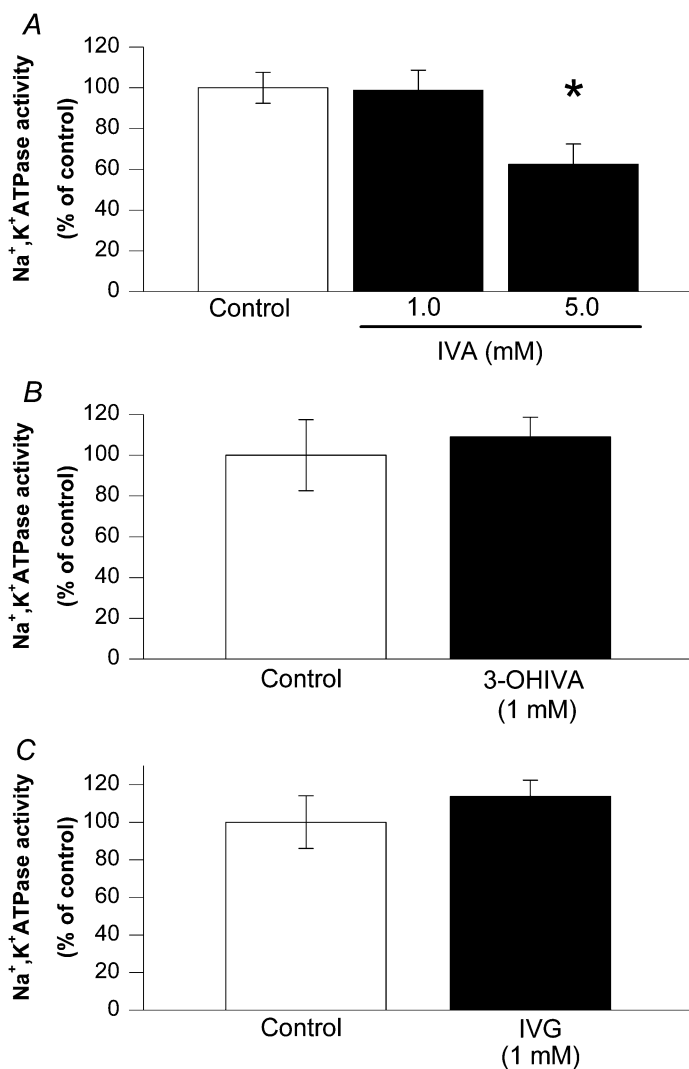
Protein was measured by the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as standard.

### Statistical Analysis

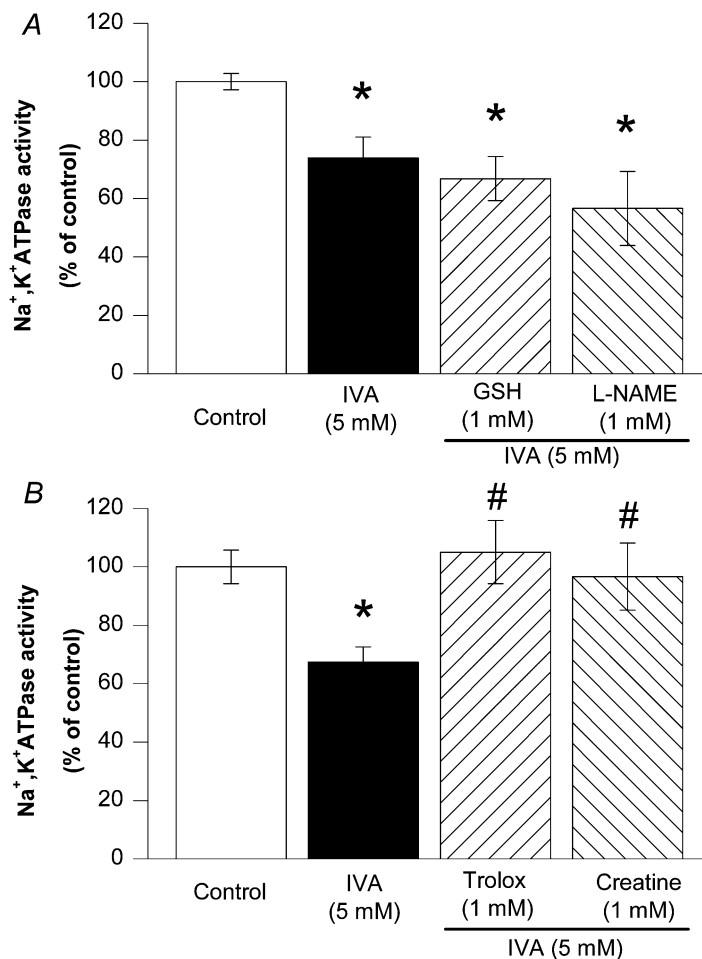
Unless otherwise stated, the results are presented as mean  $\pm$  SEM. Assays were performed in duplicate or triplicate and the mean or median was used for statistical analysis. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the posthoc Duncan multiple range test when *F* was significant. The Student *t* test for paired samples was used for the comparison of two means. Only significant *F* and *t* values are shown in the text. Differences between groups were rated significant at *P* < 0.05. All analyses were carried out on an IBM-compatible PC computer using the statistical package for the social sciences (SPSS) software.

## RESULTS

First, we investigated the *in vitro* effect of IVA, 3-OHIVA and IVG on CO<sub>2</sub> production from [1-<sup>14</sup>C] acetate in cerebral cortex from 30-day-old rats in order to



**Fig. 1.** Effect of isovaleric acid (IVA) (A) 3-hydroxyisovaleric acid (3-OHIVA) (B) and isovalerylglycine (IVG) (C) on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in synaptic plasma membranes from cerebral cortex homogenates of young rats. Values are means  $\pm$  SEM for 4-6 experiments (animals) performed in duplicate and expressed as the percentage of controls ( $899.1 \pm 68.9$  nmol Pi released  $\text{min}^{-1}$ ). IVA, 3-OHIVA and IVG were preincubated at 37°C for 1 h with cortical homogenates, after which the synaptic membranes were isolated and the activity measured afterwards. \* $P < 0.05$ , different from controls (one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test).



**Fig. 2.** Effect of isovaleric acid (IVA, 5.0 mM) on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in synaptic plasma membranes from cerebral cortex homogenates of young rats in the presence of glutathione (GSH, 1.0 mM), N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 1.0 mM) (A) or Trolox (1.0 mM) and creatine (1.0 mM) (B). Cortical homogenates were cocubated at 37°C for 1 h with IVA plus GSH and L-NAME (A) or IVA plus Trolox and creatine (B), after which the synaptic membranes were purified and the activity measured afterwards. Values are means ± SEM for 4–6 experiments (animals) performed in duplicate and expressed as the percentage of controls \**P* < 0.05, different from controls, #*P* < 0.05, different from IVA (one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test).

evaluate whether these metabolites could affect the citric acid cycle activity. We found that this parameter was not changed by these metabolites at concentrations as high as 1.0 mM 3-OHIVA and IVG and 5.0 mM IVA (data not shown).

We also evaluated the effect of IVA, 3-OHIVA and IVG on the various respiratory chain enzyme activities in an attempt to elucidate whether the respiratory

chain activity could be altered by the major metabolites accumulating in IVA. Again, no significant alteration of the various activities was observed, although a mild inhibition of complex II and activation of complex I by IVA occurred. In addition, we verified that IVA, 3-OHIVA and IVG did not modify creatine kinase activity from cortical homogenates (data not shown).

The next set of experiments was carried out to test the influence of IVA, 3-OHIVA and IVG on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in synaptic plasma membranes from cortical homogenates. In these experiments, cortical homogenates were first preincubated with the metabolites, and the synaptic plasma membranes isolated afterwards. Figure 1A shows that 5.0 mM IVA exposition to homogenates provoked a significant inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity (up to 38% inhibition) [ $F_{(2,12)} = 5.44$ ;  $P < 0.05$ ], in contrast to 3-OHIVA (Fig. 1B) and IVG (Fig. 1C) which did not change this activity. Further experiments were conducted to investigate the direct effect of IVA, 3-OHIVA and IVG on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity on purified synaptic membranes and showed that under these conditions, the metabolites did not alter the enzyme activity (data not shown). Therefore, it may be presumed that IVA-induced inhibitory action on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity was through an indirect mechanism. Since  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity is susceptible to free radical attack, we then tested whether the pretreatment of cortical homogenates with 1.0 mM of the antioxidants GSH, L-NAME, Trolox and creatine could affect the inhibitory action of 5.0 mM IVA on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity (Fig. 2). We observed that GSH and L-NAME did not alter the IVA-induced inhibitory effect [ $F_{(3,19)} = 5.53$ ;  $P < 0.05$ ], suggesting that nitric oxide and oxidation of sulphhydryl residues of this enzyme were not involved in this action (Fig. 2A). In contrast, trolox and creatine completely prevented the inhibition provoked by IVA on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity [ $F_{(3,16)} = 3.69$ ;  $P < 0.05$ ], indicating that mainly peroxide radicals were responsible for this inhibition probably by acting on critical groups of the enzyme (Fig. 2B).

## DISCUSSION

Patients affected by IVAacidemia, an autosomal recessive disorder, commonly present severe neurological dysfunction. In approximately half of them, the symptoms begin early as an acute neonatal presentation with vomiting, lethargy, coma, and seizures; in the other half, they begin later, with a chronic phenotype presenting nonspecific failure to thrive, and physical and psychomotor delay. Both the groups are prone to develop intermittent acute episodes with metabolic acidosis and metabolic decompensation following infectious or other physiological stress situations including fasting (Tanaka, 1990). The biochemical hallmark of this disorder is the accumulation of IVA and their carnitine (isovalerylcarnitine) and glycine (IVG) derivatives, as well as 3-OHIVA. The amount of free IVA during episodes of acute decompensation can achieve several hundred times in the blood, while isovalerylcarnitine and IVG are the hallmark of this disorder in plasma and urine, respectively.

Although severe cerebral damage is usually seen in the affected patients, the underlying mechanisms involved in the neuropathology of this disease are



practically unknown. Thus, in the present study we investigated whether the main accumulating metabolites in this disorder, i.e., IVA, 3-OHIVA, and IVG, could compromise energy metabolism in cerebral cortex from young rats. This approach seems valid since these metabolites are basically generated inside the mitochondria, which is the organelle responsible for cellular energy production. The maximal doses of IVA utilized in the *in vitro* assays were those appearing in the plasma of isovaleric acidemic patients (up to 5 mM), whereas for 3-OHIVA and IVG, which accumulate in lower amounts, we used 1 mM concentration.

We first verified that these metabolites provoked no alteration of CO<sub>2</sub> production from acetate and of the activities of complexes I–IV of the respiratory chain. The data indicate that these compounds at the concentrations used did not affect the citric acid cycle activity and the respiratory chain. Furthermore, creatine kinase activity, a crucial enzyme activity involved in intracellular ATP transfer, was also not modified by these substances. Taking together these observations, it can be presumed that IVA, 3-OHIVA, and IVG probably do not compromise *in vitro* energy production and transfer in the cerebral cortex of rats. In contrast, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity from synaptic plasma membranes was selectively inhibited by 5.0 mM IVA when cerebral cortex homogenates from young rats were preincubated for 1 h with the acid and the synaptic membranes prepared afterwards. Further experiments revealed that direct exposition of IVA to the purified plasma synaptic membranes did not provoke any inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. Therefore, it may be concluded that IVA acted via an indirect mechanism that ultimately provoked a reduction of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. In contrast, 3-OHIVA and IVG were not able to inhibit this enzyme activity when exposed to cortical homogenates and to purified synaptic membranes, indicating that IVA-induced inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity was selective.

We should emphasize that the inhibitory action of IVA on synaptic Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity could not be attributed to lack of energy, as occurs in some *in vivo* situations, since the present data showed that IVA did not affect the citric acid cycle or the respiratory chain activity and the *in vitro* assay used to measure this activity was carried out with excess ATP.

Increasing evidence is emerging demonstrating that Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase is highly vulnerable to free radical attack (Lees, 1993; Kurella *et al.*, 1997; Yousef *et al.*, 2002). Thus, the next experiments were carried out to test the effect of various antioxidants on the IVA-induced inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. Pretreatment of homogenates with Trolox ( $\alpha$ -tocopherol) totally prevented the inhibition caused by IVA, indicating that peroxide radicals were mainly responsible for IVA effect by acting on critical groups of the enzyme. Creatine was also able to prevent IVA inhibition completely. In contrast, preincubation of cortical homogenates with L-NAME and GSH did not alter the inhibition provoked by the acid, suggesting that nitric oxide attack and modifications of sulfhydryl groups of the enzyme were not involved in the IVA inhibitory effect.

With regard to the mechanisms underlying the inhibitory effect of IVA on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, it may be presumed that they might be, at least in part, due to lipid peroxidation of the synaptic plasma membrane in which the enzyme is embedded; since, we also demonstrated in the present study that IVA-induced inhibition

was prevented by Trolox, which acts preferentially by removing or preventing the formation of peroxide radicals. Also, we cannot rule out that hydroxyl radicals were involved in the decrease of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity since creatine is considered to be a direct scavenger of reactive oxygen species, particularly hydroxyl radicals, the most toxic *in vivo* free radical (Sestili *et al.*, 2006).

There is increasing evidence suggesting that alterations in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity may be a link between common neurotoxic mechanisms in neurons, in relation to the possible consequences of the inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity provoked by IVA and the neural cellular function (Sweadner, 1979; Lees, 1991; Satoh and Nakazato, 1992; Lees, 1993). Furthermore, reduction of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the cerebral cortex of a neonate was considered to be directly involved in its status convulsivus and spongiform encephalopathy (Renkawek *et al.*, 1992). Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase was also associated with excitotoxicity and epilepsy (Grisar, 1984; Ben-Ari, 1985; Choi and Rothman, 1990; Cousin *et al.*, 1995; Lees and Leong, 1995). Our present results may, therefore, be implicated in the brain injury and especially, in the encephalopathic crises that occur in patients affected by IVAcidemia following infections or other stress situations characterized by catabolism, since the plasma levels of IVA during these acute episodes reach 5.0 mM, which is similar to those found to significantly reduce Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity (Tanaka *et al.*, 1966; Tanaka and Isselbacher, 1967; Tanaka, 1990; Sweetman and Williams, 2001).

In conclusion, the present study demonstrated for the first time that IVA, the major metabolite accumulating in IVAcidemia, inhibits a crucial enzyme, which is responsible for maintaining the basal potential membrane necessary for a normal neurotransmission. In case our *in vitro* results could be extrapolated to the human condition, it is feasible that inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity might contribute, at least in part, to the encephalopathy of IVAcidemic patients, especially during crises when the concentrations of these toxic metabolites dramatically increase (Tanaka *et al.*, 1966; Tanaka and Isselbacher, 1967; Tanaka, 1990; Sweetman and Williams, 2001).

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CNPq, FAPERGS/PRONEX, and PROPESQ/UFRGS.

## REFERENCES

- Ben-Ari, Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: Mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **14**:375–403.
- Cassina, A., and Radi, R. (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* **328**:309–316.
- Chan, K. M., Delfert, D., and Junger, K. D. (1986). A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* **157**:375–380.
- Chase, D. H., Kalas, T. A., and Naylor, E. W. (2003). Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin. Chem.* **49**:1797–1817.
- Choi, D. W., and Rothman, S. M. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann. Rev. Neurosci.* **13**:171–182.

- Cousin, M. A., Nicholls, D. G., and Pocock, J. M. (1995). Modulation of ion gradients and glutamate release in cultured cerebellar granule cells by ouabain. *J. Neurochem.* **64**:2097–2104.
- da Silva, C. G., Ribeiro, C. A., Leipnitz, G., Dutra-Filho, C. S., Wyse, A. T., Wannmacher, C. M., Sarkis, J. J., Jakobs, C., and Wajner, M. (2002). Inhibition of cytochrome c oxidase activity in rat cerebral cortex and human skeletal muscle by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **1586**:81–91.
- Dutra-Filho, C. S., Wajner, M., Gassen, E., Candiago, R., Wihlelms, A., Malfussi, H., and Wannmacher, C. M. D. (1995). Effect of organic acids on in vitro glucose oxidation by cerebral cortex of young rats. *Med. Sci. Res.* **23**:25–26.
- Fischer, J. C., Ruitenbeek, W., Berden, J. A., Trijbels, J. M., Veerkamp, J. H., Stadhouders, M., Sengers, R. C., and Janssen, A. J. (1985). Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin. Chim. Acta* **153**:23–36.
- Grisar, T. (1984). Glial and neuronal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump in epilepsy. *Ann. Neurol.* **16**:128–134.
- Hughes, B. P. (1962). A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin. Chim. Acta* **7**:597–603.
- Jones, D. H., and Matus, A. I. (1974). Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta* **356**:276–287.
- Kurella, E., Kukley, M., Tyulina, O., Dobrota, D., Matejovicova, M., Mezesova, V., and Boldyrev, A. (1997). Kinetic parameters of Na/K-ATPase modified by free radicals in vitro and in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **834**:661–665.
- Lees, G. J. (1991). Inhibition of sodium-potassium-ATPase: A potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **16**:283–300.
- Lees, G. J. (1993). Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* **54**:287–322.
- Lees, G. J., and Leong, W. (1995). Brain lesions induced by specific and non-specific inhibitors of sodium potassium ATPase. *Neurosci. Lett.* **188**:113–116.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265–275.
- Renkawek, K., Renier, W. O., De Pont, J. J., Vogels, O. J., and Gabreels, F. J. (1992). Neonatal status convulsivus, spongiform encephalopathy, and low activity of (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase in the brain. *Epilepsy* **33**:58–64.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J. M., and Munnich, A. (1994). A Biochemical and Molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* **228**:35–51.
- Satoh, E., and Nakazato, Y. (1992). On the mechanism of ouabain-induced release of acetylcholine from synaptosomes. *J. Neurochem.* **58**:1038–1044.
- Schapira, A. H., Mann, V. M., Cooper, J. M., Dexter, D., Daniel, S. E., Jenner, P., Clark, J. B., Marsden, C. D. (1990). Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **55**:2142–2145.
- Schuck, P. F., Leipnitz, G., Ribeiro, C. A., Dalcin, K. B., Assis, D. R., Barschak, A. G., Pulrolnik, V., Wannmacher, C. M., Wyse, A. T., and Wajner, M. (2002). Inhibition of creatine kinase activity in vitro by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. *Neurochem. Res.* **27**:1633–1639.
- Schulze, A., Lindner, M., Kohlmüller, D., Olgemöller, K., Mayatepek, E., and Hoffmann, G. F. (2003). Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: Results, outcome, and implications. *Pediatrics* **111**:1399–1406.
- Sestili, P., Martinelli, C., Bravi, G., Piccoli, G., Curci, R., Battistelli, M., Falcieri, E., Agostini, D., Gioacchini, A. M., and Stocchi, V. (2006). Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* **40**:837–849.
- Swadner, K. J. (1979). Two molecular forms of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. *J. Biol. Chem.* **254**:6060–6067.
- Sweetman, L., and Williams, J. C. (2001). Disorders of branched-chain amino acid and organic acid metabolism. In Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D. (eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill, New York, 2125–2159.
- Tanaka, K., Budd, M. A., Efron, M. L., and Isselbacher, K. J. (1966). Isovaleric acidemia: A new genetic defect of leucine metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**:236–242.
- Tanaka, K., and Isselbacher, K. J. (1967). The isolation and identification of N-isovalerylglutamic acid from urine of patients with isovaleric acidemia. *J. Biol. Chem.* **242**:2966–2972.
- Tanaka, K., Nest-Dull, A., Hine, D. G., Lynn, T. B., and Lone, T. (1980). Gas chromatographic method of analysis for urinary organic acids. II- Description of the procedure, and its application to diagnosis of patients with organic acidurias. *Clin. Chem.* **26**:1847–1853.

- Tanaka, K. (1990). Isovaleric acidemia: Personal history, clinical survey and study of the molecular basis. *Prog. Clin. Biol. Res.* **321**:273–290.
- Tsakiris, S., and Deliconstantinos, G. (1984). Influence of phosphatidylserine on (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes. *Biochem. J.* **220**:301–307.
- Yousef, M. I., El-Hendy, H. A., El-Demerdash, F. M., and Elagamy, E. I. (2002). Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. *Toxicology* **175**:223–234.
- Zytkovicz, T. H., Fitzgerald, E. F., Marsden, D., Larson, C. A., Shih, V. E., Johnson, D. M., Strauss, A. W., Comeau, A. M., Eaton, R. B., and Grady, G. F. (2001). Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: A two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin. Chem.* **47**:1945–1955.

## **Capítulo II.**

**Creatine administration prevents Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibition induced by intracerebroventricular administration of isovaleric acid in cerebral cortex of young rats.**

César Augusto João Ribeiro, Guilhian Leipnitz, Alexandre Umpierrez Amaral,

Giorgia de Bortoli, Bianca Seminotti, Moacir Wajner

Artigo científico publicado no periódico

*Brain Research* 1262:81-88, 2009

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)


---



---

**BRAIN  
RESEARCH**


---



---

## Research Report

# Creatine administration prevents Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibition induced by intracerebroventricular administration of isovaleric acid in cerebral cortex of young rats

César Augusto João Ribeiro<sup>a</sup>, Guilhian Leipnitz<sup>a</sup>, Alexandre Umpierrez Amaral<sup>a</sup>,  
Giorgia de Bortoli<sup>c</sup>, Bianca Seminotti<sup>a</sup>, Moacir Wajner<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

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

<sup>c</sup>Universidade Lutarana do Brasil, Canoas, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 6 January 2009

Available online 13 January 2009

## Keywords:

Isovaleric acidemia

Energy metabolism

Organic acidemia

Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase

Cerebral cortex

Creatine

## ABSTRACT

Isovaleric acidemia (IVAcidemia) is an inborn error of metabolism due to deficiency of isovaleryl-CoA dehydrogenase activity, leading to predominant accumulation of isovaleric acid (IVA). Patients affected by IVAcidemia suffer from acute episodes of encephalopathy, whose underlying mechanisms are poorly known. In the present study we investigated whether an intracerebroventricular injection of IVA could compromise energy metabolism in cerebral cortex of young rats. IVA administration significantly inhibited <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production from acetate (22%) and citrate synthase activity (20%) in cerebral cortex homogenates prepared 24 h after injection. However, no alterations of these parameters were observed 2 h after injection. In contrast, no significant differences were found in the activities of succinate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, electron transfer chain complexes or creatine kinase in rats sacrificed 2 or 24 h after IVA administration. Moreover, IVA injection significantly inhibited Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity (25%) in cerebral cortex of rats 2 or 24 h after IVA administration, while pre-treatment of rats with creatine completely prevented the inhibitory effects of IVA on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. In conclusion, *in vivo* administration of IVA inhibits the citric acid cycle probably through the enzyme citrate synthase, as well as Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, a crucial enzyme responsible for maintaining the basal potential membrane necessary for a normal neurotransmission. It is presumed that inhibition of these activities may be involved in the pathophysiology of the neurological dysfunction of isovaleric acidemic patients. The present findings are of particular interest because treatment with creatine supplementation may represent a potential novel adjuvant therapeutic strategy in IVAcidemia.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55 51 21018010.

E-mail address: [mwajner@ufrgs.br](mailto:mwajner@ufrgs.br) (M. Wajner).

Abbreviations: IVAcidemia, Isovaleric acidemia; IVD, Isovaleryl-CoA dehydrogenase; IVA, Isovaleric acid; IVG, Isovalerylglycine; icv, Intracerebroventricular; CAC, Citric acid cycle; CS, Citrate synthase; SDH, Succinate dehydrogenase; IDH, Isocitrate dehydrogenase; ETC, Electron transfer chain; CNS, Central nervous system; CK, Creatine kinase; SPSS, Statistical Package for the Social Sciences

## 1. Introduction

Isovaleric acidemia (IVAcidemia, MIM 243500) is an autosomal recessive inherited metabolic disorder of leucine metabolism caused by a deficiency of isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVD; E.C. 1.3.99.10), a homotetrameric mitochondrial flavoenzyme of the family of acyl-CoA dehydrogenases (Tanaka et al., 1966). IVD catalyses the conversion of isovaleryl-CoA to 3-methylcrotonyl-CoA, and its deficiency leads to accumulation of the isovaleryl-CoA derivatives isovaleric acid (IVA) and their carnitine (isovalerylcarnitine) and glycine (isovalerylglycine, IVG) derivatives, as well as 3-hydroxyisovaleric acid (3-OHIVA). The amount of free IVA during episodes of acute decompensation can achieve several hundred times the normal values (up to 5 mM) (Sweetman and Williams, 2001) in the blood, while isovalerylcarnitine and IVG are the hallmark of this disorder in plasma and urine, respectively. IVAcidemia is considered a severe, potentially life-threatening disorder that manifests with acute neonatal encephalopathy with recurrent episodes of vomiting, lethargy, coma in about half of the affected individuals, and with poor feeding, tachypnea, dehydration and varying degrees of developmental delay in the other half of the patients (Lee et al., 2007; Lin et al., 2007; Sweetman and Williams, 2001). Neuropathological abnormalities include alterations in the globi pallidi and corticospinal tracts of the mesencephalon on MRI (Sogut et al., 2004), as well as diffuse cerebral edema, massive cerebellar hemorrhage, upward transtentorial herniation, and focal degeneration of clusters of glial cells in white and gray matter (Fischer et al., 1981).

The incidence of IVAcidemia varies from 1/62,500 live births in Germany (Schulze et al., 2003) to 1/250,000 in the United States (Chace et al., 2003; Zytkevicz et al., 2001). The diagnosis of IVAcidemia is based on the presence of high amounts of predominantly IVG and 3-OHIVA in urine, with other metabolites appearing at lower amounts (Tanaka and Isselbacher, 1967; Tanaka et al., 1980).

Despite the large number of accumulating and excreted metabolites in this disorder, their occurrence do not explain the clinical symptoms of the affected patients, so that investigation on the role of these metabolites on the central nervous system (CNS) function and development will eventually lead to a better understanding of the relationship between the clinical conditions and their biochemical abnormalities, as well as the pathophysiology of the cerebral damage in this disorder. Furthermore, although neurological alterations are pronounced in IVAcidemia, the exact mechanisms of brain damage in this disease are poorly understood. It was recently reported that IVG, but not IVA, induces oxidative stress in cerebral cortex of rats (Solano et al., 2008). Furthermore, we previously described that *in vitro* exposure of cortical homogenates to IVA provoked a significant reduction of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity (Ribeiro et al., 2007).

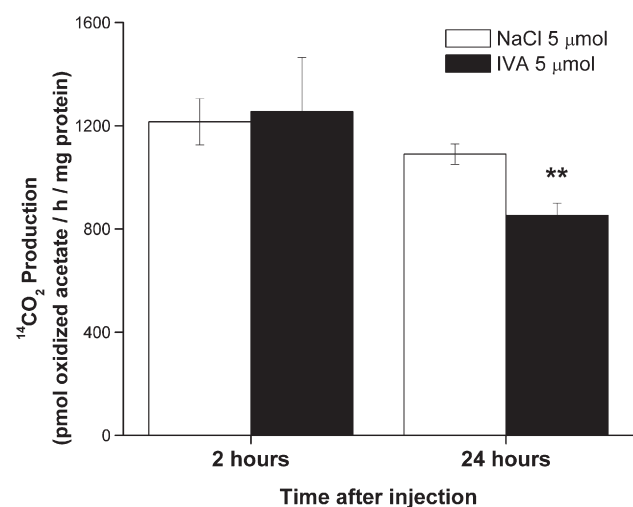
Since IVA is the major accumulating metabolite in IVAcidemia and is produced inside the mitochondria, it seems appropriate to evaluate its role on cellular energy metabolism, which basically occurs in this organelle. Thus, the present study was undertaken to investigate the influence of *in vivo* intracerebroventricular (icv) administration of IVA to rats on

important parameters of energy production, transfer and utilization in order to clarify the mechanisms involved in the neuropathology of IVAcidemia. We evaluated the activity of the citric acid cycle (by measuring <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production from [1-<sup>14</sup>C]acetate and the activities of citrate synthase, isocitrate dehydrogenase and succinate dehydrogenase), as well as the activities of the electron transfer chain complexes I–IV, creatine kinase and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and respiratory parameters in cerebral cortex of young rats at distinct periods after IVA injection. We also examined the role of creatine on the bioenergetic alterations caused by IVA to clarify the involved mechanisms of its effects.

## 2. Results

We first examined the influence of IVA treatment on citric acid cycle (CAC) rate by measuring <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production from [1-<sup>14</sup>C]acetate in total homogenates prepared from cerebral cortex of rats that received IVA or NaCl 2 or 24 h after injection. <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production from acetate was significantly reduced by about 22% in cerebral cortex of IVA-injected animals sacrificed 24 h after IVA administration (*P*<0.01). However, no differences in <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> formation were found 2 h after IVA injection (Fig. 1).

The activities of some CAC enzymes were determined in cerebral cortex homogenates prepared 2 or 24 h after IVA or NaCl injection to clarify the reduction of CAC functioning. The activity of citrate synthase (CS) remained unmodified in cerebral cortex of IVA-injected rats sacrificed 2 h after IVA administration but was significantly reduced (up to 20%,



**Fig. 1** – <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production from [1-<sup>14</sup>C]acetate in cerebral cortex obtained at different periods (2–24 h) after icv administration of 5 μmol isovaleric acid (IVA) or NaCl. Animals received NaCl or IVA into each the lateral ventricle as described in [Experimental procedures](#). Data are represented as mean ± SEM for 4–5 independent experiments performed in triplicate and are expressed as pmol oxidized acetate/h/mg protein. \*\**P*<0.01 compared to NaCl (Student's *t* test for unpaired samples).

**Table 1 – Activities of citric acid cycle enzymes, complexes I–III, II, II–III and IV of the electron transfer chain and creatine kinase in cerebral cortex homogenates of rats at different times after isovaleric acid (IVA) or NaCl icv administration**

Activities	2 h		24 h	
	NaCl	IVA	NaCl	IVA
Citrate synthase	150±8.40 (n=4)	161±13.8 (n=5)	161±9.02 (n=9)	130±7.45 (n=8) <sup>a</sup>
Isocitrate dehydrogenase	12.9±1.53 (n=4)	14.2±1.72 (n=4)	11.5±0.08 (n=3)	11.4±0.49 (n=3)
Succinate dehydrogenase	9.88±0.34 (n=6)	9.31±0.39 (n=5)	11.7±0.31 (n=8)	10.5±0.44 (n=7)
Complex I–III	7.04±0.61 (n=4)	7.54±1.15 (n=5)	7.98±0.42 (n=4)	7.86±0.46 (n=4)
Complex II	3.82±0.19 (n=6)	3.15±0.43 (n=5)	5.34±0.49 (n=8)	5.07±0.36 (n=7)
Complex II–III	27.2±1.57 (n=6)	26.4±1.44 (n=5)	28.6±1.09 (n=5)	25.8±0.72 (n=4)
Complex IV	123±7.45 (n=6)	126±2.35 (n=5)	111±10.1 (n=5)	104±9.52 (n=4)
Creatine kinase	2.50±0.12 (n=6)	2.73±0.29 (n=5)	2.54±0.14 (n=5)	2.83±0.11 (n=4)

Values represent mean±SEM for four to nine independent experiments (animals) per group performed in duplicate and are expressed as nmol/min/mg protein for citrate synthase, succinate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, complexes I–III, II, II–III and IV and as μmol creatine/min/mg protein for creatine kinase. Two microliters of a 2.5 M IVA or NaCl solution was injected in each lateral ventricle.

<sup>a</sup>  $P < 0.05$ , different from NaCl (Student's *t* test for unpaired samples).

$P < 0.05$ ) in cerebral cortex of rats sacrificed 24 h after IVA icv injection. In contrast, no significant differences were found in the activities of succinate dehydrogenase (SDH) and isocitrate dehydrogenase (IDH) in rats sacrificed 2 or 24 h after IVA icv administration relatively to controls. These data suggest that the reduction of  $^{14}\text{CO}_2$  synthesis found in cerebral cortex of IVA-treated rats could be explained by the reduction of CS activity (Table 1). It can be also seen in the table that the activities of the electron transfer chain (ETC) complexes and total creatine kinase activity (CK), a key enzyme involved in high energy phosphate transfer, were not changed in cerebral cortex homogenates from rats sacrificed 2 or 24 h after IVA icv administration, as compared to NaCl-injected animals.

In order to assess the overall consequences of CS inhibitory effect elicited by IVA icv administration on mitochondrial respiration we also investigated whether the respiratory state 4, state 3 (ADP-stimulated respiration) and respiratory control ratio parameters were altered in cerebral cortex of rats 24 h after IVA administration. Table 2 shows that the respiration states 4 and 3 and the RCR values were not modified by IVA icv injection when mitochondria was stimulated with pyruvate/malate (NAD-linked substrates).

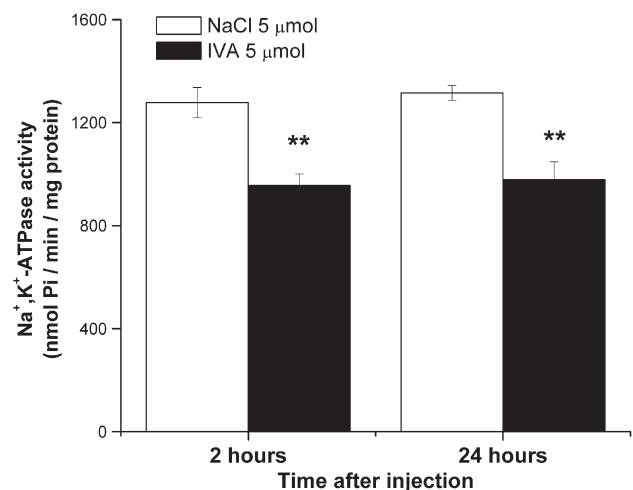
**Table 2 – Effect of isovaleric acid (IVA) icv injection on oxygen consumption in ADP-stimulated (state 3), non-ADP-stimulated (state 4) and on the respiratory control ratio (RCR) in rat brain mitochondria supported by pyruvate/malate**

	24 h	
	NaCl	IVA
State 3	76.2±0.70	81.7±2.45
State 4	4.05±0.05	4.36±0.34
RCR	19.6±0.23	19.18±2.00

Values are means±SEM for three to four independent experiments (animals). States 3 and 4 of mitochondrial respiration are expressed as nmol  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}$  of protein $^{-1}$ . No difference between groups was found (Student's *t* test for unpaired samples).

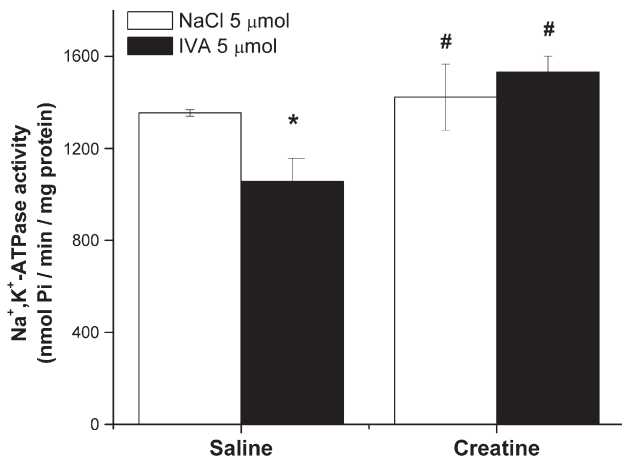
The next set of experiments was carried out to test the influence of IVA icv administration on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats sacrificed 2 or 24 h after IVA or NaCl administration. Fig. 2 shows that IVA icv injection provoked a significant inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity (up to 25% inhibition,  $P < 0.01$ ) in cerebral cortex of rats sacrificed 2 h after IVA administration and that this activity remains reduced by 25% in rats sacrificed 24 h after IVA administration ( $P < 0.01$ ).

Considering our previous *in vitro* results indicating that creatine was able to totally prevent the inhibitory effect elicited by IVA on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase from cerebral cortex (Ribeiro et al., 2007), the effect of *i.p.* creatine (50 mg/kg) or saline (0.9% NaCl) pre-treatment for 7 days, twice a day, on the inhibitory  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase properties of IVA was examined 24 h after injection. As shown in Fig. 3, creatine pre-treatment fully



**Fig. 2 – Effect of intracerebroventricular administration of 5 μmol isovaleric acid (IVA) on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity from synaptic plasma membranes from rat cerebral cortex at 2 h and 24 h after injection. Data are expressed as mean±SEM for 5–6 independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\* $P < 0.01$  compared to rats that received icv NaCl injection (Student's *t* test for unpaired samples).**





**Fig. 3 – Effects of creatine (50 mg/kg) on the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase caused by IVA icv injection. Animals were treated with saline or creatine i.p. for 7 days, twice a day, before isovaleric acid (IVA) injection and sacrificed 24 h later. Data are represented as mean ± SEM for 4–5 independent experiments (animals) performed in duplicate and are expressed as nmol Pi/min/mg protein. \*P < 0.05 compared to rats pre-treated with saline and treated with NaCl; #P < 0.05, compared to rats pre-treated with saline and treated with IVA (ANOVA followed by Duncan's multiple range test).**

prevented the inhibitory effects of IVA on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. This conclusion is based on the fact that creatine *per se* did not stimulate Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity.

### 3. Discussion

Patients affected by IVAcidemia, an autosomal recessive disorder, commonly present severe neurological dysfunction. They develop intermittent encephalopathic acute episodes with metabolic acidosis following infectious or other physiological catabolic stress situations (Sweetman and Williams, 2001; Tanaka, 1990; Vockley and Ensenauer, 2006). The biochemical hallmark of this disorder is the accumulation of IVA and their carnitine and glycine derivatives, as well as 3-OHIVA. The amount of free IVA during episodes of acute decompensation can achieve several hundred times the normal values in the blood, while isovalerylcarnitine and IVG are the biochemical hallmark of this disorder in plasma and urine, respectively.

Although severe cerebral damage characterized by marked lesions in globi pallidi and corticospinal tracts are seen in the affected patients, the underlying mechanisms involved in the neuropathology of this disorder are poorly known. Thus, in the present study we investigated whether the icv injection of IVA, the major accumulating metabolite in IVAcidemia, could compromise energy metabolism in cerebral cortex of young rats. This approach seems valid since this metabolite is basically generated inside the mitochondria, which is the organelle responsible for cellular energy production.

We first examined the overall activity of CAC cycle by measuring the production of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> from acetate. We found

that icv IVA administration did not alter this parameter in rats sacrificed 2 h after icv injection. However, 24 h after icv IVA administration <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production was significantly reduced (up to 25%) compared to rats that received NaCl. This reduction could be due to a blockage of the ETC or because of inhibition of one or more enzymes of the CAC. In this context, we observed that the activities of the complexes of ETC in cerebral cortex homogenates from rats sacrificed 2 or 24 h after icv administration were not altered by IVA. Further experiments revealed that the activity of CS was significantly reduced (up to 20%) in rats that received icv IVA administration compared to those that received NaCl (Table 1). It should be emphasized that the reduction of CS activity elicited by IVA was not due to reduction of mitochondrial content or viability since the activities of the ETC complexes and other CAC enzymes (SDH and IDH) were not influenced by IVA icv administration. It is therefore conceivable that the IVA-induced inhibitory effect on CS activity could possibly explain the reduction of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production elicited by icv IVA injection, indicating that IVA compromises the metabolite flux through the CAC cycle.

We also observed that IVA did not modify the respiratory parameters state 3, state 4 and the RCR in mitochondrial preparations obtained after icv IVA injection. These results suggest that IVA action on brain energy production is not strong enough to change mitochondrial oxygen consumption. Furthermore, CK activity was also not changed by IVA administration, implying that this organic acid does not interfere with energy transfer.

Considering our previous *in vitro* results indicating that IVA inhibits Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity *in vitro* (Ribeiro et al., 2007), and that inhibition of this activity is found in various neuropathological conditions, including cerebral ischemia (Wyse et al., 2000), epilepsy (Grisar, 1984), neurodegenerative disorders (Yu, 2003) and in secondary spinal cord edema (Yang and Piao, 2003), the next step of this study was to investigate the effects of IVA icv administration on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity from synaptic plasma membranes isolated from cerebral cortex of rats. We found that IVA significantly inhibited this activity up to 25% in animals sacrificed 2 or 24 h after IVA administration, reinforcing the view that IVA indeed inhibits this important enzyme activity in the brain. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is a crucial enzyme responsible for the generation of the membrane potential, through the active transport of sodium and potassium ions in the CNS, necessary to maintain neuronal excitability and cellular volume control. It is present at high concentrations in the brain cellular membrane, consuming about 40–50% of the ATP generated in this tissue, and is highly responsive to changes in membrane fluidity (Erecinska and Silver, 1994; Erecinska et al., 2004; Wheeler et al., 1975). Maintenance of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity is critical for normal brain function, and reduction of its activity is related to selective neuronal damage in the rat and human brain (Cousin et al., 1995; Lees et al., 1990; Lees, 1993; Lees and Leong, 1995). Relatively to the possible consequences of the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity provoked by IVA to neural cellular function, there is increasing evidence suggesting that alterations in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity may be a link between common neurotoxic mechanisms in neurons (Lees, 1991; Lees, 1993; Satoh and

Nakazato, 1992; Sweadner, 1979). Furthermore, reduction of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in the cerebral cortex of a neonate was considered to be directly involved in its status convulsivus and spongiform encephalopathy (Renkawek et al., 1992) and inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase has also been associated with excitotoxicity and epilepsy (Benari, 1985; Choi and Rothman, 1990; Cousin et al., 1995; Grisar, 1984; Lees and Leong, 1995). Our present results may therefore be implicated in the brain injury and especially in the encephalopathic crises that occur in patients affected by IVAcidemia following infections or other stress situations characterized by catabolism, when plasma levels of IVA during these acute episodes are highly increased (Sweetman and Williams, 2001; Tanaka et al., 1966; Tanaka and Isselbacher, 1967; Tanaka, 1990).

Considering that previous studies showing neuroprotective effects of creatine supplementation against energy deficit toxicity *in vivo* (Brustovetsky et al., 2001; Matthews et al., 1998; Ribeiro et al., 2006), we also evaluated whether creatine preadministration could change the IVA-induced inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity. We found that pre-treatment with creatine completely abolished the inhibitory effect induced by IVA on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. This effect cannot be attributed to a stimulation of brain  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity by creatine, since this compound did not increase this activity *per se*.

As regards to the mechanism of these effects, increasing evidence is emerging demonstrating that  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase is highly vulnerable to free radical attack (Kurella et al., 1997; Lees, 1993; Yousef et al., 2002). Moreover, creatine supplementation was demonstrated to have antioxidant properties via a mechanism involving a direct scavenging of reactive oxygen species (Sestili et al., 2006). Alternatively, creatine may reduce the production of generated reactive oxygen species through its stimulatory effects on mitochondrial respiration (Kay et al., 2000) that allows for efficient recycling of ADP inside mitochondria by CK, leading to tight coupling of mitochondrial respiration (Meyer et al., 2006). Other mechanisms of creatine-mediated neuroprotection include enhanced energy storage and the stabilization of the mitochondrial permeability transition pore by an octomeric conformation of CK (O'Gorman et al., 1997; Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000). Thus, it is therefore believed that creatine improves the overall bioenergetic status of the cell, making it more resistant to injury (Zhu et al., 2004). One or more of these mechanisms might be involved in the prevention of IVA-induced inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity observed for creatine in the present investigation.

In conclusion, the present study demonstrated that *in vivo* administration of the major metabolite accumulating in IVAcidemia, IVA, inhibits the citric acid cycle probably through the enzyme citrate synthase and also a crucial enzyme ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase) responsible for maintaining the basal potential membrane necessary for a normal neurotransmission. It is feasible that inhibition of these activities might contribute, at least in part, to the encephalopathy of IVAcidemic patients, especially during crises when the concentrations of this toxic metabolite dramatically increase (Sweetman and Williams, 2001; Tanaka et al., 1966; Tanaka and Isselbacher, 1967; Tanaka, 1990). Since creatine administration is well tolerated by newborns (Bohnhorst et al., 2004), the present findings are of particular interest because treatment with creatine supple-

mentation may represent a potential novel adjuvant therapeutic strategy in IVAcidemia.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Animals and reagents

A total of 90 30-day-old Wistar rats obtained from the Central Animal House of the Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, were used in the *in vivo* studies. The animals were maintained on a 12:12 h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature ( $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) colony room, with food and water *ad libitum*. All reagents used were of analytical grade and purchased from Sigma Co. (St Louis, MO, USA).

### 4.2. Isovaleric acid administration

The rats were deeply anesthetized with ketamine plus xilazine (75 and 10 mg/kg *i.p.*, respectively) and placed in a stereotaxic apparatus. Two small holes were drilled in the skull for microinjection, and 2  $\mu\text{L}$  of a 2.5 M isovaleric acid solution (pH 7.4 adjusted with NaOH) or NaCl (controls) at the same volume and concentration, was slowly injected bilaterally over 4 min into the lateral ventricles via needles connected by a polyethylene tube to a 10  $\mu\text{L}$  Hamilton syringe. The needles (one in each ventricle) were left in place for another 1 min before being softly removed. The coordinates for injections were as follows: 0.6 mm posterior to bregma, 1.0 mm lateral to midline and 3.2 mm ventral from dura (Paxinos and Watson, 1986). The correct position of the needle was tested by injecting 0.5  $\mu\text{L}$  of methylene blue injection (4% in saline solution) and carrying out histological analysis. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for animal research of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil and followed the NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH publication 85-23, revised 1985). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. The effect of creatine administration on IVA-induced energetic dysfunction was also evaluated by preinjecting the animals with creatine (50 mg/kg, *i.p.*) or NaCl (0.9%, 10 mL/kg, *i.p.*) for 5 days, two injections per day (Vasques et al., 2006), after which the animals received the icv injection of IVA.

### 4.3. Cerebral cortex preparation

Animals were sacrificed by decapitation 2 or 24 h after icv injection of either IVA or NaCl. The brain was rapidly removed and the cerebral cortex was homogenized in the specific buffer used for each technique. For  $^{14}\text{C}$  production, the cerebral cortex was homogenized (1:10, w/v) in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4. For the determination of the activities of the electron transfer chain complexes I–III, II, II–III and IV, as well as creatine kinase and the citric acid cycle enzyme activities, the cortex was homogenized (1:20, w/v) in SETH buffer, pH 7.4 (250 mM sucrose, 2.0 mM EDTA, 10 mM Trizma base and 50 UI  $\text{mL}^{-1}$  heparin). The homogenates were

centrifuged at 800  $\times g$  for 10 min and the supernatants were kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  until being used for enzyme activity determination. The period between tissue preparation and measurement of these parameters was always less than 5 days.

Mitochondrial fractions used for the determination of oxygen consumption were prepared according to Rosenthal et al. (1987) with slight modifications. Animals were sacrificed by decapitation, had their brains rapidly removed, the cerebral cortex isolated and put into ice-cold isolation buffer containing 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 1 mM EGTA, 0.1% bovine serum albumin (BSA; free fatty acid), 10 mM HEPES pH 7.2 and 5 mg protease. The tissue was cut into small pieces using surgical scissors, extensively washed and then manually homogenized in a Dounce homogenizer using both a loose-fitting and a tight-fitting pestle. The homogenate was centrifuged for 3 min at 2000  $\times g$ . After centrifugation, the supernatant was again centrifuged for 8 min at 12,000  $\times g$ . The pellet was resuspended in 20 mL of isolation buffer containing 10  $\mu\text{L}$  of 10% digitonin and recentrifuged for 8 min at 12,000  $\times g$ . The supernatant was discarded and the final pellet was gently washed and resuspended in isolation buffer devoid of EGTA, at an approximate protein concentration of 15–20 mg/mL. This preparation results in a mixture of synaptosomal and non-synaptosomal mitochondria similar to the brain composition.

For isolation of synaptic plasma membranes cerebral cortex was homogenized in 10 volumes of 0.32 mM sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 1.0 mM EDTA and the synaptic plasma membranes were prepared afterwards according to the method of Jones and Matus (1974) using a discontinuous sucrose density gradient consisting of successive layers of 0.3, 0.8 and 1.0 M. After centrifugation at 69,000  $\times g$  for 2 h, the fraction at the 0.8–1.0 M sucrose interface was taken as the membrane enzyme preparation.

#### 4.4. $^{14}\text{CO}_2$ production from $[1-^{14}\text{C}]$ acetate

For  $^{14}\text{CO}_2$  production, cerebral cortex homogenates containing 1.5–2 mg protein were added to small flasks (11  $\text{cm}^3$ ), which were pre-incubated in a metabolic shaker at  $37^{\circ}\text{C}$  for 15 min. After pre-incubation, 0.1  $\mu\text{Ci}$   $[1-^{14}\text{C}]$ -acetate and 25  $\mu\text{L}$  of a 20 mM unlabeled acetate solution (1.0 mM of unlabeled acetate) were added to the incubation medium in a final incubation volume of 500  $\mu\text{L}$ . The flasks were gassed with a  $\text{O}_2$ : $\text{CO}_2$  (95:5) mixture and sealed with rubber stoppers and Parafilm M. Glass center wells containing a folded 65 mm/5 mm piece of Whatman 3 filter paper were hung from the stoppers. After 60 min of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ , 0.1 mL of 50% trichloroacetic acid was added to the medium and 0.1 mL of benzethonium hydroxide was added to the center wells with needles introduced through the rubber stopper. The flasks were left to stand for 30 min to complete  $^{14}\text{CO}_2$  trapping and then opened. The filter papers were removed and added to vials containing scintillation fluid, and radioactivity was measured (Dutra-Filho et al., 1995). Results correspond to pmol acetate oxidized/h/mg protein.

#### 4.5. Electron transfer chain complexes activities

Mitochondrial respiratory chain enzyme activities (complexes I–III, II, II–III and IV) were measured in cortical supernatants

with a protein concentration varying from 1.5–4.0 mg protein/mL. The activity of NADH:cytochrome c oxidoreductase (complex I–III) was assessed as described by Schapira et al. (1990). The activities of succinate: DCIP-oxidoreductase (complex II) and succinate:cytochrome c oxidoreductase (complex II–III) were determined according to the method of Fischer et al. (1985) and that of cytochrome c oxidase (complex IV) according to Rustin et al. (1994). The methods described to measure these activities were slightly modified, as described in details in previous reports (da Silva et al., 2002). The activities of the respiratory chain complexes were expressed as nmol/min/mg protein.

#### 4.6. Creatine kinase (CK) activity determination

CK activity was measured in cerebral cortex supernatants in a reaction mixture consisting of 60 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 7 mM phosphocreatine, 9 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.625 mM lauryl maltoside and approximately 0.4–1.2  $\mu\text{g}$  protein in a final volume of 100  $\mu\text{L}$ . After 10 min of pre-incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ , the reaction was started by the addition of 0.3  $\mu\text{mol}$  ADP. The reaction was stopped after 10 min by the addition of 1  $\mu\text{mol}$  of *p*-hydroxymercuribenzoic acid. The creatine formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes (1962) with slight modifications as described previously (da Silva et al., 2004). The color was developed by the addition of 100  $\mu\text{L}$  2%  $\alpha$ -naphthol and 100  $\mu\text{L}$  0.05% diacetyl in a final volume of 1 mL and read spectrophotometrically at 540 nm after 20 min. Results were expressed as  $\mu\text{mol}$  creatine/min/mg protein.

#### 4.7. Citric acid cycle (CAC) enzyme activities

The activity of succinate: phenazine oxidoreductase (soluble succinate dehydrogenase, SDH) was determined as described by Sorensen and Mahler (1982), whereas the activities of NAD-specific isocitrate dehydrogenase (isocitric acid dehydrogenase, ICDH) and citrate synthase (CS) were accessed by the methods of Plaut (1969) and Shepherd and Garland (1969), respectively. SDH, ICDH and CS activities were measured in cortical homogenates and were calculated as nmol/min/mg protein.

#### 4.8. Oxygen consumption

The rate of oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type electrode in a thermostatically controlled ( $37^{\circ}\text{C}$ ) and magnetically stirred incubation chamber of 1.0 mL capacity. The assay was performed in mitochondrial preparations (0.75 mg/mL protein) incubated in a buffer containing 0.3 M sucrose, 5 mM MOPS, 5 mM potassium phosphate, 1 mM EGTA and 0.1% BSA, in the presence of pyruvate/malate (2.5 mM each) as substrates. State 3 mitochondrial respiration was measured after addition of 1 mM ADP to the incubation medium. In order to measure state 4 mitochondrial respiration, 1  $\mu\text{M}$  oligomycin A was added to the incubation medium. The respiratory control ratio (RCR; state 3/state 4) was then calculated. States 3 and 4 were expressed as nmol  $\text{O}_2$  consumed/min/mg of protein. Only mitochondrial preparations with RCR higher than 4 were used in the experiments.

#### 4.9. $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity

The reaction mixture for the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase assay contained 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 40 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, and purified synaptic membranes (approximately 3  $\mu\text{g}$  of protein) in a final volume of 200  $\mu\text{L}$ . The enzymatic assay occurred at 37 °C during 5 min and started by the addition of ATP (disodium salt, vanadium free) to a final concentration of 3 mM. The reaction was stopped by the addition of 200  $\mu\text{L}$  of 10% trichloroacetic acid.  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase ouabain-insensitive was assayed under the same conditions with the addition of 1 mM ouabain.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity was calculated by the difference between the two assays (Tsakiris and Deliconstantinos, 1984). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan et al. (1986). Enzyme-specific activities were expressed as nmol Pi released/min/mg protein.

#### 4.10. Protein determination

Protein content was measured by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as standard.

#### 4.11. Statistical analysis

Data were expressed as means  $\pm$  SEM for absolute values or percentage of control. Assays were performed in duplicate or triplicate and the mean or median was used for statistical analysis. Results were assessed with a computerized statistical program (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS) on an IBM-compatible PC. Comparisons between mean values were calculated using the unpaired Student's *t* tests. Differences between the groups were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

### Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq, PROPESQ/UFRGS and FINEP research grant Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00.

### REFERENCES

- Benari, Y., 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid — mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14, 375–403.
- Bohnhorst, B., Geuting, T., Peter, C.S., Dordelmann, M., Wilken, B., Poets, C.F., 2004. Randomized, controlled trial of oral creatine supplementation (not effective) for apnea of prematurity. *Pediatrics* 113, e303–7.
- Brustovetsky, N., Brustovetsky, T., Dubinsky, J.M., 2001. On the mechanisms of neuroprotection by creatine and phosphocreatine. *J. Neurochem.* 76, 425–434.
- Chace, D.H., Kalas, T.A., Naylor, E.W., 2003. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin. Chem.* 49, 1797–1817.
- Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375–380.
- Choi, D.W., Rothman, S.M., 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic–ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 13, 171–182.
- Cousin, M.A., Nicholls, D.G., Pocock, J.M., 1995. Modulation of ion gradients and glutamate release in cultured cerebellar granule cells by ouabain. *J. Neurochem.* 64, 2097–2104.
- da Silva, C.G., Ribeiro, C.A.J., Leipnitz, G., Dutra, C.S., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M.D., Sarkis, J.J.F., Jakobs, C., Wajner, M., 2002. Inhibition of cytochrome c oxidase activity in rat cerebral cortex and human skeletal muscle by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1586, 81–91.
- da Silva, C.G., Bueno, A.R.F., Schuck, P.F., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A.J., Rosa, R.B., Dutra, C.S., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., 2004. Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Neurochem. Int.* 44, 45–52.
- Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M., Gassen, E., Candiago, R., Wilhelms, A., de Malfussi, H.F., 1995. 2-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate inhibit  $\text{CO}_2$  formation from labeled substrates by rat cerebral cortex. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 228S.
- Erecinska, M., Silver, I.A., 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 43, 37–71.
- Erecinska, M., Cherian, S., Silver, I.A., 2004. Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog. Neurobiol.* 73, 397–445.
- Fischer, A.Q., Challa, V.R., Burton, B.K., McLean, W.T., 1981. Cerebellar hemorrhage complicating isovaleric acidemia: a case report. *Neurology* 31, 746–748.
- Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M.F., Veerkamp, J.H., Stadhouders, A.M., Sengers, R.C.A., Janssen, A.J.M., 1985. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin. Chim. Acta* 153, 23–36.
- Grisar, T., 1984. Glial and neuronal  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  pump in epilepsy. *Ann. Neurol.* 16, S128–S134.
- Hughes, B.P., 1962. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin. Chim. Acta* 7, 597–603.
- Jones, D.H., Matus, A.I., 1974. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation–sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta* 356, 276–287.
- Kay, L., Nicolay, K., Wieringa, B., Saks, V., Wallimann, T., 2000. Direct evidence for the control of mitochondrial respiration by mitochondrial creatine kinase in oxidative muscle cells in situ. *J. Biol. Chem.* 275, 6937–6944.
- Kurella, E., Kukley, M., Tyulina, O., Dobrota, D., Matejovicova, M., Mezesova, V., Boldyrev, A., 1997. Kinetic parameters of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase modified by free radicals in vitro and in vivo. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 834, 661–665.
- Lee, Y.W., Lee, D.H., Vockley, J., Kim, N.D., Lee, Y.K., Ki, C.S., 2007. Different spectrum of mutations of isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVD) gene in Korean patients with isovaleric acidemia. *Mol. Genet. Metab.* 92, 71–77.
- Lees, G.J., 1991. Inhibition of sodium-potassium ATPase — a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res. Rev.* 16, 283–300.
- Lees, G.J., 1993. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 54, 287–322.
- Lees, G.J., Leong, W., 1995. The sodium–potassium ATPase inhibitor ouabain is neurotoxic in the rat substantia nigra and striatum. *Neurosci. Lett.* 188, 113–116.
- Lees, G.J., Lehmann, A., Sandberg, M., Hamberger, A., 1990. The neurotoxicity of ouabain, a sodium–potassium ATPase inhibitor in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 120, 159–162.

- Lin, W.D., Wang, C.H., Lee, C.C., Lai, C.C., Tsai, Y., Tsai, F.J., 2007. Genetic mutation profile of isovaleric acidemia patients in Taiwan. *Mol. Genet. Metab.* 90, 6.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Matthews, R.T., Yang, L.C., Jenkins, B.G., Ferrante, R.J., Rosen, B.R., Kaddurah-Daouk, R., Beal, M.F., 1998. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 18, 156–163.
- Meyer, L.E., Machado, L.B., Santiago, A.P., da-Silva, W.S., De Felice, F.G., Holub, O., Oliveira, M.F., Galina, A., 2006. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J. Biol. Chem.* 281, 37361–37371.
- O'Gorman, E., Beutner, G., Dolder, M., Koretsky, A.P., Brdiczka, D., Wallimann, T., 1997. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 414, 253–257.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Vol. Academic Press, San Diego.
- Plaut, G.W.E., 1969. Isocitrate dehydrogenase from bovine heart. *Methods Enzymol.* 13, 34–42.
- Renkawek, K., Renier, W.O., Depont, J., Vogels, O.J.M., Gabreels, F.J.M., 1992. Neonatal status convulsivus, spongiform encephalopathy, and low activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the brain. *Epilepsia* 33, 58–64.
- Ribeiro, C.A.J., Grando, V., Dutra, C.S., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., 2006. Evidence that quinolinic acid severely impairs energy metabolism through activation of NMDA receptors in striatum from developing rats. *J. Neurochem.* 99, 1531–1542.
- Ribeiro, C.A.J., Balestro, F., Grando, V., Wajner, M., 2007. Isovaleric acid reduces Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27, 529–540.
- Rosenthal, R.E., Hamud, F., Fiskum, G., Varghese, P.J., Sharpe, S., 1987. Cerebral ischemia and reperfusion — prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7, 752–758.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A., 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* 228, 35–51.
- Satoh, E., Nakazato, Y., 1992. On the mechanism of ouabain-induced release of acetylcholine from synaptosomes. *J. Neurochem.* 58, 1038–1044.
- Schapira, A.H.V., Mann, V.M., Cooper, J.M., Dexter, D., Daniel, S.E., Jenner, P., Clark, J.B., Marsden, C.D., 1990. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (Complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 55, 2142–2145.
- Schulze, A., Lindner, M., Kohlmuller, D., Olgemoller, K., Mayatepek, E., Hoffmann, G.F., 2003. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization–tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* 111, 1399–1406.
- Sestili, P., Martinelli, C., Bravi, G., Piccoli, G., Curci, R., Battistelli, M., Falcieri, E., Agostini, D., Gioacchini, A.M., Stocchi, V., 2006. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Rad. Biol. Med.* 40, 837–849.
- Shepherd, D., Garland, P.B., 1969. Citrate synthase from rat liver. *Methods Enzymol.* 13, 11–13.
- Sogut, A., Acun, C., Aydin, K., Tomac, N., Demirel, F., Aktuglu, C., 2004. Isovaleric acidemia: cranial CT and MRI findings. *Pediatr. Radiol.* 34, 160–162.
- Solano, A.F., Leipnitz, G., De Bortoli, G.M., Seminotti, B., Amaral, A.U., Fernandes, C.G., Latini, A.S., Dutra, C.S., Wajner, M., 2008. Induction of oxidative stress by the metabolites accumulating in isovaleric acidemia in brain cortex of young rats. *Free Radic. Res.* 42, 707–715.
- Sorensen, R.G., Mahler, H.R., 1982. Localization of endogenous ATPases in the nerve terminal. *J. Bioenerg. Biomembr.* 14, 527–547.
- Swadner, K.J., 1979. Two molecular forms of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. *Biol. Chem.* 254, 6060–6067.
- Sweetman, L., Williams, J.C., 2001. Disorders of branched-chain amino acid and organic acid metabolism, In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Ed. McGraw-Hill, New York, pp. 2125–2159.
- Tanaka, K., 1990. Isovaleric acidemia: personal history, clinical survey and study of the molecular basis. *Prog. Clin. Biol. Res.* 321, 273–290.
- Tanaka, K., Isselbacher, K., 1967. Isolation and identification of N-isovalerylglycine from urine of patients with isovaleric acidemia. *J. Biol. Chem.* 242, 2966–2972.
- Tanaka, K., Budd, M.A., Efron, M.L., Isselbacher, K.J., 1966. Isovaleric acidemia — a new genetic defect of leucine metabolism. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 56, 236–242.
- Tanaka, K., West-Dull, A., Hine, D.G., Lynn, T.B., Lowe, T., 1980. Gas-chromatographic method of analysis for urinary organic acids. II. Description of the procedure, and its application to diagnosis of patients with organic acidurias. *Clin. Chem.* 26, 1847–1853.
- Tsakiris, S., Deliconstantinos, G., 1984. Influence of phosphatidylserine on (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes. *Biochem. J.* 220, 301–307.
- Vasques, V., Brinco, F., Viegas, C.M., Wajner, M., 2006. Creatine prevents behavioral alterations caused by methylmalonic acid administration into the hippocampus of rats in the open field task. *J. Neurol. Sci.* 244, 23–29.
- Vockley, J., Ensenauer, R., 2006. Isovaleric acidemia: new aspects of genetic and phenotypic heterogeneity. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 142C, 95–103.
- Wheeler, K.P., Walker, J.A., Barker, D.M., 1975. Lipid requirement of membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-dependent adenosine triphosphate system. *Biochem. J.* 146, 713–722.
- Wyse, A.T.D., Streck, E.L., Worm, P., Wajner, A., Ritter, F., Netto, C.A., 2000. Preconditioning prevents the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem. Res.* 25, 971–975.
- Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R., 2000. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* 80, 1107–1213.
- Yang, Y.B., Piao, Y.J., 2003. Effects of resveratrol on secondary damages after acute spinal cord injury in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 24, 703–710.
- Yousef, M.I., El-Hendy, H.A., El-Demerdash, F.M., Elagamy, E.I., 2002. Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. *Toxicology* 175, 223–234.
- Yu, S.P., 2003. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1601–1609.
- Zhu, S., Li, M.W., Figueroa, B.E., Liu, A.J., Stavrovskaya, I.G., Pasinelli, P., Beal, M.F., Brown, R.H., Kristal, B.S., Ferrante, R.J., Friedlander, R.M., 2004. Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in mice. *J. Neurosci.* 24, 5909–5912.
- Zytovicz, T.H., Fitzgerald, E.F., Marsden, D., Larson, C.A., Shih, V.E., Johnson, D.M., Strauss, A.W., Comeau, A.M., Eaton, R.B., Grady, G.F., 2001. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England newborn screening program. *Clin. Chem.* 47, 1945–1955.

## **Capítulo III.**

**Efeitos *in vitro* dos compostos acumulados na acidemia 3-  
metilglutacônica sobre alguns parâmetros do metabolismo energético  
em córtex cerebral de ratos jovens**

### III.1. Introdução

A acidemia 3-metilglutacônica (MGTA) compreende um grupo de desordens metabólicas caracterizadas pela excreção urinária aumentada dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) e 3-metilglutárico (MGA). Cinco formas distintas da MGTA já foram descritas. A MGTA tipo I, causada pela deficiência da atividade da enzima 3-metilglutaconil-CoA hidratase, é um erro inato do catabolismo da leucina e se diferencia dos outros tipos pela excreção aumentada também de ácido 3-hidroxiisovalérico (3-OHIVA). As características clínicas da MGTA tipo I são variáveis e não-específicas, com sintomas mínimos e severos, incluindo atraso na fala e no desenvolvimento da linguagem, com hipoglicemia e acidose metabólica (Sweetman e Williams, 2001). Retardo psicomotor, microcefalia e deterioração neurológica progressiva, com quadriplegia espástica, convulsões e distonia também foram descritos em vários pacientes (Arn e Funanage, 2006; Di Rosa *et al.*, 2006; IJlst *et al.*, 2002; Shoji *et al.*, 1999). Além disso, tecidos com grande demanda energética, como SNC e músculos esquelético e cardíaco, são predominantemente afetados.

A síndrome de Barth (MGTA tipo II) é uma doença ligada ao cromossomo X, caracterizada por cardiomiopatia dilatada, neutropenia e miopatia esquelética (Barth *et al.*, 2004), possivelmente relacionada à redução no metabolismo da cardiolipina devida a mutações no gene tazafina (Bione *et al.*, 1996). A MGTA tipo III é uma síndrome autossômica recessiva com atrofia óptica bilateral infantil e defeitos neurológicos causados pela mutação no gene OPA3 (Anikster *et al.*, 2001; Arn e Funanage, 2006). Além dessas formas definidas de MGTA, a MGTA tipo IV ou não-classificada é composta por um grupo muito heterogêneo de sintomas, incluindo retardo mental e psicomotor, espasticidade, hipertonia, hipotonia, convulsões, atrofia óptica, surdez, cardiomiopatia e disfunção hepática. Os pacientes apresentam elevação nas

concentrações de ácido láctico e intermediários do ciclo de Krebs, bem como defeitos na cadeia de transporte de elétrons (Besley *et al.*, 1995; Ibel *et al.*, 1993; Ruesch *et al.*, 1996), tais como diminuição das atividades dos complexos I, II, III, IV e V (Gibson *et al.*, 1993; Gunay-Aygun, 2005; Sperl *et al.*, 2006; Sweetman e Williams, 2001; Wortmann *et al.*, 2006), sugerindo disfunção mitocondrial. O MGT e o MGA se encontram predominantemente acumulados na MGTA tipo IV. Por outro lado, a deficiência enzimática que leva a essa condição não é conhecida.

Apesar dos pacientes afetados pela MGTA apresentarem principalmente sintomas neurológicos, os mecanismos envolvidos no dano cerebral nessa doença ainda não estão bem estabelecidos. Neste contexto, resultados recentes demonstraram que o MGT, MGA e 3-OHIVA induzem a produção de espécies ativas (Leipnitz *et al.*, 2008a; Leipnitz *et al.*, 2009). Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos *in vitro* do MGT e MGA sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

## **III.2. Material e Métodos**

### *III.2.1. Reagentes*

Todos os reagentes foram obtidos da SigmaChemical Co., St. Louis, MO, USA, a exceção da [U-<sup>14</sup>C]glicose, que foi obtida da Amersham Internacional, UK, e do MGT, que foi sintetizado pelo Dr. Ernesto Brunet com 99% de pureza (Universidade Autonoma de Madri, Espanha).

### *III.2.2. Animais*

Ratos Wistar de 30 dias de vida obtidos do Biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS foram utilizados. Os ratos tinham livre acesso à água e



ração comercial padrão e foram mantidos em ciclo de 12:12 h de claro/escuro em sala de temperatura controlada ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ). Todos os experimentos foram realizados de acordo com “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85-23, revised 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### *III.2.3. Preparação do Córtex Cerebral*

Os ratos foram sacrificados por decapitação, o cérebro rapidamente removido e o córtex cerebral homogeneizado em tampões específicos de cada técnica. Para a produção de  $\text{CO}_2$  o córtex cerebral foi homogeneizado (1:10, p/v) em tampão Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7.4. Para a determinação das atividades dos complexos I-III, II, II-III e IV da cadeia de transporte de elétrons e da enzima creatina quinase o córtex cerebral foi homogeneizado (1:20, p/v) em tampão SETH pH 7.4 (sacarose 250 mM, EDTA 2,0 mM, Trizma Base 10 mM e heparina UI  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ). Os homogeneizados foram centrifugados a  $800 \times g$  durante 10 min e os sobrenadantes armazenados a  $-70^\circ\text{C}$  até sua utilização para determinação das atividades enzimáticas.

Para determinação dos parâmetros respiratórios foram utilizadas preparações mitocondriais obtidas de acordo com Rosenthal e colaboradores (1987) com algumas modificações. Os animais foram sacrificados por decapitação, seu cérebro foi rapidamente removido e colocado em tampão de isolamento (manitol 225 mM, sacarose 75 mM, EGTA 1 mM, albumina sérica bovina livre de ácidos graxos 0,1%, HEPES 10 mM, pH 7,2, e 5 mg de protease). O cérebro foi cortado em pedaços pequenos e homogeneizado manualmente. O homogeneizado foi centrifugado por 3 minutos a  $2000 \times g$ . Após a centrifugação, o sobrenadante foi novamente centrifugado por 8 minutos a  $12.000 \times g$ . O sedimento obtido foi então ressuspensionado em 20 mL de tampão de

isolamento contendo 10  $\mu$ L de digitonina 10% e centrifugado novamente por 8 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento final foi gentilmente lavado e ressuspendido em tampão de isolamento desprovido de EGTA, em uma concentração de proteínas de aproximadamente 15-20 mg/mL. Essa preparação resulta em uma mistura de mitocôndrias sinaptossomais e não-sinaptossomais similar à composição cerebral.

Os parâmetros bioquímicos foram determinados na presença de várias concentrações de MGT (0,1-5 mM) ou MGA (0,1-10 mM), enquanto que o grupo controle não continha nenhum desses ácidos orgânicos no meio de incubação.

#### *III.2.4. Preparação da membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos*

O córtex cerebral foi homogeneizado 1:10 (p/v) em uma solução tampão (HEPES 5,0 mM e EDTA 1,0 mM), pH 7,4. As membranas plasmáticas sinápticas foram preparadas de acordo com o método de Jones e Matus (1974), usando-se gradiente de densidade descontínuo de sacarose constituído de sucessivas camadas de sacarose a 0,3, 0,8 e 1 mM. Após centrifugação a 69.000 x g por 2 h a 4°C, a fração na interface de sacarose entre 0,8-1 mM foi removida e utilizada como preparação de membranas plasmáticas sinápticas. Em alguns experimentos, homogeneizados de córtex cerebral foram pré-incubados a 37°C durante 1 hora na presença de MGT (0,1-5 mM) ou MGA (0,1-10 mM) e então as membranas plasmáticas foram isoladas.

#### *III.2.5. Produção de CO<sub>2</sub>*

A produção de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> foi medida utilizando-se a D-[U-<sup>14</sup>C] glicose como substrato. Um volume de 450  $\mu$ L de homogeneizado de córtex cerebral, preparado na proporção 1:10 (p/v), utilizando-se tampão Krebs-Ringer bicarbonato de pH 7,4, foi pré-incubado na presença de MGT (0,1-5 mM) ou MGA (0,1-10 mM), exceto nos

controles, durante 15 minutos a 35°C em banho metabólico com agitação. Após a pré-incubação, foi adicionado ao meio de incubação 5 mM de glicose fria contendo 0,05 µCi de D-[U-<sup>14</sup>C] glicose. Os frascos foram fechados com tampas de borracha contendo poços de vidro com papel filtro dobrado em forma de “W”, vedados com Parafilm M e devolvidos ao banho. Transcorrida 1 hora de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 0,1 mL de TCA 50% ao homogeneizado. Foram adicionados então 0,1 mL de hidróxido de benzetônio no centro dos poços de vidro com auxílio de seringas. Os frascos foram devolvidos ao banho por 30 minutos para que o <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fosse incorporado ao papel filtro impregnado com hidróxido de benzetônio. Os papéis filtro foram então removidos e colocados em tubos plásticos contendo líquido de cintilação e a radioatividade contada. Os resultados foram calculados como nmol de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> / h / mg de proteínas.

### *III.2.6. Determinação das atividades dos complexos da cadeia de transporte de elétrons.*

As atividades da succinato-2,6-diclorofenolindofenol (DCIP)-oxidoreductase (complexo II) e succinato:citocromo c oxidoreductase (complexo II-III) foram determinadas em homogeneizados de córtex cerebral de acordo com Fischer e colaboradores (1985). A atividade da NADH:citocromo c oxidoreductase sensível à rotenona (complexo I-III) foi determinada de acordo com Schapira e colaboradores (1990) e a da citocromo c oxidase (complexo IV) determinada de acordo com Rustin e colaboradores (1994). Os métodos descritos para medida dessas atividades foram ligeiramente modificados, como descrito em detalhes em um trabalho anterior (da Silva *et al.*, 2002). As atividades dos complexos da cadeia de transporte de elétrons foram calculadas como nmol / min / mg de proteínas.

### III.2.7. Atividade da Creatina Quinase

A atividade da creatina quinase (CK) foi medida em homogeneizado de córtex cerebral de acordo com Hughes (1962) com algumas modificações (Schuck *et al.*, 2002). A mistura reacional foi composta de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, fosfocreatina 7 mM, lauril maltosídeo 0,625 mM e aproximadamente 0,4-1,2 µg de proteína em um volume final de 100 µL. Os metabólitos MGT (0,1-5 mM) e MGA (0,1-10 mM) foram adicionados ao meio de incubação e submetidos à pré-incubação por 30 minutos a 37°C. A reação foi iniciada com a adição de ADP (4 mM) e parada após 10 minutos com a adição de 0,02 mL de ácido p-hidroximercuribenzóico (50 mM). A creatina formada foi estimada de acordo com o método colorimétrico de Hughes (1962). A reação de cor foi obtida pela adição de 0,1 mL de α-naftol 20% e 0,1 mL de diacetil 20% em um volume final de 1 mL seguida de incubação por 20 minutos em banho-maria a 37°C. A coloração rósea foi lida espectrofotometricamente a 540 nm. Os resultados foram expressos como µmol de creatina / min / mg de proteínas.

### III.2.8. Atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

A mistura reacional para determinação da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase consistiu de MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 80 mM, KCl 20 mM, tampão Tris-HCl 40 mM, pH 7,4 e as membranas plasmáticas purificadas (aproximadamente 3µg de proteínas) em um volume final de 0,2 mL. Os ácidos MGT (0,1-5 mM) e MGA (0,1-10 mM) foram adicionados ao meio de incubação e submetidos à pré-incubação por 30 minutos a 37°C. O ensaio enzimático ocorreu durante 5 minutos e se iniciou com a adição de ATP em uma concentração final de 3 mM. A reação foi interrompida com a adição de 0,2 mL de TCA 10 %. A atividade Mg<sup>2+</sup>-ATPase insensível a ouabaína foi determinada nas mesmas condições com a adição de 1 mM de ouabaína ao meio de reacional. A

atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi calculada pela diferença entre as duas atividades (Tsakiris e Deliconstantinos, 1984). A liberação do fosfato inorgânico (Pi) foi medida pelo método de Chan (1986). A atividade enzimática específica foi expressa como nmol de Pi / min / mg de proteínas.

### *III.2.9. Determinação do conteúdo protéico*

O conteúdo protéico das amostras foi determinado pelo método de Lowry e colaboradores (1951) usando albumina sérica bovina como padrão.

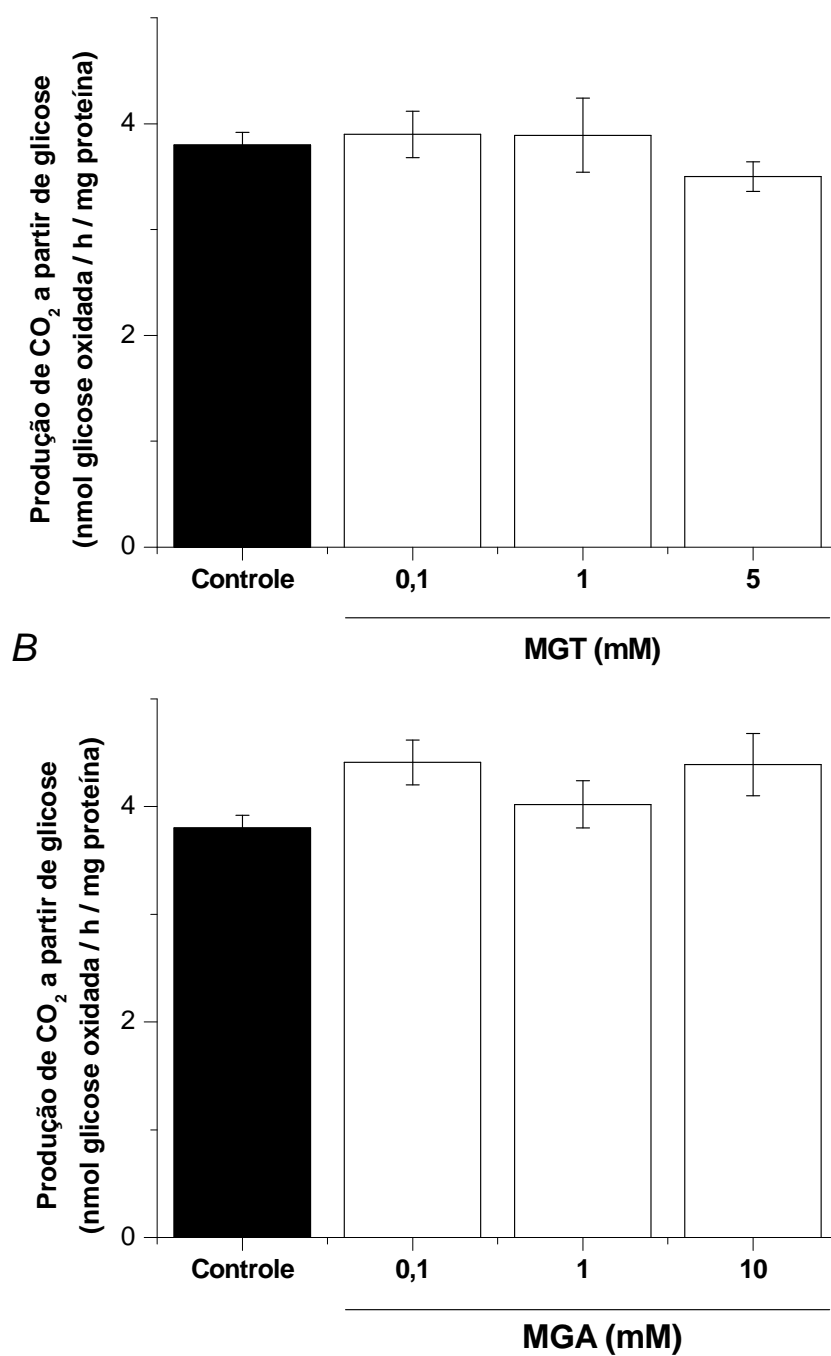
### *III.2.10. Análise estatística*

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Duncan quando o valor de F for significativo. A análise estatística foi realizada através do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*).

### III.3. Resultados

#### III.3.1 Efeito *in vitro* dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) e 3-metilglutárico (MGA) sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de [U-<sup>14</sup>C]glicose em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

A figura III.3.1 (painel A) mostra que o MGT em concentrações tão altas quanto 5 mM, não alterou significativamente a produção de CO<sub>2</sub> em homogeneizado de córtex cerebral de ratos [ $F_{(3,19)}= 0,682$ ;  $P=0,576$ ]. Da mesma maneira, o MGA, em concentrações tão altas quanto 10 mM, não alterou significativamente a produção de CO<sub>2</sub> em homogeneizado de córtex cerebral de ratos [ $F_{(3,19)}=1,839$ ;  $P=0,181$ ] (Figura III.3.1.1 (painel B)).



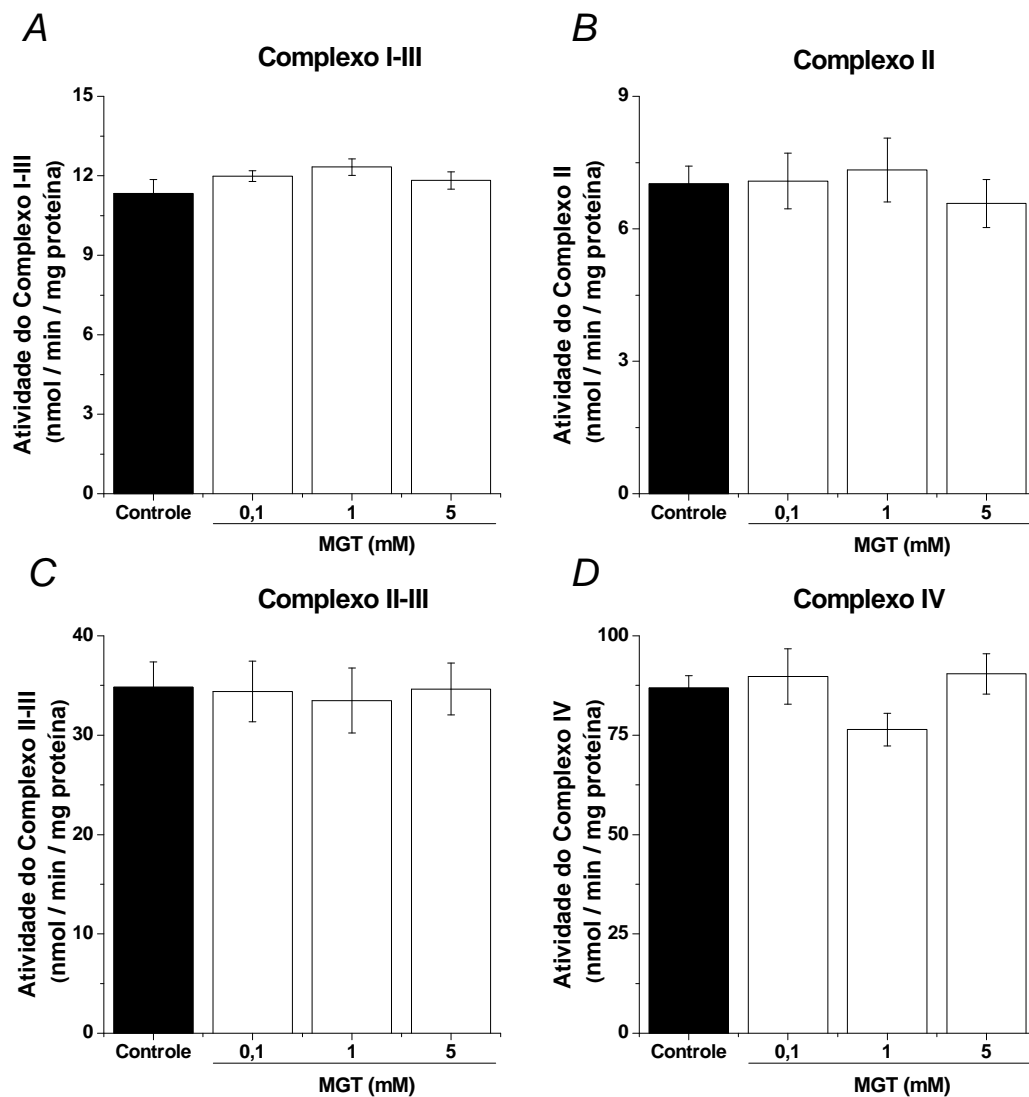
**Figura III.3.1.** Efeito *in vitro* dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) e 3-metilglutárico (MGA) sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de [U-<sup>14</sup>C]glicose em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os valores representam média ± erro padrão da média (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

### **III.3.2. Efeito *in vitro* dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) e 3-metilglutárico (MGA) sobre a atividade dos complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens**

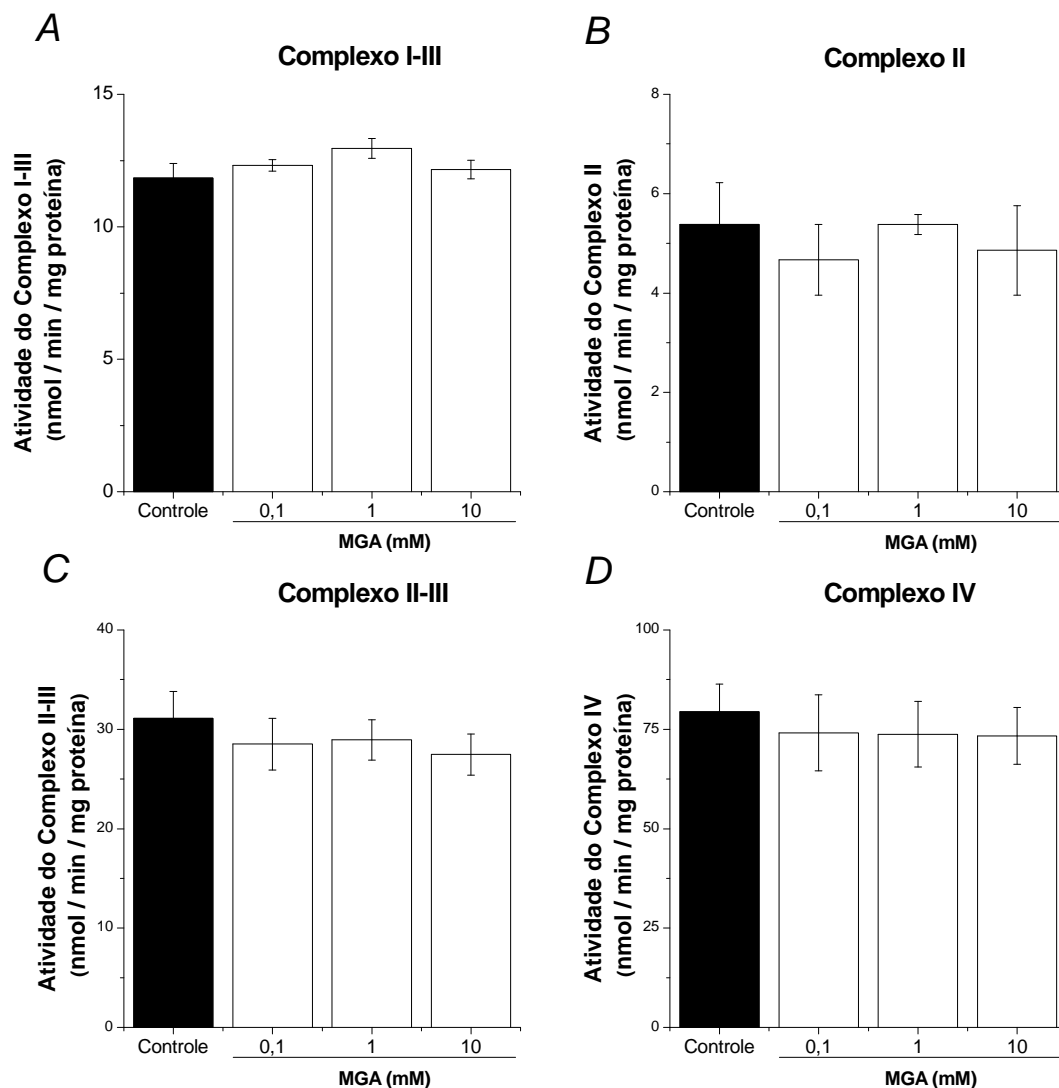
A figura III.3.2 mostra que o MGT em concentrações de 0,1-5 mM, não alterou significativamente a atividade dos complexos I-III (painel A) [ $F_{(3,23)}=1,308$ ;  $P = 0,300$ ], II (painel B) [ $F_{(3,19)}=0,290$ ;  $P = 0,832$ ], II-III (painel C) [ $F_{(3,23)}=0,043$ ;  $P = 0,988$ ] e IV (painel D) [ $F_{(3,23)}=1,667$ ;  $P = 0,206$ ] da cadeia de transporte de elétrons em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.

Da mesma maneira, observamos na figura III.3.3 que o MGA, em concentrações variando entre 0,1-10 mM, não alterou a atividade dos complexos I-III (painel A) [ $F_{(3,23)}=1,432$ ;  $P = 0,263$ ], II (painel B) [ $F_{(3,15)}=0,223$ ;  $P = 0,879$ ], II-III (painel C) [ $F_{(3,15)}=0,421$ ;  $P = 0,741$ ] e IV (painel D) [ $F_{(3,15)}=0,127$ ;  $P = 0,942$ ] da cadeia de transporte de elétrons em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.





**Figura III.3.2.** Efeito *in vitro* do ácido 3-metilglutacônico (MGT) sobre a atividade dos complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5-6$ ). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

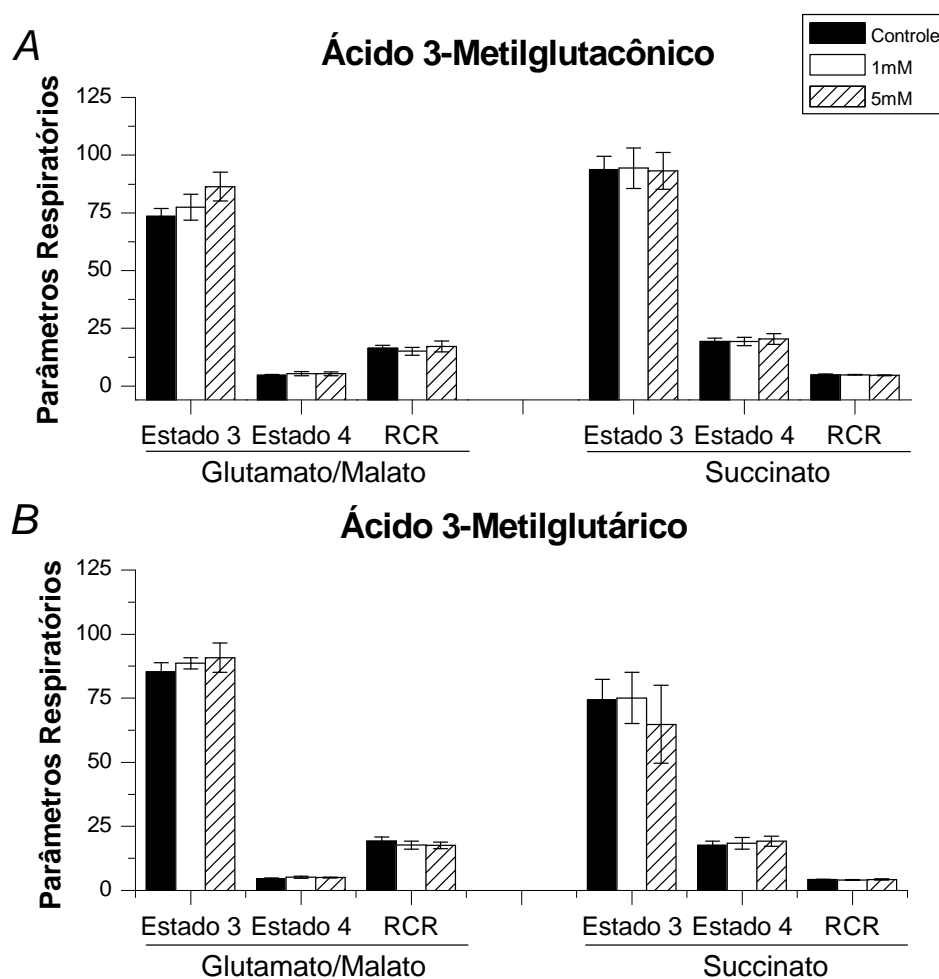


**Figura III.3.3.** Efeito *in vitro* do ácido 3-metilglutárico (MGA) sobre a atividade dos complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=4-6$ ). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

### III.3.3. Efeito *in vitro* dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) e 3-metilglutárico (MGA) sobre os parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de córtex cerebral de ratos jovens

A figura III.3.4 mostra que o MGT em concentrações de 0,1-5 mM (painel A) não alterou o estado 3, o estado 4, bem como a razão de controle respiratório (RCR) quando utilizamos tanto glutamato/malato (GM) quanto succinato (SUC) como substratos para a respiração mitocondrial (Estado 3: GM =  $[F_{(2,11)}=1,616; P = 0,251]$ , SUC =  $[F_{(2,11)}=0,006; P = 0,994]$ ; Estado 4: GM =  $[F_{(2,11)}=0,397; P = 0,683]$ , SUC =  $[F_{(2,11)}=0,122; P = 0,887]$ ; RCR: GM =  $[F_{(2,11)}=0,357; P = 0,709]$ , SUC =  $[F_{(2,11)}=0,904; P = 0,439]$ ).

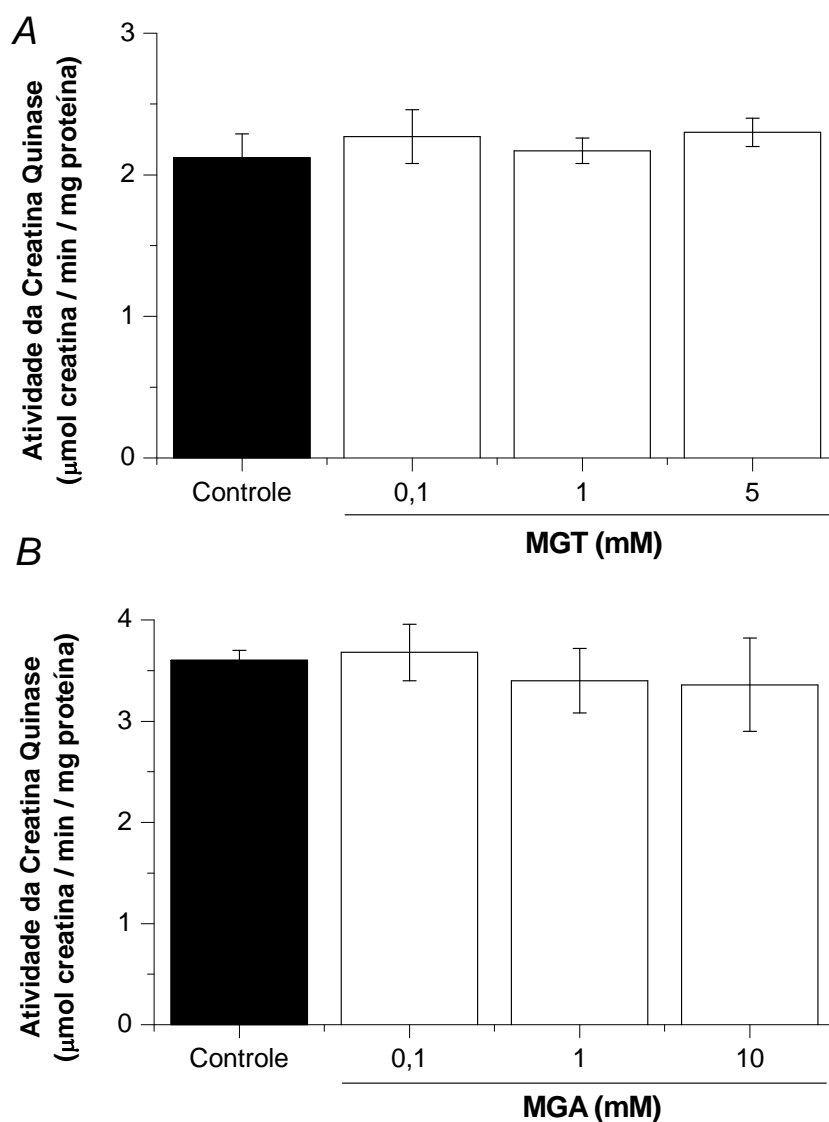
Da mesma maneira, observamos que o MGA (0,1-5 mM, painel B), não alterou os estados 3 e 4 bem como o (RCR), quando utilizamos tanto GM quanto SUC como substratos para a respiração mitocondrial (Estado 3: GM =  $[F_{(2,14)}=0,47; P = 0,640]$ , SUC =  $[F_{(2,17)}=0,250; P = 0,780]$ ; Estado 4: GM =  $[F_{(2,14)}=1,250; P = 0,320]$ , SUC =  $[F_{(2,17)}=0,180; P = 0,840]$ ; RCR: GM =  $[F_{(2,14)}=0,410; P = 0,670]$ , SUC =  $[F_{(2,17)}=0,350; P = 0,710]$ ).



**Figura III.3.4.** Efeito *in vitro* dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT, painel A) e 3-metilglutárico (MGA, painel B) sobre os parâmetros respiratórios (estado 3, estado 4 e razão de controle respiratório (RCR) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média (n=5-6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

### **III.3.4. Efeito *in vitro* dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) e 3-metilglutárico (MGA) sobre a atividade da enzima creatina quinase (CK total) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens**

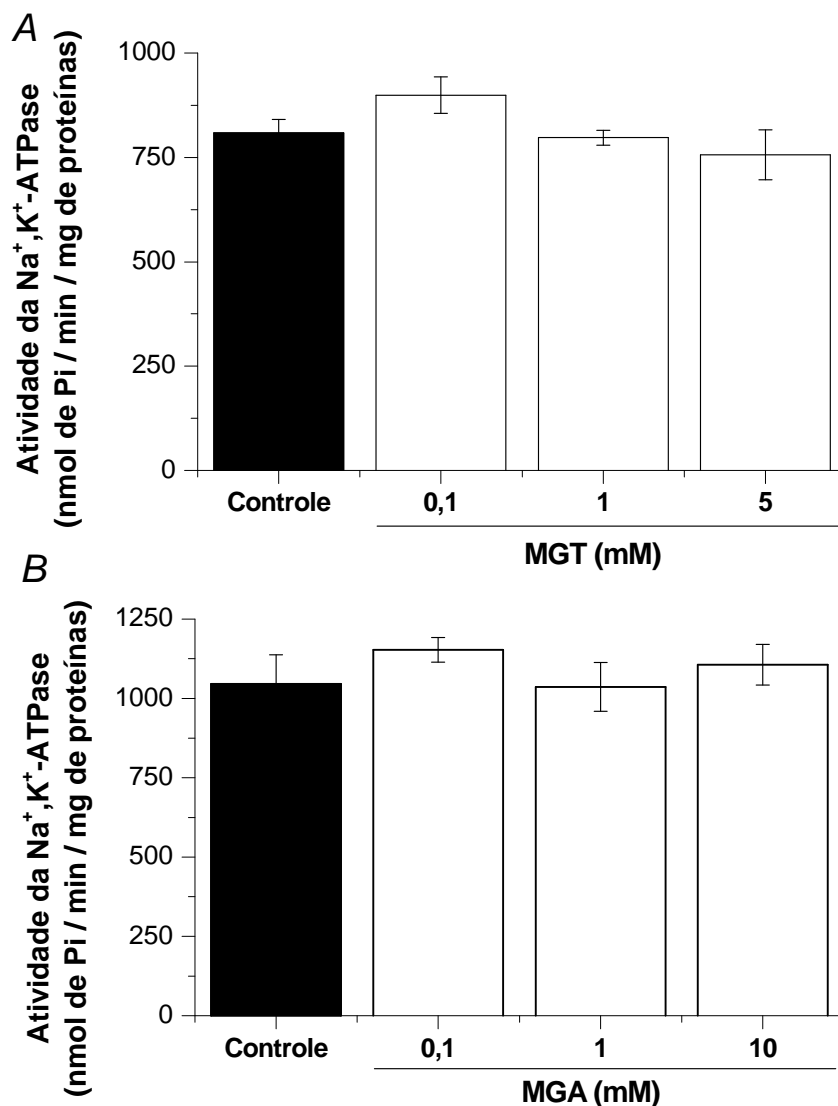
A figura III.3.5 (painel A) mostra que o MGT nas concentrações de 0,1, 1 e 5 mM não exerceu nenhum efeito significativo sobre a atividade da enzima creatina quinase (CK) [ $F_{(3,19)} = 0,349$ ;  $P = 0,791$ ]. Da mesma maneira, o painel B mostra que o MGA, nas concentrações de 0,1, 1 e 10 mM, não provocou nenhum efeito significativo sobre a atividade da enzima CK [ $F_{(3,23)} = 0,251$ ;  $P = 0,860$ ].



**Figura III.3.5.** Efeito *in vitro* dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT, painel A) e 3-metilglutárico (MGA, painel B) sobre a atividade da enzima creatina quinase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5-6$ ). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

### **III.3.5. Efeito *in vitro* dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) e 3-metilglutárico (MGA) sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral ratos jovens**

A figura III.3.6 mostra que o MGT (painel A) nas concentrações de 0,1, 1 e 5 mM não exerceu nenhum efeito sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas isoladas de córtex cerebral de ratos jovens [ $F_{(3,19)}=1,253$ ;  $P=0,324$ ]. Além disso, o painel B demonstra que o MGA, nas concentrações de 0,1, 1 e 10 mM [ $F_{(3,19)}=0,605$ ;  $P=0,621$ ] não alterou a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

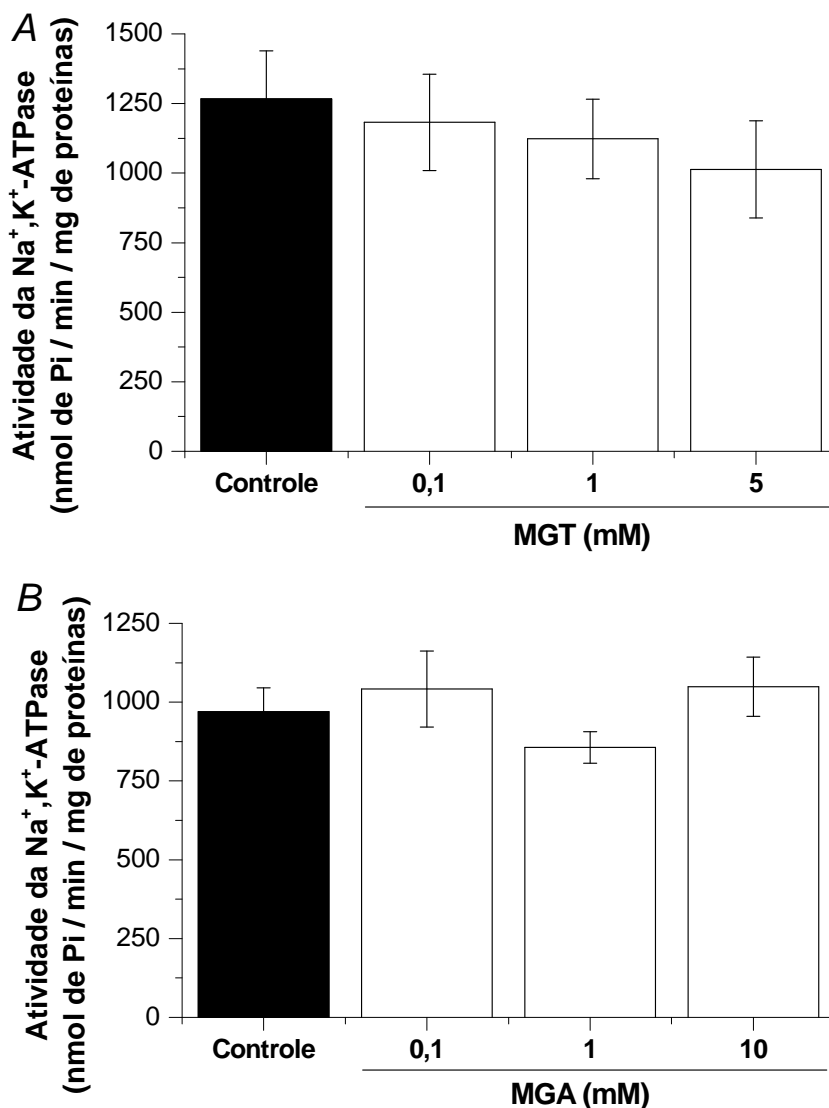


**Figura III.3.6.** Efeito *in vitro* dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT, painel A) e 3-metilglutárico (MGA, painel B) sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas isoladas de córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média ± erro padrão da média (n=5-6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.



**III.3.6. Efeito *in vitro* dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) e 3-metilglutárico (MGA) sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens quando pré-incubados durante 1 hora a 37°C**

A figura III.3.7 mostra que o MGT (painel A) quando pré-incubados durante 1 hora a 37°C nas concentrações de 0,1, 1 e 5 mM não exerceu nenhum efeito sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens [ $F_{(3,15)}=0,407$ ;  $P=0,751$ ]. Além disso, o painel B demonstra que o MGA, quando pré-incubados durante 1 hora a 37°C nas concentrações de 0,1, 1 e 10 mM [ $F_{(3,23)}=1,004$ ;  $P=0,411$ ] não alterou a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.



**Figura III.3.7.** Efeito *in vitro* dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT, painel A) e 3-metilglutárico (MGA, painel B) sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens quando pré-incubados durante 1 hora a 37°C. Os valores representam média ± erro padrão da média (n=5-6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

### **III.4. Discussão**

A discussão dos resultados presentes neste capítulo está contida no final desta tese no tópico “Discussão” (parte III).

## **Capítulo IV.**

**Efeitos *in vitro* e da administração intracerebroventricular do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens**

#### IV.1. Introdução

A acidemia 3-hidróxi-3-metilglutárica (HMGA, OMIM # 246450) é uma acidemia orgânica causada pela deficiência da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA liase (HL, EC 4.1.3.4), que participa no catabolismo da leucina e também na cetogênese. A apresentação clínica da HMGA ocorre durante o primeiro ano de vida. Os episódios agudos são comuns e caracterizados por vômitos, hipotonia, taquipnéia, convulsões, letargia às vezes progressiva à coma, acidose metabólica com hipoglicemia hipocetótica, hiperamonemia variável e elevação das transaminases plasmáticas com hepatomegalia (Funghini *et al.*, 2001; Sweetman e Williams, 2001; Vargas *et al.*, 2007; Zafeiriou *et al.*, 2007). Os pacientes afetados também apresentam macrocefalia e atraso no desenvolvimento físico e psicomotor (Funghini *et al.*, 2001; Gibson *et al.*, 1988; Gibson *et al.*, 1994; Pospisilova *et al.*, 2003; Wysocki e Hahnel, 1976; Zafeiriou *et al.*, 2007).

A HMGA é caracterizada bioquimicamente por acúmulo tecidual e elevada excreção urinária do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG), bem como dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT), 3-metilglutárico (MGA) e 3-hidroxiisovalérico (3-OHIVA) e também de 3-metilcrotonilglicina (Bonafe *et al.*, 2000; Sweetman e Williams, 2001). Durante a descompensação metabólica podem também ser encontrados na urina em concentrações elevadas os ácidos glutárico, láctico, adípico e outros ácidos dicarboxílicos (Gibson *et al.*, 1988). Crises recorrentes ocorrem especialmente após jejum prolongado e infecções caracterizadas por aumento no catabolismo.

As alterações mais comuns encontradas em imagens de ressonância magnética envolvem lesões coalescentes múltiplas na substância branca subcortical periventricular, principalmente nas regiões frontal e parietal, que podem ser reversíveis após uma dieta livre de leucina (Zafeiriou *et al.*, 2007). Envolvimento dos núcleos caudado e denteado

é comumente observado em pacientes afetados pela HMGA (van der Knaap *et al.*, 1998; Yalcinkaya *et al.*, 1999; Yilmaz *et al.*, 2006).

Apesar dos pacientes com HMGA apresentarem sintomas neurológicos pronunciados, os mecanismos envolvidos no dano tecidual nessa desordem ainda não estão bem estabelecidos. No entanto, foi recentemente descrito que o HMGA, MGT, MGA e 3-OHIVA induzem dano oxidativo protéico e lipídico e reduzem as defesas antioxidantes não-enzimáticas no córtex cerebral de ratos (Leipnitz *et al.*, 2008a; Leipnitz *et al.*, 2008b). Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos *in vitro* e da administração intracerebroventricular do HMG sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

## **IV.2. Material e Métodos**

O material utilizado e os métodos desenvolvidos neste capítulo, a exceção do procedimento para administração intracerebroventricular que será descrito a seguir, são essencialmente semelhantes aos descritos no capítulo anterior dessa tese.

### *IV.2.1. Administração intracerebroventricular (icv) do HMG*

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (75 e 10 mg/kg, i.p., respectivamente) e colocados em um aparelho estereotáxico. Dois pequenos orifícios foram feitos no crânio para a microinjeção, e 2 µL de uma solução 2.5 M de HMG (pH 7,4 ajustado com NaOH) ou NaCl no mesmo volume e concentração (controles), foi lentamente injetado bilateralmente durante 4 minutos nos ventrículos laterais utilizando-se agulhas conectadas por um tubo de polietileno a uma seringa Hamilton de 10 µL. As agulhas (uma em cada ventrículo) foram mantidas por mais 1 minuto e então suavemente removidas. As coordenadas para injeção foram as seguintes: 0,6 mm

posterior ao bregma, 1,0 mm lateral à linha média e 3,2 mm ventral a partir da dura-máter (Paxinos e Watson, 1986). A posição correta da agulha foi testada através da injeção de 0,5  $\mu$ L de solução de azul de metileno (4% em solução salina) e então realizada a análise histológica. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e foi realizado de acordo com “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85-23, revised 1985).

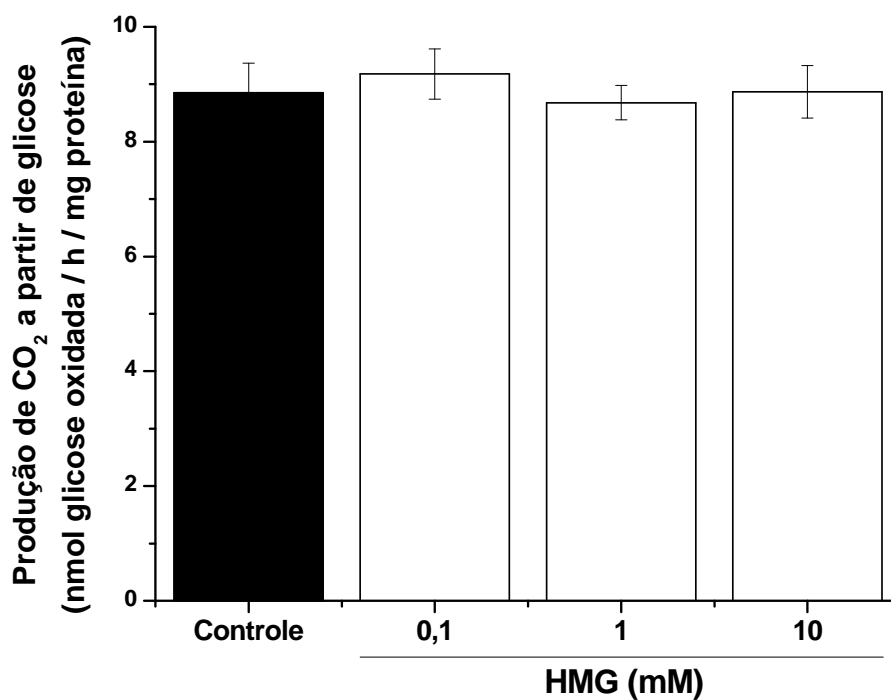
Os animais que receberam administração icv de HMGA ou NaCl foram divididos em grupos e sacrificados 2 ou 24 horas após a injeção. O córtex cerebral foi então dissecado, homogeneizado e utilizado nas determinações bioquímicas conforme descrito no capítulo anterior.

### **IV.3. Resultados - Estudos *in vitro***

#### **IV.3.1 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de [U-<sup>14</sup>C]glicose em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens**

A figura IV.3.1 mostra que o HMG, em concentrações tão altas quanto 10 mM, não alterou significativamente a produção de CO<sub>2</sub> em homogeneizado de córtex cerebral de ratos [ $F_{(3,19)}=0,230$ ;  $P=0,874$ ].

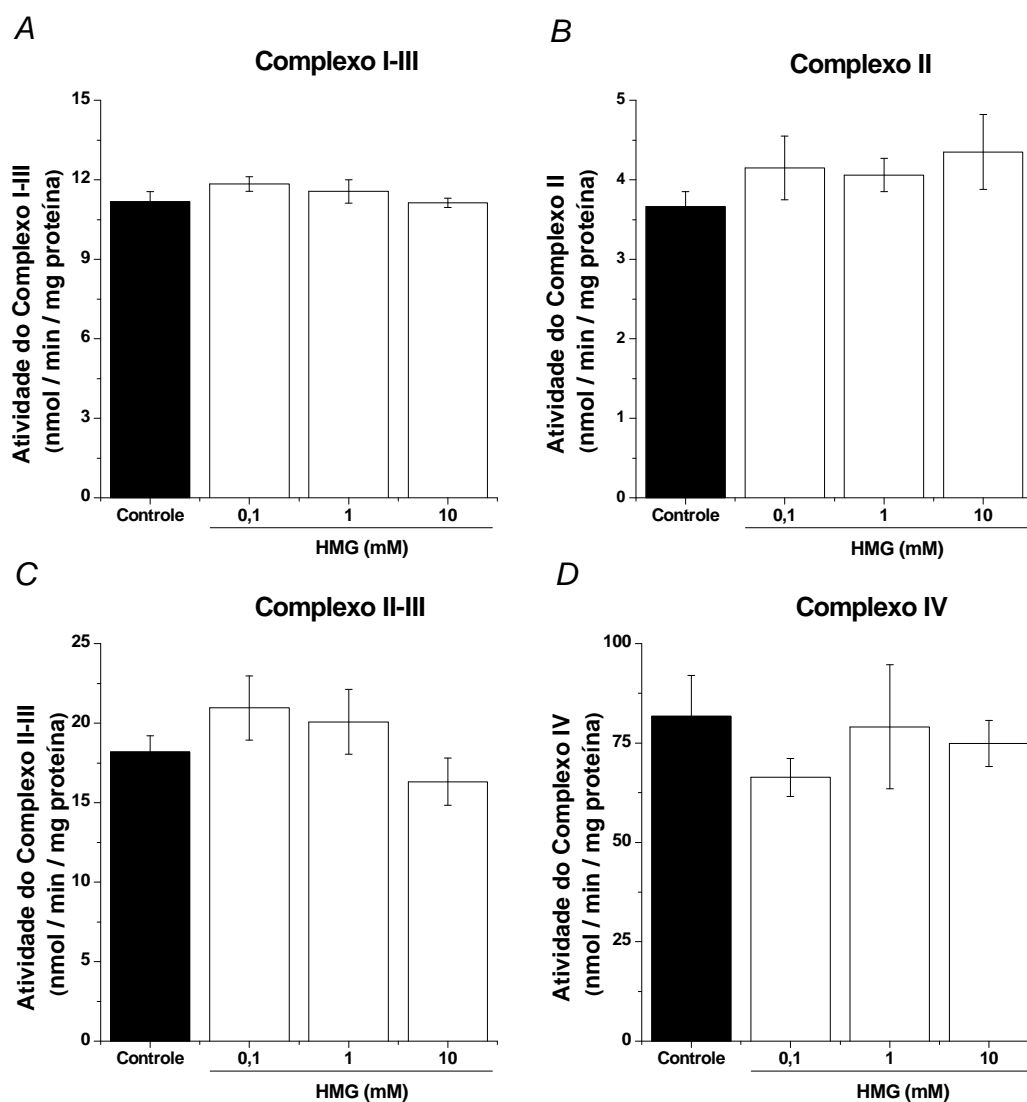




**Figura IV.3.1.** Efeito *in vitro* do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de [U-<sup>14</sup>C]glicose em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os valores representam média ± erro padrão da média (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

### **IV.3.2. Efeito *in vitro* do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a atividade dos complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens**

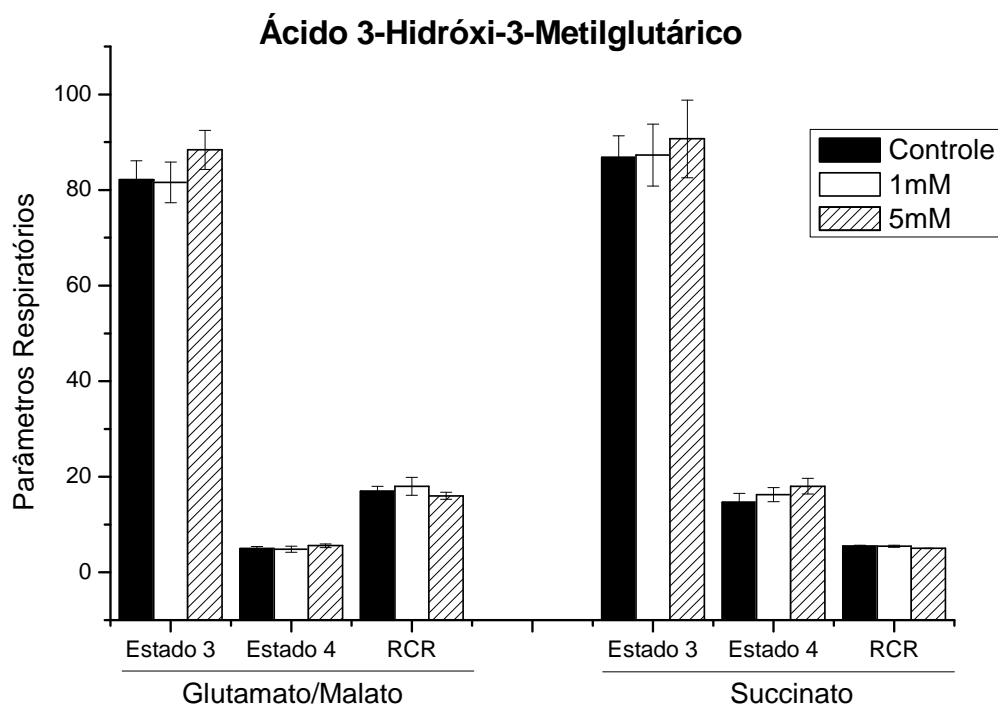
A figura IV.3.2 mostra que o HMG em concentrações de 0,1-10 mM, não alterou significativamente a atividade dos complexos I-III (painel A) [ $F_{(3,19)}=1,023$ ;  $P = 0,409$ ], II (painel B) [ $F_{(3,15)}=0,713$ ;  $P = 0,563$ ], II-III (painel C) [ $F_{(3,15)}=1,493$ ;  $P = 0,266$ ] e IV (painel D) [ $F_{(3,15)}=0,450$ ;  $P=0,722$ ] da cadeia de transporte de elétrons em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.



**Figura IV.3.2.** Efeito *in vitro* do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a atividade dos complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média (n=4-6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

### **III.3.3. Efeito *in vitro* do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre os parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de córtex cerebral de ratos jovens**

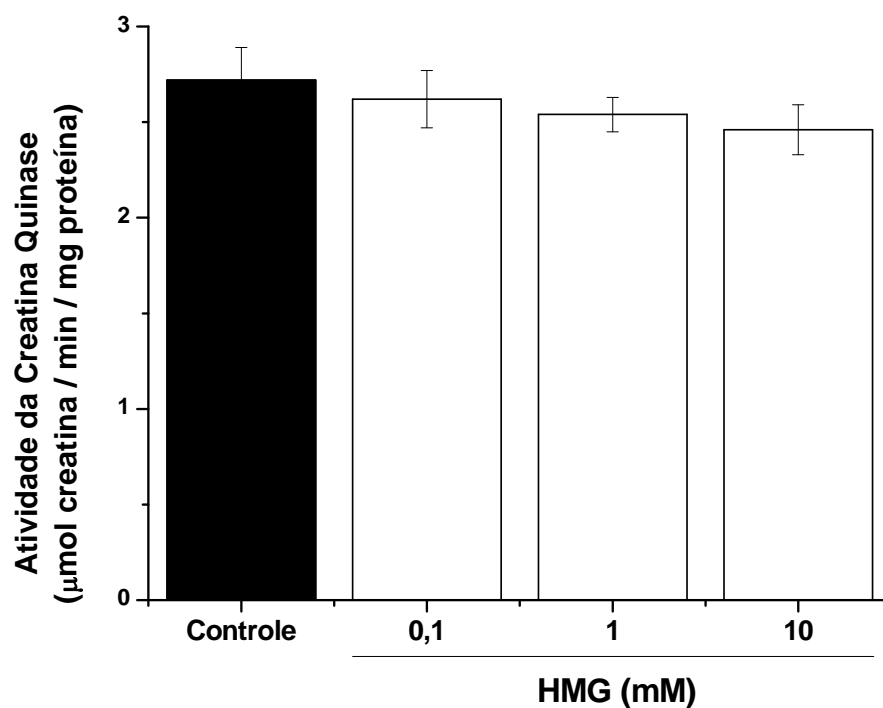
A figura IV.3.3 mostra que o HMG em concentrações de 0,1-5 mM não alterou o estado 3, estado 4 bem como a razão de controle respiratório (RCR) quando utilizamos tanto glutamato/malato (GM) quanto succinato (SUC) como substratos para a respiração mitocondrial (Estado 3: GM =  $[F_{(2,17)}=0,853; P = 0,446]$ , SUC =  $[F_{(2,14)}=0,105; P = 0,901]$ ; Estado 4: GM =  $[F_{(2,17)}=0,692; P = 0,516]$ , SUC =  $[F_{(2,14)}=1,039; P = 0,383]$ ; RCR: GM =  $[F_{(2,17)}=0,580; P = 0,572]$ , SUC =  $[F_{(2,14)}=3,540; P = 0,383]$ ).



**Figura IV.3.3.** Efeito *in vitro* do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre os parâmetros respiratórios (estado 3, estado 4 e razão de controle respiratório (RCR) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média (n=5-6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

**IV.3.4. Efeito *in vitro* do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a atividade da enzima creatina quinase (CK total) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens**

A figura IV.3.4 mostra que o HMG nas concentrações de 0,1, 1 e 10 mM não exerceu nenhum efeito significativo sobre a atividade da enzima creatina quinase (CK) [ $F_{(3,19)} = 0,661$ ;  $P = 0,588$ ].

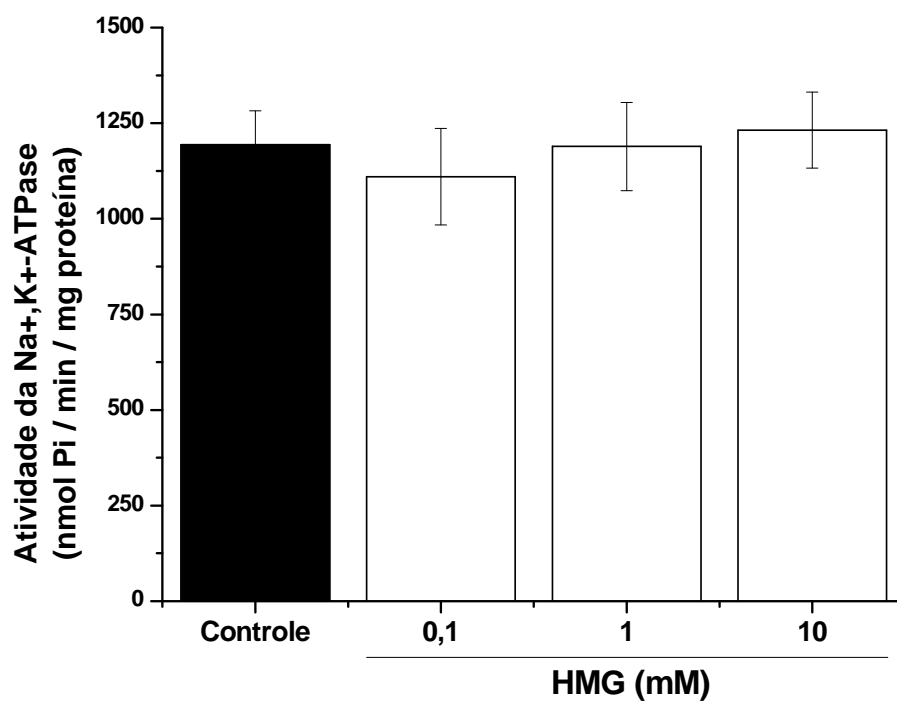


**Figura IV.3.4.** Efeito *in vitro* do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMGA) sobre a atividade da enzima creatina quinase total em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média (n=5-6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

**IV.3.5. Efeito *in vitro* do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral ratos jovens**

A figura IV.3.5 mostra que o HMG, nas concentrações de 0,1, 1 e 10 mM não exerceu nenhum efeito sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas isoladas de córtex cerebral de ratos jovens [ $F_{(3,23)}=0,223$ ;  $P=0,879$ ].

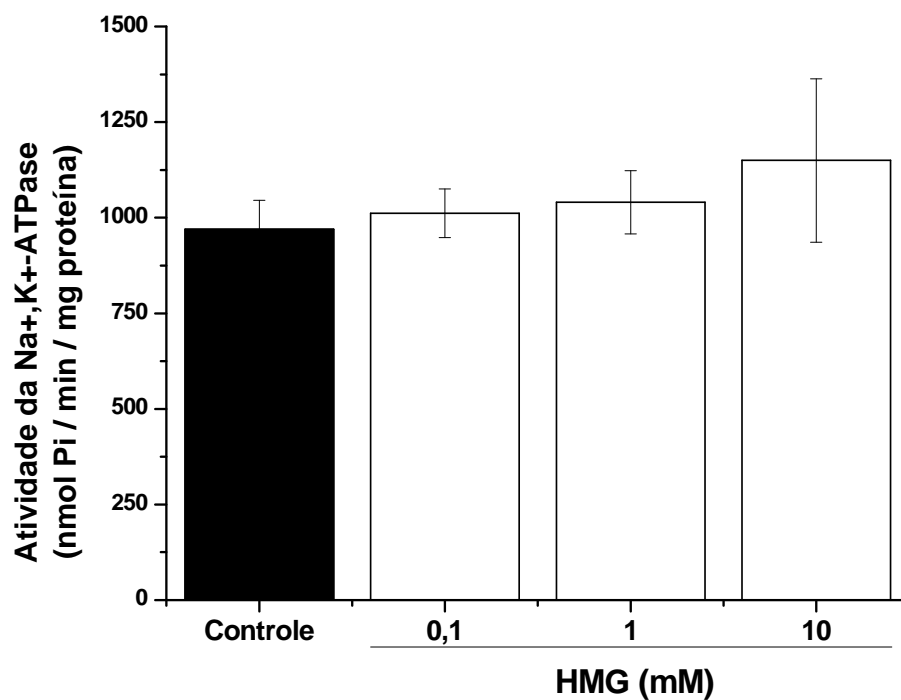




**Figura IV.3.5.** Efeito *in vitro* do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas isoladas de córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média ± erro padrão da média (n=5-6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

**IV.3.6. Efeito *in vitro* do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens quando pré-incubados durante 1 hora a 37°C**

A figura IV.3.6 mostra que o HMG, quando pré-incubados durante 1 hora a 37°C nas concentrações de 0,1, 1 e 10 mM não exerceu nenhum efeito sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens [ $F_{(3,23)}=0,379$ ;  $P=0,769$ ].

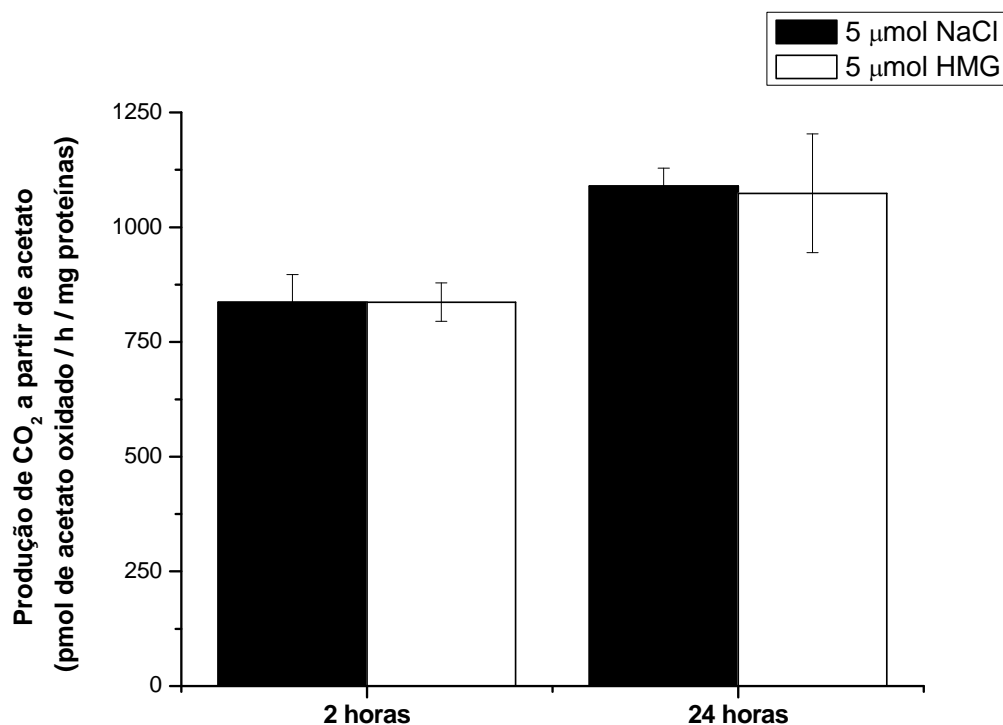


**Figura IV.3.6.** Efeito *in vitro* do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens quando pré-incubados durante 1 hora a 37°C. Os valores representam média ± erro padrão da média (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

#### **IV.4. Resultados - Estudos *ex vivo***

##### **IV.4.1 Efeito da administração intracerebroventricular (icv) do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de [1-<sup>14</sup>C]acetato em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens**

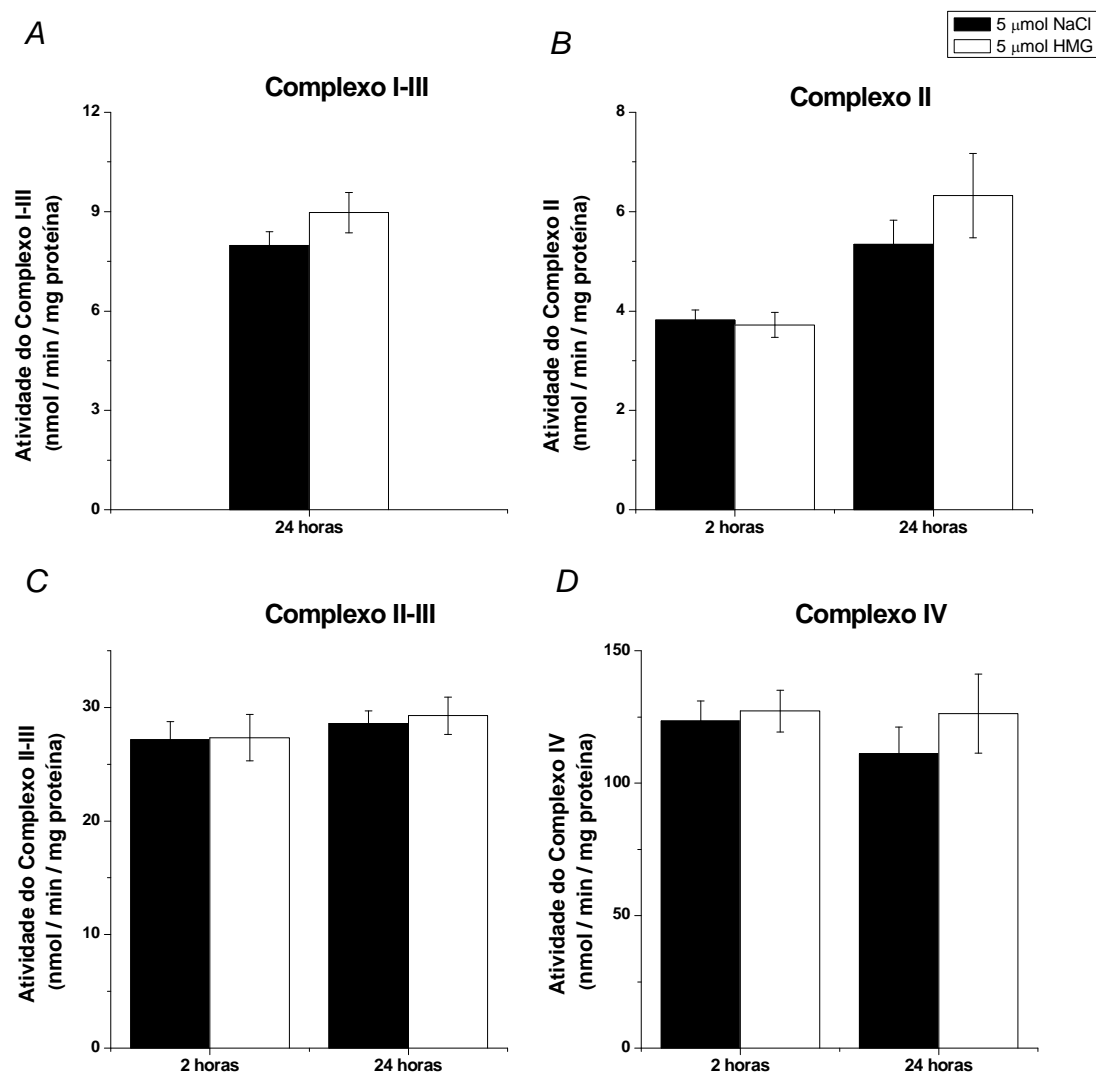
A figura IV.4.1 mostra que a produção de CO<sub>2</sub> a partir de [1-<sup>14</sup>C]acetato em homogeneizado de córtex cerebral de ratos não foi alterada pela administração icv de HMG (5 μmol) tanto em ratos sacrificados 2 horas ( $t_{(7)}=0,001$ ;  $P=1,00$ ) quanto em ratos sacrificados 24 horas ( $t_{(8)}=0,119$ ;  $P=0,908$ ) após a injeção intracerebral.



**Figura IV.4.1.** Efeito da administração intracerebroventricular (icv) do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a produção de  $\text{CO}_2$  a partir de  $[1-^{14}\text{C}]$ acetato em homogeneizado de córtex cerebral de ratos sacrificados 2 ou 24 horas após a injeção icv. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=4-5$ ). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

#### **IV.4.1 Efeito da administração intracerebroventricular (icv) do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a atividade dos complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens**

A figura IV.4.2 mostra que a atividade dos complexos I-III (painel A), II (painel B), II-III (painel C) e IV (painel D) da cadeia de transporte de elétrons não foi alterada significativamente pela administração icv de HMG (5  $\mu$ mol) tanto em ratos sacrificados 2 horas (Complexo II:  $t_{(9)}=0,306$ ;  $P=0,767$ ; Complexo II-III:  $t_{(9)}=-0,067$ ;  $P=0,948$ ; Complexo IV:  $t_{(9)}=-0,341$ ;  $P=0,741$ ) quanto em ratos sacrificados 24 horas (Complexo I-III:  $t_{(6)}=-1,336$ ;  $P=0,230$ ; Complexo II:  $t_{(11)}=-1,076$ ;  $P=0,305$ ; Complexo II-III:  $t_{(8)}=-0,343$ ;  $P=0,740$ ; Complexo IV:  $t_{(8)}=-0,839$ ;  $P=0,426$ ) após a injeção intracerebral.

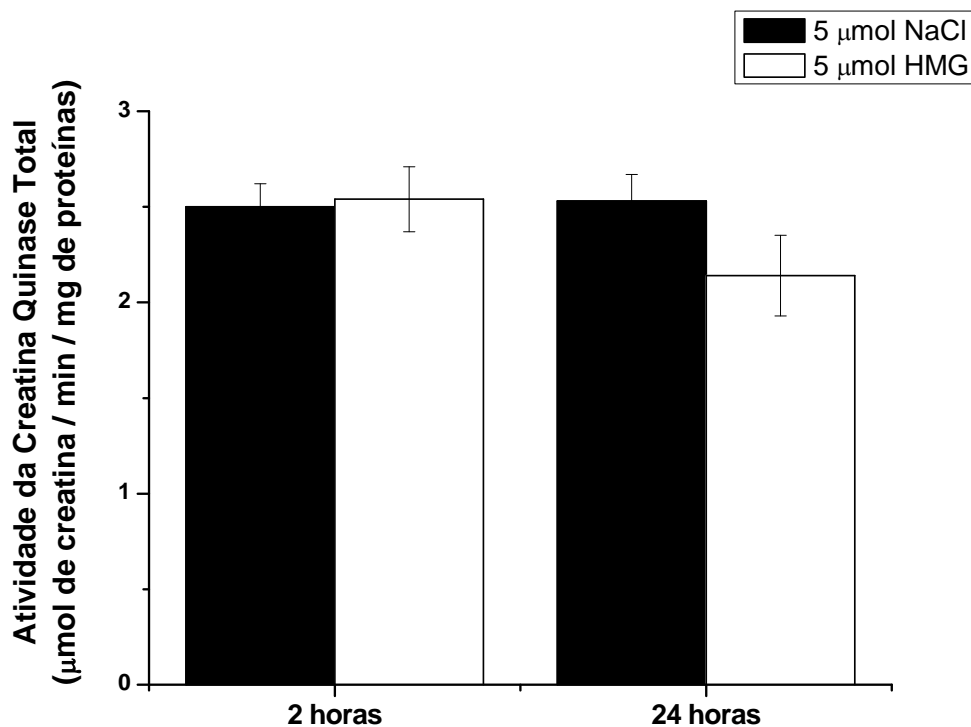


**Figura IV.4.2.** Efeito da administração intracerebroventricular (icv) do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a atividade dos complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons em homogeneizado de córtex cerebral de ratos sacrificados 2 ou 24 horas após a injeção icv. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5-6$ ). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

#### **IV.3.4. Efeito da administração intracerebroventricular (icv) do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a atividade da enzima creatina quinase total (CK) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens**

A figura IV.4.3 mostra que a atividade da creatina quinase (CK) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos não foi alterada pela administração icv de HMG (5  $\mu$ mol) tanto em ratos sacrificados 2 horas ( $t_{(9)}=-0,221$ ;  $P=0,830$ ) quanto em ratos sacrificados 24 horas ( $t_{(8)}=1,564$ ;  $P=0,156$ ) após a injeção intracerebral.

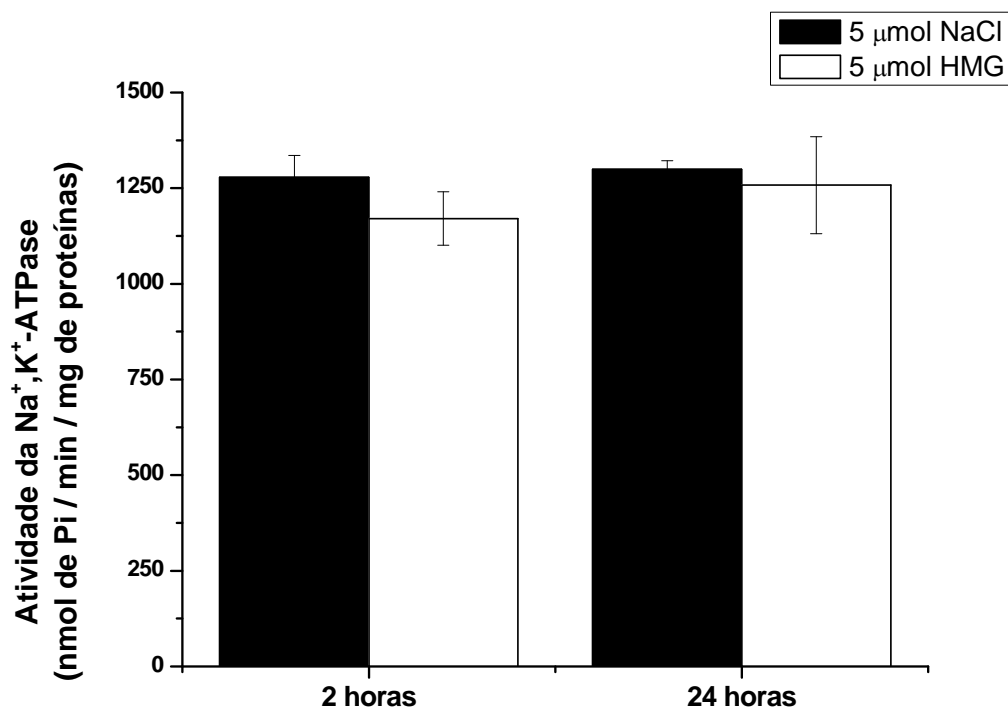




**Figura IV.4.3.** Efeito da administração intracerebroventricular (icv) do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a atividade da enzima creatina quinase total em homogeneizados de córtex cerebral de ratos sacrificados 2 ou 24 horas após a injeção icv. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média (n=5-6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

#### **IV.3.5. Efeito da administração intracerebroventricular (icv) do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a atividade da enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral ratos jovens**

A figura IV.4.4 mostra que a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas isoladas de córtex cerebral de ratos não foi alterada pela administração icv de HMG (5  $\mu\text{mol}$ ) tanto em ratos sacrificados 2 horas ( $t_{(9)}=0,428$ ;  $P=0,679$ ) quanto em ratos sacrificados 24 horas ( $t_{(6)}=1,176$ ;  $P=0,284$ ) após a injeção intracerebral.



**Figura IV.4.3.** Efeito da administração intracerebroventricular (icv) do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) sobre a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas isoladas córtex cerebral de ratos sacrificados 2 ou 24 horas após a injeção icv. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=6-7$ ). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

#### IV.4. Discussão

A discussão dos resultados presentes neste capítulo está contida no final desta tese no tópico “Discussão” (parte III).

### ***III- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES***

### III.1- DISCUSSÃO

A acidemia isovalérica (IVAcidemia) é uma doença hereditária do catabolismo do aminoácido leucina, com transmissão autossômica recessiva, causada pela deficiência da atividade da enzima isovaleril-CoA desidrogenase (Sweetman e Williams, 2001; Tanaka *et al.*, 1966), levando ao acúmulo preponderante dos ácidos isovalérico (IVA), 3-hidroxiisovalérico (3-OHIVA) e da isovalerilglicina (IVG). As concentrações de IVA atingem 5 mM no sangue dos pacientes, principalmente durante episódios agudos, enquanto as concentrações do 3-OHIVA e do IVG são menores (Sweetman e Williams, 2001; Tanaka *et al.*, 1966; Vockley e Ensenauer, 2006).

Os pacientes afetados pela IVAcidemia geralmente apresentam dois tipos de fenótipos clínicos: a forma neonatal, grave, aguda e a forma crônica, menos grave, com início de apresentação mais tardio (Sweetman e Williams, 2001). Em ambas as variantes, que são devidas ao mesmo defeito bioquímico, os sintomas neurológicos, como hipotonia, letargia, coma e convulsões são predominantes. Os achados laboratoriais são de acidose metabólica, moderada cetonúria, acidemia/acidúria láctica e hiperamonemia (Fischer *et al.*, 1981). Além disso, um terceiro variante foi recentemente descrito com um fenótipo bioquímico leve (Vockley e Ensenauer, 2006).

Apesar de sintomas clínicos serem predominantemente neurológicos, a fisiopatogenia do dano cerebral nesta doença é pouco conhecida. Neste contexto, recentemente foi demonstrado que o 3-OHIVA, que se acumula na IVAcidemia, bem como nas acidemias 3-metilglutacônica e 3-hidroxi-3-metilglutárica, induz estresse oxidativo em cérebro de ratos (Leipnitz *et al.*, 2008a; Leipnitz *et al.*, 2009). Considerando que os metabólitos acumulados na IVAcidemia são produzidos na mitocôndria e que os mesmos podem potencialmente contribuir para a neuropatogênese dessa patologia, no presente trabalho investigamos os efeitos *in vitro* do IVA, 3O-HIVA

e da IVG sobre alguns parâmetros do metabolismo energético no córtex cerebral de ratos jovens. Testamos o efeito destes compostos (0,1-5 mM IVA, 0,1-1 mM 3-OHIVA e 0,01-1 mM IVG) sobre a produção de CO<sub>2</sub>, as atividades dos complexos da cadeia respiratória e das enzimas creatina quinase (CK) e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em córtex cerebral de ratos jovens.

Verificamos, conforme demonstrado no capítulo I dessa tese, que esses metabólitos não alteraram a produção de CO<sub>2</sub> a partir de acetato (avaliação da atividade do ciclo do ácido cítrico) e tampouco as atividades dos complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória). Da mesma maneira, a atividade da CK, crítica para a transferência e o tamponamento de energia intracelular, também não foi alterada pelos metabólitos testados. Assim, podemos presumir que o IVA, o 3-OHIVA e a IVG provavelmente não comprometem a produção e a transferência de energia em córtex cerebral *in vitro*.

Nossos achados também apontam que a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isolada de membranas sinápticas não foi alterada quando da exposição direta dessas membranas plasmáticas ao IVA, 3-OHIVA e IVG. No entanto, observamos que a atividade dessa enzima foi inibida significativamente por IVA após pré-incubação de homogeneizados de córtex cerebral e posterior isolamento das membranas sinápticas, indicando um efeito indireto desse ácido sobre essa importante enzima crucial para a neurotransmissão sináptica. Por outro lado, a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase não foi alterada pela pré-incubação com o 3-OHIVA e IVG, sugerindo que o efeito inibitório do IVA sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase foi seletivo. Considerando, portanto, que o IVA não exerceu nenhum efeito sobre essa atividade quando as membranas purificadas contendo a enzima foram expostas diretamente ao metabólito, concluímos que o IVA inibiu de maneira indireta a atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase.

Demonstramos no capítulo II que a administração intracerebroventricular (icv) do IVA inibiu a produção de CO<sub>2</sub> a partir de acetato em ratos sacrificados 24 horas após a injeção, sem alterar esse parâmetro nos animais sacrificados 2 horas após a injeção. A redução na produção de CO<sub>2</sub> causada pela administração icv do IVA pode ser devida à inibição nas atividades dos complexos da cadeia de transporte de elétrons ou na atividade de uma ou mais enzimas do ciclo do ácido cítrico. Nosso estudo demonstrou que as atividades dos complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons não foram alteradas nos ratos sacrificados 2 ou 24 horas após a injeção icv de IVA. No entanto, a administração icv de IVA inibiu significativamente a atividade da enzima citrato sintase (CS). Assim, é possível que a redução da produção de CO<sub>2</sub> causada pela injeção de IVA seja devida ao efeito inibitório causado na atividade da CS, sugerindo que a administração *in vivo* de IVA compromete a oxidação de substratos pelo ciclo do ácido cítrico.

Por outro lado, a administração icv de IVA não modificou os parâmetros respiratórios estado 3, estado 4 e RCR em preparações mitocondriais obtidas 24 horas após a injeção icv de IVA, utilizando piruvato/malato como substratos respiratórios. Assim, nossos resultados sugerem que a ação inibitória do IVA sobre a atividade da citrato sintase não foi suficiente para alterar o consumo de oxigênio mitocondrial. Da mesma maneira, a administração de IVA não alterou a atividade da CK, sugerindo que esse ácido não interfere na transferência de energia intracelular.

Um achado interessante de nosso estudo foi que a administração icv de IVA inibiu a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em córtex cerebral de ratos sacrificados 2 ou 24 horas após a injeção. Esses resultados corroboram com aqueles demonstrados no Capítulo I que demonstraram que o IVA inibe a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase *in vitro*, reforçando que esse composto inibe a atividade dessa importante enzima no cérebro.

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é uma enzima responsável pela geração do potencial de membrana, através do transporte ativo de sódio e potássio no SNC, necessário para a manutenção da excitabilidade neuronal e controle do volume celular. Está presente em grande concentração na membrana celular, consumindo cerca de 40-50% do ATP gerado no tecido nervoso, podendo sua atividade ser modificada por alterações na fluidez de membrana (Erecinska *et al.*, 2004; Erecinska e Silver, 1994; Wheeler *et al.*, 1975). Enfatize-se que a manutenção da atividade normal da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é crítica para a função cerebral normal e reduções na sua atividade estão relacionadas a dano neuronal no cérebro de ratos e humanos (Cousin *et al.*, 1995; Lees, 1991; Lees, 1993; Lees *et al.*, 1990; Lees e Leong, 1995; Satoh e Nakazato, 1992; Sweadner, 1979). Assim, inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase ocorre em várias condições neuropatológicas, dentre elas isquemia cerebral (Wyse *et al.*, 2000), excitotoxicidade e epilepsia (Benari, 1985; Choi e Rothman, 1990; Cousin *et al.*, 1995; Grisar, 1984; Lees e Leong, 1995) e desordens neurodegenerativas comuns (Yu, 2003). Além disso, a redução da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em córtex cerebral de um neonato foi considerada estar diretamente envolvida no status convulsivo e encefalopatia espongiiforme apresentada pelo paciente (Renkawek *et al.*, 1992).

Com relação às possíveis consequências da inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase provocada pelo IVA, esses resultados podem estar relacionados com o dano cerebral apresentado pelos pacientes afetados por IVAcidemia, especialmente durante as crises encefalopáticas que ocorrem após infecções ou situações de estresse metabólico, caracterizadas por catabolismo intenso levando a aumento marcado dos níveis plasmáticos de IVA (Sweetman e Williams, 2001; Tanaka, 1990; Tanaka *et al.*, 1966; Tanaka e Isselbacher, 1967).



Verificamos ainda no capítulo I que o pré-tratamento dos homogeneizados corticais com trolox ( $\alpha$ -tocoferol) preveniu a inibição da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase causada pelo IVA, sugerindo o envolvimento de radicais peróxido nesse efeito. No entanto, demonstramos não haver envolvimento de oxidação de grupamentos SH no efeito inibitório do IVA, visto que a co-incubação com GSH, um agente protetor de tióis, não preveniu esse efeito. Da mesma maneira, não parece haver participação de óxido nítrico visto que a co-incubação com L-NAME, inibidor da enzima óxido nítrico sintase, também não alterou a inibição causada pelo IVA. Nossos resultados estão de acordo com as observações de que a enzima  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase é altamente vulnerável ao ataque de radicais livres (Kurella *et al.*, 1997; Lees, 1993; Yousef *et al.*, 2002). Por outro lado, a creatina foi capaz de prevenir completamente os efeitos inibitórios *in vitro* e *ex vivo* causados pelo IVA sobre a atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase (Capítulos I e II). Diversos estudos anteriores demonstraram efeitos neuroprotetores para a creatina (Brustovetsky *et al.*, 2001; Matthews *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 2006), além de apresentar propriedades antioxidantes via mecanismos envolvendo o sequestro de espécies reativas de oxigênio (Sestili *et al.*, 2006), reforçando então nossos achados de um possível envolvimento de radicais peróxido na inibição da atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase.

Tomados em seu conjunto, os efeitos inibitórios do IVA sobre o ciclo do ácido cítrico (produção de  $\text{CO}_2$  e citrato sintase), bem como sobre a atividade da enzima  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase (capítulos I e II) sugerem que esse ácido orgânico que se acumula em concentrações elevadas na IVAcidemia pode causar disfunção mitocondrial e prejudicar a neurotransmissão. Tais alterações podem representar mecanismos de neurotoxicidade que afetam os pacientes com a doença e que apresentam atrofia cerebral progressiva, bem como convulsões durante as crises encefalopáticas quando as concentrações desse metabólito estão muito aumentadas (Sweetman e Williams, 2001;

Tanaka, 1990; Tanaka *et al.*, 1966; Tanaka e Isselbacher, 1967). Outrossim, tendo em vista que a IVG não apresentou qualquer efeito sobre os parâmetros analisados, é possível que a combinação da glicina ao IVA possa inativar as ações deletérias desse ácido orgânico. Esse achado reveste-se de importância, pois os pacientes com IVAcidemia melhoram com a suplementação de glicina. Finalmente, postulamos que a suplementação com creatina pode representar uma nova estratégia terapêutica na IVAcidemia, visto que a administração de creatina é bem tolerada por neonatos (Bohnhorst *et al.*, 2004).

A acidemia 3-metilglutacônica (MGTA) corresponde a um grupo heterogêneo de desordens metabólicas hereditárias caracterizadas bioquimicamente pela excreção aumentada dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) e 3-metilglutárico (MGA). Vários trabalhos observaram alterações na estrutura ou na função mitocondrial nos cinco tipos de MGTA conhecidos (Barth *et al.*, 1983; Besley *et al.*, 1995; Christodoulou *et al.*, 1994; Davey *et al.*, 2006; Davies *et al.*, 2008; De Kremer *et al.*, 2001; Gunay-Aygun, 2005; Ibel *et al.*, 1993; Wortmann *et al.*, 2009). Desta forma, o próximo passo de nossa investigação (capítulo III) foi investigar os efeitos *in vitro* dos ácidos 3-metilglutacônico (MGT) e 3-metilglutárico (MGA) encontrados em concentrações aumentadas nos pacientes portadores de MGTA sobre alguns parâmetros de metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

Observamos que o MGT, nas concentrações de 0,1-5 mM, e o MGA, nas concentrações de 0,1-10 mM, não causaram qualquer efeito sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose (via glicolítica) e a atividade dos complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória) em homogeneizados de córtex cerebral, bem como sobre os parâmetros respiratórios estado 3, estado 4 e RCR em preparações mitocondriais de cérebro de ratos, utilizando-se glutamato/malato ou succinato como

substratos respiratórios, sugerindo assim que esses ácidos não alteram a produção de energia cerebral.

Da mesma maneira, observamos que o MGT e o MGA não alteraram a atividade da creatina quinase em homogeneizados de córtex cerebral, indicando que esses compostos não afetam a transferência de energia intracelular. Finalmente, verificamos que o MGA e MGT não alteraram a atividade da enzima  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase obtida de membranas plasmáticas sinápticas.

No entanto, foi demonstrado previamente que tanto o MGT quanto o MGA induzem dano oxidativo lipídico e protéico *in vitro* em homogeneizados de córtex cerebral de ratos (Leipnitz *et al.*, 2008a). Considerando que as enzimas creatina quinase e  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase são sensíveis a ataque por espécies reativas (Kurella *et al.*, 1997; Stachowiak *et al.*, 1998; Venkataraman *et al.*, 2009; Yousef *et al.*, 2002) e que em nosso presente trabalho não verificamos qualquer efeito do MGT e do MGA sobre essas atividades enzimáticas, é possível presumir que o dano oxidativo induzido por esses compostos não foi capaz de alterar essas atividades.

Concluindo, nossos resultados demonstram que os metabólitos acumulados na MGTA não causam qualquer alteração *in vitro* nos parâmetros examinados de metabolismo energético em córtex cerebral de ratos, sugerindo assim que as alterações neurológicas apresentadas pelos pacientes não parecem ser devidas à redução na produção, na transferência ou na utilização de energia pelo cérebro.

A acidemia 3-hidróxi-3-metilglutárica (HMGA) é uma doença metabólica rara causada pela deficiência na atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase (HL) que compromete a cetogênese e o catabolismo da leucina. A HMGA é caracterizada bioquimicamente por acúmulo tecidual e elevada excreção urinária do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG), bem como dos ácidos 3-metilglutacônico

(MGT), 3-metilglutárico (MGA) e 3-hidroxiisovalérico (3-OHIVA) e também da 3-metilcrotonilglicina (Bonafe *et al.*, 2000; Sweetman e Williams, 2001). Durante a descompensação metabólica podem ser encontrados na urina, em concentrações também consideráveis, porém menores, os ácidos glutárico, láctico, adípico e outros ácidos dicarboxílicos (Gibson *et al.*, 1988).

Os pacientes acometidos da HMGA apresentam no período neonatal ou infantil hipoglicemia hipocetótica severa, acidose metabólica, hiperamonemia, vômitos e hipotonia. A doença pode progredir rapidamente para coma e morte e resulta em dano neurológico permanente (Vargas *et al.*, 2007). As alterações mais comuns encontradas em imagens de ressonância magnética envolvem lesões coalescentes múltiplas e marcadas na substância branca subcortical periventricular, principalmente nas regiões frontal e parietal, que podem ser reversíveis no início da doença após uma dieta livre de leucina (Zafeiriou *et al.*, 2007). Além disso, são comumente observados anormalidades nos núcleos caudado e dentado em pacientes afetados pela HMGA (van der Knaap *et al.*, 1998; Yalcinkaya *et al.*, 1999; Yilmaz *et al.*, 2006). No entanto, apesar dos pacientes com HMGA apresentarem sintomas neurológicos pronunciados, os mecanismos envolvidos no dano tecidual nessa desordem ainda não estão bem estabelecidos.

Assim, no capítulo IV avaliamos os efeitos *in vitro* e da administração intracerebroventricular (icv) do HMG sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

Verificamos que a presença do HMG no meio de incubação nas concentrações de 0,1-10 mM (ensaios *in vitro*) ou a administração icv do ácido, não alterou a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose ou acetato, a atividade dos complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons e os parâmetros respiratórios estado 3, estado 4 e RCR medidos

através do consumo de oxigênio em córtex cerebral de ratos jovens. Também observamos que nessas concentrações o HMG não alterou *in vitro* e *ex vivo* as atividades da CK em homogeneizado e da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de membranas sinápticas isoladas de córtex cerebral. Resultados prévios de nosso laboratório evidenciaram que o HMGA, MGT, MGA e 3-OHVA induzem dano oxidativo protéico e lipídico e reduzem as defesas antioxidantes não-enzimáticas no córtex cerebral de ratos (Leipnitz *et al.*, 2008a; Leipnitz *et al.*, 2009; Leipnitz *et al.*, 2008b). Tendo em vista que as enzimas CK e  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase são vulneráveis a dano oxidativo causado por espécies ativas (Kurella *et al.*, 1997; Stachowiak *et al.*, 1998; Venkataraman *et al.*, 2009; Yousef *et al.*, 2002), concluímos que o dano oxidativo a proteínas e lipídios em homogeneizados de córtex cerebral não foi suficiente para alterar a produção e transferência intracelular de energia em córtex cerebral de ratos.

Em resumo, nossos resultados demonstram que o HMG não causa qualquer alteração tanto *in vitro* quanto *ex vivo* nos parâmetros analisados no em córtex cerebral de ratos, indicando assim que o as alterações neurológicas apresentadas pelos pacientes não parecem ser devidas a inibições na produção, na transferência ou na utilização de energia pelo cérebro.

Tomados em seu conjunto, concluímos que os compostos acumulados nas MGTA e HMGA não alteram importantes parâmetros da bioenergética em córtex cerebral de ratos jovens, indicando que alterações importantes do metabolismo energético não poderiam explicar o dano cerebral que acomete esses pacientes. Em contraste, na IVAcidemia o principal composto acumulado inibe significativamente uma enzima crucial para a neurotransmissão sináptica e bloqueia ciclo do ácido cítrico provavelmente por inibição da enzima citrato sintase.

## **III.2- CONCLUSÕES**

### **III.2.1. Efeitos *in vitro* dos metabólitos acumulados na acidemia isovalérica sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens**

- Os ácidos isovalérico (IVA), 3-hidroxiisovalérico (3-OHIVA) bem como a isovalerilglicina (IVG) não alteraram *in vitro* a produção de CO<sub>2</sub> a partir de acetato, a atividade dos complexos I-IV da cadeia respiratória, bem como nas atividades da creatina quinase e da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase de membranas plasmáticas sinápticas isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.
- A atividade da enzima Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase foi inibida significativamente em membranas isoladas após pré-incubação dos homogeneizados na presença do IVA, indicando um efeito indireto do metabólito sobre essa atividade enzimática.
- A inibição da atividade da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase causada pelo IVA foi completamente prevenida por  $\alpha$ -tocoferol e creatina, sugerindo envolvimento de espécies reativas no efeito inibitório.

### **III.2.1. Efeitos da administração intracerebroventricular de ácido isovalérico sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens**

- A administração intracerebroventricular (icv) de IVA reduziu significativamente a produção de CO<sub>2</sub> a partir de acetato e a atividade da enzima citrato sintase em homogeneizado de ratos sacrificados 24 horas após a injeção.
- As atividades dos complexos I-IV da cadeia respiratória e da creatina quinase, bem como os parâmetros respiratórios estado 3, estado 4 e RCR não foram alteradas em córtex cerebral de ratos jovens após a administração icv de IVA.

- A injeção icv de IVA reduziu significativamente a atividade da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  em membranas plasmáticas sinápticas isolada de córtex cerebral de ratos jovens após a administração de IVA.
- O efeito inibitório causado pela injeção icv de IVA sobre a atividade da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  foi completamente prevenido pela pré-administração i.p. de creatina nos ratos.

### **III.2.3. Efeitos *in vitro* dos metabólitos acumulados nas acidemias 3-metilglutacônica e 3-hidroxi-3-metilglutárica sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens**

- Os ácidos 3-metilglutacônico (MGT), 3-metilglutárico (MGA) e -3-hidroxi-3-metilglutárico (HMG) não alteraram *in vitro* a produção de  $\text{CO}_2$  a partir de glicose, bem como as atividades dos complexos I-IV da cadeia respiratória, da creatina quinase em homogeneizados e da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  em preparações de membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos.

### **III.2.4. Efeitos *ex vivo* do ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens**

- A administração intracerebroventricular (icv) de HMG não alterou a produção de  $\text{CO}_2$  a partir de acetato, a atividade dos complexos I-IV da cadeia respiratória bem como as atividades da creatina quinase em homogeneizados e da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  em preparações de membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos sacrificados 2 ou 24 horas após a injeção do metabólito.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aksenov, M., Aksenova, M., Butterfield, D. A., Markesbery, W. R., 2000. Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem.* 74, 2520-7.
- Aksenov, M. Y., Aksenova, M. V., Payne, R. M., Smith, C. D., Markesbery, W. R., Carney, J. M., 1997. The expression of creatine kinase isoenzymes in neocortex of patients with neurodegenerative disorders: Alzheimer's and Pick's disease. *Exp Neurol.* 146, 458-65.
- Aksenova, M. V., Aksenov, M. Y., Payne, R. M., Trojanowski, J. Q., Schmidt, M. L., Carney, J. M., Butterfield, D. A., Markesbery, W. R., 1999. Oxidation of cytosolic proteins and expression of creatine kinase BB in frontal lobe in different neurodegenerative disorders. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 10, 158-65.
- Al-Sayed, M., Imtiaz, F., Alsmadi, O. A., Rashed, M. S., Meyer, B. F., 2006. Mutations underlying 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency in the Saudi population. *BMC Med Genet.* 7, 86.
- Anikster, Y., Kleta, R., Shaag, A., Gahl, W. A., Elpeleg, O., 2001. Type III 3-methylglutaconic aciduria (optic atrophy plus syndrome, or Costeff optic atrophy syndrome): identification of the OPA3 gene and its founder mutation in Iraqi Jews. *Am J Hum Genet.* 69, 1218-24.
- Aperia, A., 2007. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med.* 261, 44-52.
- Arbelaez, A., Castillo, M., Stone, J., 1999. MRI in 3-methylglutaconic aciduria type 1. *Neuroradiology.* 41, 941-2.
- Arn, P., Funanage, V. L., 2006. 3-methylglutaconic aciduria disorders: the clinical spectrum increases. *J Pediatr Hematol Oncol.* 28, 62-3.
- Attia, N., Sakati, N., al Ashwal, A., al Saif, R., Rashed, M., Ozand, P. T., 1996. Isovaleric acidemia appearing as diabetic ketoacidosis. *J Inherit Metab Dis.* 19, 85-6.
- Babcock, G. T., Wikstrom, M., 1992. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature.* 356, 301-9.
- Baric, I., Fumic, K., Hoffmann, G. F., 2001. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. *Croat Med J.* 42, 379-83.



- Barth, P. G., Scholte, H. R., Berden, J. A., Van der Klei-Van Moorsel, J. M., Luyt-Houwen, I. E., Van 't Veer-Korthof, E. T., Van der Harten, J. J., Sobotka-Plojhar, M. A., 1983. An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J Neurol Sci.* 62, 327-55.
- Barth, P. G., Valianpour, F., Bowen, V. M., Lam, J., Duran, M., Vaz, F. M., Wanders, R. J., 2004. X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome): an update. *American Journal of Medical Genetics A.* 126A, 349-54.
- Bartlett, K., Gompertz, D., 1974. The specificity of glycine-N-acylase and acylglycine excretion in the organicacidaemias. *Biochem Med.* 10, 15-23.
- Benari, Y., 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid - mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 14, 375-403.
- Besley, G. T., Lendon, M., Broadhead, D. M., Till, J., Heptinstall, L. E., Phillips, B., 1995. Mitochondrial complex deficiencies in a male with cardiomyopathy and 3-methylglutaconic aciduria. *J Inherit Metab Dis.* 18, 221-3.
- Bessman, S. P., Carpenter, C. L., 1985. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem.* 54, 831-62.
- Bickel, H., 1987. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme.* 38, 14-26.
- Bione, S., D'Adamo, P., Maestrini, E., Gedeon, A. K., Bolhuis, P. A., Toniolo, D., 1996. A novel X-linked gene, G4.5. is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet.* 12, 385-9.
- Bohnhorst, B., Geuting, T., Peter, C. S., Dordelmann, M., Wilken, B., Poets, C. F., 2004. Randomized, controlled trial of oral creatine supplementation (not effective) for apnea of prematurity. *Pediatrics.* 113, e303-7.
- Bonafe, L., Troxler, H., Kuster, T., Heizmann, C. W., Chamoles, N. A., Burlina, A. B., Blau, N., 2000. Evaluation of urinary acylglycines by electrospray tandem mass spectrometry in mitochondrial energy metabolism defects and organic acidurias. *Mol Genet Metab.* 69, 302-11.
- Brustovetsky, N., Brustovetsky, T., Dubinsky, J. M., 2001. On the mechanisms of neuroprotection by creatine and phosphocreatine. *J Neurochem.* 76, 425-34.
- Budd, M. A., Tanaka, K., Holmes, L. B., Efron, M. L., Crawford, J. D., Isselbacher, K. J., 1967. Isovaleric acidemia. Clinical features of a new genetic defect of leucine metabolism. *N Engl J Med.* 277, 321-7.

- Chalmers, R. A., Lawson, A. M., 1982. *Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias*, vol. Chapman & Hall, London.
- Chalmers, R. A., Purkiss, P., Watts, R. W., Lawson, A. M., 1980. Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. *J Inherit Metab Dis.* 3, 27-43.
- Chan, K. M., Delfert, D., Junger, K. D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated atpase activity. *Anal Biochem.* 157, 375-380.
- Choi, D. W., Rothman, S. M., 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci.* 13, 171-182.
- Christodoulou, J., McInnes, R. R., Jay, V., Wilson, G., Becker, L. E., Lehotay, D. C., Platt, B. A., Bridge, P. J., Robinson, B. H., Clarke, J. T., 1994. Barth syndrome: clinical observations and genetic linkage studies. *Am J Med Gen.* 50, 255-64.
- Clark, J. B., Bates, T. E., Cullingford, T., Land, J. M., 1993. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. *Dev Neurosci.* 15, 174-80.
- Cohn, R. M., Yudkoff, M., Rothman, R., Segal, S., 1978. Isovaleric acidemia: use of glycine therapy in neonates. *N Engl J Med.* 299, 996-9.
- Cousin, M. A., Nicholls, D. G., Pocock, J. M., 1995. Modulation of ion gradients and glutamate release in cultured cerebellar granule cells by ouabain. *J Neurochem.* 64, 2097-2104.
- da Silva, C. G., Ribeiro, C. A. J., Leipnitz, G., Dutra, C. S., Wyse, A. T. S., Wannmacher, C. M. D., Sarkis, J. J. F., Jakobs, C., Wajner, M., 2002. Inhibition of cytochrome c oxidase activity in rat cerebral cortex and human skeletal muscle by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1586, 81-91.
- Dasouki, M., Buchanan, D., Mercer, N., Gibson, K. M., Thoene, J., 1987. 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria: response to carnitine therapy and fat and leucine restriction. *J Inherit Metab Dis.* 10, 142-6.
- Davey, K. M., Parboosingh, J. S., McLeod, D. R., Chan, A., Casey, R., Ferreira, P., Snyder, F. F., Bridge, P. J., Bernier, F. P., 2006. Mutation of DNAJC19, a human homologue of yeast inner mitochondrial membrane co-chaperones, causes DCMA syndrome, a novel autosomal recessive Barth syndrome-like condition. *J Med Genet.* 43, 385-93.

- David, S., Shoemaker, M., Haley, B. E., 1998. Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: correlation of reduced enzyme activity and active site photolabeling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Brain Res Mol Brain Res.* 54, 276-87.
- Davies, V. J., Powell, K. A., White, K. E., Yip, W., Hogan, V., Hollins, A. J., Davies, J. R., Piechota, M., Brownstein, D. G., Moat, S. J., Nichols, P. P., Wride, M. A., Boulton, M. E., Votruba, M., 2008. A missense mutation in the murine Opa3 gene models human Costeff syndrome. *Brain.* 131, 368-80.
- De Kremer, R. D., Paschini-Capra, A., Bacman, S., Argarana, C., Civallero, G., Kelley, R. I., Guelbert, N., Latini, A., de Halac, I. N., Giner-Ayala, A., Johnston, J., Proujansky, R., Gonzalez, I., Depetris-Boldini, C., Oller-Ramirez, A., Angaroni, C., Theaux, R. A., Hliba, E., Juaneda, E., 2001. Barth's syndrome-like disorder: a new phenotype with a maternally inherited A3243G substitution of mitochondrial DNA (MELAS mutation). *Am J Med Genet.* 99, 83-93.
- de Sousa, C., Chalmers, R. A., Stacey, T. E., Tracey, B. M., Weaver, C. M., Bradley, D., 1986. The response to L-carnitine and glycine therapy in isovaleric acidemia. *Eur J Pediatr.* 144, 451-6.
- Di Rosa, G., Deodato, F., Loupatty, F. J., Rizzo, C., Carrozzo, R., Santorelli, F. M., Boenzi, S., D'Amico, A., Tozzi, G., Bertini, E., Maiorana, A., Wanders, R. J., Dionisi-Vici, C., 2006. Hypertrophic cardiomyopathy, cataract, developmental delay, lactic acidosis: a novel subtype of 3-methylglutaconic aciduria. *J Inherit Metab Dis.* 29, 546-50.
- Dickinson, C. J., 1996. Cerebral oxidative metabolism in hypertension. *Clin Sci (Lond).* 91, 539-50.
- Dionisi-Vici, C., Deodato, F., Roschinger, W., Rhead, W., Wilcken, B., 2006. 'Classical' organic acidurias, propionic aciduria, methylmalonic aciduria and isovaleric aciduria: long-term outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis.* 29, 383-9.
- Duran, M., Bruinvis, L., Ketting, D., Wadman, S. K., van Pelt, B. C., Batenburg-Plenter, A. M., 1982. Isovaleric acidemia presenting with dwarfism, cataract and congenital abnormalities. *J Inherit Metab Dis.* 5, 125-7.
- Elsas, L. J., 2nd, Naglak, M., 1988. Acute and chronic-intermittent isovaleric acidemia: diagnosis and glycine therapy. *Acta Paediatr Jpn.* 30, 442-51.

- Ensenauer, R., Vockley, J., Willard, J. M., Huey, J. C., Sass, J. O., Edland, S. D., Burton, B. K., Berry, S. A., Santer, R., Grunert, S., Koch, H. G., Marquardt, I., Rinaldo, P., Hahn, S., Matern, D., 2004. A common mutation is associated with a mild, potentially asymptomatic phenotype in patients with isovaleric acidemia diagnosed by newborn screening. *Am J Hum Genet.* 75, 1136-42.
- Erecinska, M., Cherian, S., Silver, I. A., 2004. Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol.* 73, 397-445.
- Erecinska, M., Silver, I. A., 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 43, 37-71.
- Faull, K. F., Bolton, P. D., Halpern, B., Hammond, J., Danks, D. M., 1976a. The urinary organic acid profile associated with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Clin Chim Acta.* 73, 553-9.
- Faull, K. F., Bolton, P. D., Halpern, B., Hammond, J., Danks, D. M., Hahnel, R., Wilkinson, S. P., Wysocki, S. J., Masters, P. L., 1976b. Patient with defect in leucine metabolism. *N Engl J Med.* 294, 1013.
- Fischer, A. Q., Challa, V. R., Burton, B. K., McLean, W. T., 1981. Cerebellar hemorrhage complicating isovaleric acidemia: a case report. *Neurology.* 31, 746-8.
- Fischer, J. C., Ruitenbeek, W., Berden, J. A., Trijbels, J. M. F., Veerkamp, J. H., Stadhouders, A. M., Sengers, R. C. A., Janssen, A. J. M., 1985. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 153, 23-36.
- Funghini, S., Pasquini, E., Cappellini, M., Donati, M. A., Morrone, A., Fonda, C., Zammarchi, E., 2001. 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria in an Italian patient is caused by a new nonsense mutation in the HMGCL gene. *Mol Genet Metab.* 73, 268-75.
- Gerdes, A. M., Gregersen, N., Ludvigsson, P., Guttler, F., 1988. A Scandinavian case of isovaleric acidemia. *J Inherit Metab Dis.* 11, 219-20.
- Gibson, K. M., Breuer, J., Nyhan, W. L., 1988. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: review of 18 reported patients. *Eur J Pediatr.* 148, 180-6.
- Gibson, K. M., Cassidy, S. B., Seaver, L. H., Wanders, R. J., Kennaway, N. G., Mitchell, G. A., Spark, R. P., 1994. Fatal cardiomyopathy associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 17, 291-4.

- Gibson, K. M., Elpeleg, O. N., Jakobs, C., Costeff, H., Kelley, R. I., 1993. Multiple syndromes of 3-methylglutaconic aciduria. *Pediatr Neurol.* 9, 120-3.
- Gregersen, N., Kolvraa, S., Mortensen, P. B., 1986. Acyl-CoA: glycine N-acyltransferase: in vitro studies on the glycine conjugation of straight- and branched-chained acyl-CoA esters in human liver. *Biochem Med Metab Biol.* 35, 210-8.
- Grisar, T., 1984. Glial and neuronal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pump in epilepsy. *Ann Neurol.* 16, S128-S134.
- Gross, W. L., Bak, M. I., Ingwall, J. S., Arstall, M. A., Smith, T. W., Balligand, J. L., Kelly, R. A., 1996. Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 5604-9.
- Gunay-Aygun, M., 2005. 3-Methylglutaconic aciduria: a common biochemical marker in various syndromes with diverse clinical features. *Mol Genet Metab.* 84, 1-3.
- Hamman, B. L., Bittl, J. A., Jacobus, W. E., Allen, P. D., Spencer, R. S., Tian, R., Ingwall, J. S., 1995. Inhibition of the creatine kinase reaction decreases the contractile reserve of isolated rat hearts. *Am J Physiol.* 269, H1030-6.
- Hattori, N., Kitagawa, K., Higashida, T., Yagyu, K., Shimohama, S., Wataya, T., Perry, G., Smith, M. A., Inagaki, C., 1998. CI-ATPase and Na<sup>+</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase activities in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett.* 254, 141-4.
- Hine, D. G., Hack, A. M., Goodman, S. I., Tanaka, K., 1986. Stable isotope dilution analysis of isovaleryl-glycine in amniotic fluid and urine and its application for the prenatal diagnosis of isovaleric acidemia. *Pediatr Res.* 20, 222-6.
- Hoffmann, G. F., von Kries, R., Klose, D., Lindner, M., Schulze, A., Muntau, A. C., Roschinger, W., Liebl, B., Mayatepek, E., Roscher, A. A., 2004. Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur J Pediatr.* 163, 76-80.
- Hou, J. W., Wang, T. R., 1990. Isovaleric acidemia: report of one case. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi.* 31, 262-5.
- Hughes, B. P., 1962. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta.* 7, 597-&.
- Hyman, D. B., Tanaka, K., 1986. Isovaleryl-CoA dehydrogenase activity in isovaleric acidemia fibroblasts using an improved tritium release assay. *Pediatr Res.* 20, 59-61.

- Ibel, H., Endres, W., Hadorn, H. B., Deufel, T., Paetzke, I., Duran, M., Kennaway, N. G., Gibson, K. M., 1993. Multiple respiratory chain abnormalities associated with hypertrophic cardiomyopathy and 3-methylglutaconic aciduria. *Eur J Pediatr.* 152, 665-70.
- IJlst, L., Loupatty, F. J., Ruiten, J. P., Duran, M., Lehnert, W., Wanders, R. J., 2002. 3-Methylglutaconic aciduria type I is caused by mutations in AUH. *Am J Hum Genet.* 71, 1463-6.
- Jones, D. H., Matus, A. I., 1974. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta.* 356, 276-287.
- Jooste, S., Erasmus, E., Mienie, L. J., de Wet, W. J., Gibson, K. M., 1994. The detection of 3-methylglutaryl carnitine and a new dicarboxylic conjugate, 3-methylglutaconyl carnitine, in 3-methylglutaconic aciduria. *Clin Chim Acta.* 230, 1-8.
- Kaplan, J. H., 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 71, 511-35.
- Krieger, I., Tanaka, K., 1976. Therapeutic effects of glycine in isovaleric acidemia. *Pediatr Res.* 10, 25-9.
- Kurella, E., Kukley, M., Tyulina, O., Dobrota, D., Matejovicova, M., Mezesova, V., Boldyrev, A., 1997. Kinetic parameters of Na/K-ATPase modified by free radicals in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci.* 834, 661-5.
- Lee, P. J., Harrison, E. L., Jones, M. G., Chalmers, R. A., Leonard, J. V., Whipp, B. J., 1998. Improvement in exercise tolerance in isovaleric acidemia with L-carnitine therapy. *J Inherit Metab Dis.* 21, 136-40.
- Lees, G. J., 1991. Inhibition of sodium-potassium ATPase - A potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res. Rev.* 16, 283-300.
- Lees, G. J., 1993. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience.* 54, 287-322.
- Lees, G. J., Lehmann, A., Sandberg, M., Hamberger, A., 1990. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor in the rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 120, 159-162.
- Lees, G. J., Leong, W., 1995. The sodium-potassium ATPase inhibitor ouabain is neurotoxic in the rat substantia nigra and striatum. *Neurosci Lett.* 188, 113-116.

- Leipnitz, G., Seminotti, B., Amaral, A. U., de Bortoli, G., Solano, A., Schuck, P. F., Wyse, A. T., Wannmacher, C. M., Latini, A., Wajner, M., 2008a. Induction of oxidative stress by the metabolites accumulating in 3-methylglutaconic aciduria in cerebral cortex of young rats. *Life Sci.* 82, 652-62.
- Leipnitz, G., Seminotti, B., Fernandes, C. G., Amaral, A. U., Beskow, A. P., da Silva Lde, B., Zanatta, A., Ribeiro, C. A., Vargas, C. R., Wajner, M., 2009. Striatum is more vulnerable to oxidative damage induced by the metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency as compared to liver. *Int J Dev Neurosci.* 27, 351-6.
- Leipnitz, G., Seminotti, B., Haubrich, J., Dalcin, M. B., Dalcin, K. B., Solano, A., de Bortoli, G., Rosa, R. B., Amaral, A. U., Dutra-Filho, C. S., Latini, A., Wajner, M., 2008b. Evidence that 3-hydroxy-3-methylglutaric acid promotes lipid and protein oxidative damage and reduces the nonenzymatic antioxidant defenses in rat cerebral cortex. *J Neurosci Res.* 86, 683-93.
- Lieberman, M. A., Marks, A. D., 2008. *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*, vol. Lippincott Williams & Wilkins.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-275.
- Matthews, R. T., Yang, L. C., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Rosen, B. R., Kaddurah-Daouk, R., Beal, M. F., 1998. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 18, 156-163.
- Mayatepek, E., Hoffmann, G. F., Baumgartner, R., Schulze, A., Jakobs, C., Trefz, F. K., Bremer, H. J., 1996. Atypical vitamin B12-unresponsive methylmalonic aciduria in sibship with severe progressive encephalomyelopathy: a new genetic disease? *Eur J Pediatr.* 155, 398-403.
- Mayatepek, E., Kurczynski, T. W., Hoppel, C. L., 1991. Long-term L-carnitine treatment in isovaleric acidemia. *Pediatr Neurol.* 7, 137-40.
- Menao, S., Lopez-Vinas, E., Mir, C., Puisac, B., Gratacos, E., Arnedo, M., Carrasco, P., Moreno, S., Ramos, M., Gil, M. C., Pie, A., Ribes, A., Perez-Cerda, C., Ugarte, M., Clayton, P. T., Korman, S. H., Serra, D., Asins, G., Ramos, F. J., Gomez-Puertas, P., Hegardt, F. G., Casals, N., Pie, J., 2009. Ten novel HMGCL mutations in 24 patients of different origin with 3-hydroxy-3-methyl-glutaric aciduria. *Hum Mutat.* 30, E520-9.

- Mendiola, J., Jr., Robotham, J. L., Liehr, J. G., Williams, J. C., 1984. Neonatal lethargy due to isovaleric acidemia and hyperammonemia. *Tex Med.* 80, 52-4.
- Millington, D. S., Kodo, N., Norwood, D. L., Roe, C. R., 1990. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 13, 321-4.
- Mohsen, A. W., Anderson, B. D., Volchenboum, S. L., Battaile, K. P., Tiffany, K., Roberts, D., Kim, J. J., Vockley, J., 1998. Characterization of molecular defects in isovaleryl-CoA dehydrogenase in patients with isovaleric acidemia. *Biochemistry.* 37, 10325-35.
- Morris, A. A., 2005. Cerebral ketone body metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 28, 109-21.
- Naglak, M., Salvo, R., Madsen, K., Dembure, P., Elsas, L., 1988. The treatment of isovaleric acidemia with glycine supplement. *Pediatr Res.* 24, 9-13.
- Nasser, I., Mohsen, A. W., Jelesarov, I., Vockley, J., Macheroux, P., Ghisla, S., 2004. Thermal unfolding of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase and iso(3)valeryl-CoA dehydrogenase: study of the effect of genetic defects on enzyme stability. *Biochim Biophys Acta.* 1690, 22-32.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*, vol. W. H. Freeman.
- O'Gorman, E., Beutner, G., Wallimann, T., Brdiczka, D., 1996. Differential effects of creatine depletion on the regulation of enzyme activities and on creatine-stimulated mitochondrial respiration in skeletal muscle, heart, and brain. *Biochim Biophys Acta.* 1276, 161-70.
- Oldendorf, W. H., 1971. Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol.* 221, 1629-39.
- Orth, M., Schapira, A. H., 2001. Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet.* 106, 27-36.
- Parker, W. D., Jr., Boyson, S. J., Luder, A. S., Parks, J. K., 1990. Evidence for a defect in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Huntington's disease. *Neurology.* 40, 1231-4.
- Parker, W. D., Jr., Parks, J., Filley, C. M., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., 1994. Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology.* 44, 1090-6.



- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, vol. Academic Press, San Diego.
- Pie, J., Lopez-Vinas, E., Puisac, B., Menao, S., Pie, A., Casale, C., Ramos, F. J., Hegardt, F. G., Gomez-Puertas, P., Casals, N., 2007. Molecular genetics of HMG-CoA lyase deficiency. *Mol Genet Metab.* 92, 198-209.
- Pospisilova, E., Mrazova, L., Hrda, J., Martincova, O., Zeman, J., 2003. Biochemical and molecular analyses in three patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *J Inherit Metab Dis.* 26, 433-41.
- Poston, J. M., 1984. The relative carbon flux through the alpha- and the beta-keto pathways of leucine metabolism. *J Biol Chem.* 259, 2059-61.
- Rashed, M., Ozand, P. T., al Aqeel, A., Gascon, G. G., 1994. Experience of King Faisal Specialist Hospital and Research Center with Saudi organic acid disorders. *Brain Dev.* 16 Suppl, 1-6.
- Renkawek, K., Renier, W. O., de Pont, J. J., Vogels, O. J. M., Gabreels, F. J. M., 1992. Neonatal status convulsivus, spongiform encephalopathy, and low activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATpase in the brain. *Epilepsia.* 33, 58-64.
- Ribeiro, C. A. J., Grando, V., Dutra, C. S., Wannmacher, C. M. D., Wajner, M., 2006. Evidence that quinolinic acid severely impairs energy metabolism through activation of NMDA receptors in striatum from developing rats. *J Neurochem.* 99, 1531-1542.
- Roe, C. R., Millington, D. S., Maltby, D. A., Kahler, S. G., Bohan, T. P., 1984. L-carnitine therapy in isovaleric acidemia. *J Clin Invest.* 74, 2290-5.
- Rosenthal, R. E., Hamud, F., Fiskum, G., Varghese, P. J., Sharpe, S., 1987. Cerebral ischemia and reperfusion - prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J Cereb Blood Flow Metab.* 7, 752-758.
- Ruesch, S., Krahenbuhl, S., Kleinle, S., Liechti-Gallati, S., Schaffner, T., Wermuth, B., Weber, J., Wiesmann, U. N., 1996. Combined 3-methylglutaconic and 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria with endocardial fibroelastosis and dilatative cardiomyopathy in male and female siblings with partial deficiency of complex II/III in fibroblasts. *Enzyme Protein.* 49, 321-9.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J. M., Munnich, A., 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta.* 228, 35-51.

- Saks, V. A., Kuznetsov, A. V., Kupriyanov, V. V., Miceli, M. V., Jacobus, W. E., 1985. Creatine kinase of rat heart mitochondria. The demonstration of functional coupling to oxidative phosphorylation in an inner membrane-matrix preparation. *J Biol Chem.* 260, 7757-64.
- Satoh, E., Nakazato, Y., 1992. On the mechanism of ouabain-induced release of acetylcholine from synaptosomes. *J Neurochem.* 58, 1038-1044.
- Saudubray, J. M., Sedel, F., Walter, J. H., 2006. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. *J Inherit Metab Dis.* 29, 261-74.
- Schapira, A. H. V., Mann, V. M., Cooper, J. M., Dexter, D., Daniel, S. E., Jenner, P., Clark, J. B., Marsden, C. D., 1990. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (Complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 55, 2142-2145.
- Schlegel, J., Zurbriggen, B., Wegmann, G., Wyss, M., Eppenberger, H. M., Wallimann, T., 1988. Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. I. Isolation of two interconvertible mitochondrial creatine kinase forms, dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase: characterization, localization, and structure-function relationships. *J Biol Chem.* 263, 16942-53.
- Schnyder, T., Gross, H., Winkler, H., Eppenberger, H. M., Wallimann, T., 1991. Structure of the mitochondrial creatine kinase octamer: high-resolution shadowing and image averaging of single molecules and formation of linear filaments under specific staining conditions. *J Cell Biol.* 112, 95-101.
- Schuck, P. F., Leipnitz, G., Ribeiro, C. A., Dalcin, K. B., Assis, D. R., Barschak, A. G., Pulrolnik, V., Wannmacher, C. M., Wyse, A. T., Wajner, M., 2002. Inhibition of creatine kinase activity in vitro by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. *Neurochem Res.* 27, 1633-9.
- Sriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., 2001. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, vol. McGraw-Hill Inc, New York.
- Sestili, P., Martinelli, C., Bravi, G., Piccoli, G., Curci, R., Battistelli, M., Falcieri, E., Agostini, D., Gioacchini, A. M., Stocchi, V., 2006. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med.* 40, 837-49.
- Shih, V. E., Aubry, R. H., DeGrande, G., Gursky, S. F., Tanaka, K., 1984. Maternal isovaleric acidemia. *J Pediatr.* 105, 77-8.

- Shoji, Y., Takahashi, T., Sawaishi, Y., Ishida, A., Matsumori, M., Enoki, M., Watanabe, H., Takada, G., 1999. 3-Methylglutaconic aciduria type I: clinical heterogeneity as a neurometabolic disease. *J Inherit Metab Dis.* 22, 1-8.
- Singh, P., Jain, A., Kaur, G., 2004. Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol Cell Biochem.* 260, 153-9.
- Sogut, A., Acun, C., Aydin, K., Tomac, N., Demirel, F., Aktuglu, C., 2004. Isovaleric acidemia: cranial CT and MRI findings. *Pediatr Radiol.* 34, 160-2.
- Solano, A. F., Leipnitz, G., De Bortoli, G. M., Seminotti, B., Amaral, A. U., Fernandes, C. G., Latini, A. S., Dutra, C. S., Wajner, M., 2008. Induction of oxidative stress by the metabolites accumulating in isovaleric acidemia in brain cortex of young rats. *Free Radic. Res.* 42, 707-715.
- Sperl, W., Jesina, P., Zeman, J., Mayr, J. A., Demeirleir, L., VanCoster, R., Pickova, A., Hansikova, H., Houst'kova, H., Krejcik, Z., Koch, J., Smet, J., Muss, W., Holme, E., Houstek, J., 2006. Deficiency of mitochondrial ATP synthase of nuclear genetic origin. *Neuromuscul Disord.* 16, 821-9.
- Stachowiak, O., Dolder, M., Wallimann, T., Richter, C., 1998. Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. *J Biol Chem.* 273, 16694-9.
- Suh, S. W., Hamby, A. M., Swanson, R. A., 2007. Hypoglycemia, brain energetics, and hypoglycemic neuronal death. *Glia.* 55, 1280-6.
- Sweadner, K. J., 1979. Two molecular forms of Na<sup>+</sup>-stimulated + K<sup>+</sup>-stimulated ATPase in brain - Separation and difference in affinity for Strophanthidin *J Biol Chem.* 254, 6060-6067.
- Sweetman, L., Williams, J. C., Disorders of branched-chain amino acid and organic acid metabolism. In: C. R. Scriver, et al., Eds., *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.* vol. II, 2001, pp. 2125-2159.
- Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Cassarino, D. S., Maguire, D. J., Maguire, R. S., Bennett, J. P., Jr., Davis, R. E., Parker, W. D., Jr., 1997. Cybrids in Alzheimer's disease: a cellular model of the disease? *Neurology.* 49, 918-25.
- Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Miller, S. W., Tuttle, J. B., Trimmer, P. A., Sheehan, J. P., Bennett, J. P., Jr., Davis, R. E., Parker, W. D., Jr., 1996. Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 40, 663-71.

- Tanaka, K., 1986. *Inborn errors of branched-chain amino acid metabolism*, vol. Elsevier, New York.
- Tanaka, K., 1990. Isovaleric acidemia: personal history, clinical survey and study of the molecular basis. *Prog Clin Biol Res.* 321, 273-290.
- Tanaka, K., Budd, M. A., Efron, M. L., Isselbacher, K. J., 1966. Isovaleric acidemia - A new genetic defect of leucine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 56, 236-&.
- Tanaka, K., Isselbacher, K. J., 1967. Isolation and identification of N-isovalerylglycine from urine of patients with isovaleric acidemia. *J Biol Chem.* 242, 2966-&.
- Tanaka, K., Orr, J. C., Isselbacher, K. J., 1968. Identification of beta-hydroxyisovaleric acid in the urine of a patient with isovaleric acidemia. *Biochim Biophys Acta.* 152, 638-41.
- Tanaka, K., Rosenberg, L. E., 1983. *Disorders of branched chain amino acid and organic acid metabolism*, vol. McGraw-Hill, New York.
- Tanaka, K., West-Dull, A., Hine, D. G., Lynn, T. B., Lowe, T., 1980. Gas-chromatographic method of analysis for urinary organic acids. II. Description of the procedure, and its application to diagnosis of patients with organic acidurias. *Clin Chem.* 26, 1847-53.
- Tsakiris, S., Deliconstantinos, G., 1984. Influence of phosphatidylserine on (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes. *Biochem J.* 220, 301-307.
- van der Knaap, M. S., Bakker, H. D., Valk, J., 1998. MR imaging and proton spectroscopy in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase deficiency. *AJNR Am J Neuroradiol.* 19, 378-82.
- Vargas, C. R., Sitta, A., Schmitt, G., Ferreira, G. C., Cardoso, M. L., Coelho, D., Gibson, K. M., Wajner, M., 2007. Incidence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase (HL) deficiency in Brazil, South America. *J Inherit Metab Dis.*
- Venkataraman, P., Krishnamoorthy, G., Selvakumar, K., Arunakaran, J., 2009. Oxidative stress alters creatine kinase system in serum and brain regions of polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254)-exposed rats: protective role of melatonin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 105, 92-7.
- Vockley, J., Ensenuer, R., 2006. Isovaleric acidemia: New aspects of genetic and phenotypic heterogeneity. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 142C, 95-103.
- Wallace, D. C., 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 283, 1482-8.

- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., Eppenberger, H. M., 1992. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J.* 281 ( Pt 1), 21-40.
- Wheeler, K. P., Walker, J. A., Barker, D. M., 1975. Lipid requirement of membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-dependent adenosine triphosphate system. *Biochem J.* 146, 713-722.
- Williams, K. M., Peden, V. H., Hillman, R. E., 1981. Isovalericacidemia appearing as diabetic ketoacidosis. *Am J Dis Child.* 135, 1068-9.
- Wilson, W. G., Audenaert, S. M., Squillaro, E. J., 1984. Hyperammonaemia in a preterm infant with isovaleric acidemia. *J Inherit Metab Dis.* 7, 71.
- Wortmann, S., Rodenburg, R. J., Huizing, M., Loupatty, F. J., de Koning, T., Kluijtmans, L. A., Engelke, U., Wevers, R., Smeitink, J. A., Morava, E., 2006. Association of 3-methylglutaconic aciduria with sensori-neural deafness, encephalopathy, and Leigh-like syndrome (MEGDEL association) in four patients with a disorder of the oxidative phosphorylation. *Mol Genet Metab.* 88, 47-52.
- Wortmann, S. B., Rodenburg, R. J., Jonckheere, A., de Vries, M. C., Huizing, M., Heldt, K., van den Heuvel, L. P., Wendel, U., Kluijtmans, L. A., Engelke, U. F., Wevers, R. A., Smeitink, J. A., Morava, E., 2009. Biochemical and genetic analysis of 3-methylglutaconic aciduria type IV: a diagnostic strategy. *Brain.* 132, 136-46.
- Wyse, A. T. D., Streck, E. L., Worm, P., Wajner, A., Ritter, F., Netto, C. A., 2000. Preconditioning prevents the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res.* 25, 971-975.
- Wysocki, S. J., Hahnel, R., 1976. 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria: deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase. *Clin Chim Acta.* 71, 349-51.
- Yalcinkaya, C., Dincer, A., Gunduz, E., Ficicioglu, C., Kocer, N., Aydin, A., 1999. MRI and MRS in HMG-CoA lyase deficiency. *Pediatr Neurol.* 20, 375-80.
- Yousef, M. I., El-Hendy, H. A., El-Demerdash, F. M., Elagamy, E. I., 2002. Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. *Toxicology.* 175, 223-34.

- Yu, S. P., 2003. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem Pharmacol.* 66, 1601-1609.
- Yilmaz, Y., Ozdemir, N., Ekinci, G., Baykal, T., Kocaman, C., 2006. Corticospinal tract involvement in a patient with 3-HMG coenzyme A lyase deficiency. *Pediatr Neurol.* 35, 139-41.
- Zafeiriou, D. I., Vargiami, E., Mayapetek, E., Augoustidou-Savvopoulou, P., Mitchell, G. A., 2007. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a lyase deficiency with reversible white matter changes after treatment. *Pediatr Neurol.* 37, 47-50.