



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

**EFEITOS DO ÁCIDO METILMALÔNICO (MMA) SOBRE PARÂMETROS
ASTROGLIAIS EM CÉLULAS C6**

Rômulo Rodrigo de Souza Almeida

Orientador: Prof. André Quincozes dos Santos

Coorientador: Prof. Guilhian Leipnitz

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigo de Svoza Almeida, Rômulo
EFEITOS DO ÁCIDO METILMALÔNICO (MMA) SOBRE
PARÂMETROS ASTROGLIAIS EM CÉLULAS C6 / Rômulo Rodrigo
de Svoza Almeida. -- 2022.
99 f.
Orientador: André Quincozes dos Santos.

Coorientador: Guilhian Leipniz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Ácido metilmalônico (MMA). 2. Células
astrogliais C6. 3. Resposta Inflamatória. 4.
Glioproteção. I. Quincozes dos Santos, André, orient.
II. Leipniz, Guilhian, coorient. III. Título.

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

**EFEITOS DO ÁCIDO METILMALÔNICO (MMA) SOBRE PARÂMETROS
ASTROGLIAIS EM CÉLULAS C6**

Rômulo Rodrigo de Souza Almeida

Orientador: Prof. André Quincozes dos Santos

Coorientador: Prof. Guilhian Leipnitz

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

2022

Dedico esta tese ao meus pais, Luzinete e Edilberto (em memória).
Além de todos os familiares e pacientes com acidemia metilmalônica.

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas”.

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me deu fé e esperança pela jornada que foi o meu Doutorado.

A UFRGS que me proporcionou um mundo experimental impressionante. A CAPES, CNPq e FAPERGS que me proporcionaram a bolsa e financiamento para poder realizar todos os experimentos. Ao Departamento de Bioquímica por fornecer as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

Tenho certeza de que jamais chegaria até aqui sozinho. Durante o Doutorado, conheci muitas pessoas, fiz diversos colegas e amigos, para muitos eu já disse pessoalmente, mas gostaria de destacar alguns.

Ao meu orientador, um grande OBRIGADO André Quincozes, por ter me recebido como aluno, por nunca deixar de batalhar por financiamento para realização de experimentos, por todo o conhecimento transmitido, pela dedicação desde a sala de aula ao laboratório, paciência, torcida, excelência, disponibilidade quando foi necessário e pela imensurável contribuição na minha formação profissional.

A minha coorientadora especial Larissa Bobermin, OBRIGADO pelo orquestramento e ensino experimental, pela fonte infinita de conhecimentos, por estar sempre disponível a qualquer momento, para tirar qualquer dúvida de qualquer experimento, assim como transmitir conhecimento. Grande parte do que foi feito nesta tese tem a sua participação e dedicação.

Ao meu coorientador Guilhian, por todo conhecimento sobre erros inatos, pela gentileza, tranquilidade, transmissão de conhecimentos, incentivo e ensinamentos aprendidos no seu laboratório.

A todos os colaboradores envolvidos nos artigos.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica, que sempre me receberam bem quando precisei estar em outros laboratórios.

A Cleia, que sempre esteve disponível com eficiência para ajudar na burocracia e qualquer coisa necessária. Giordano sempre dando suporte na secretaria, e pôr fim a Silvana, sempre com um sorriso ao entrar no Departamento.

Aos colegas e amigos que estão e estiveram no LABGLIO: Mila, Ricardo, Iza, Naithan, Bethina, Fernanda, Aline, Dani, Matheus, Giancarlo, Esterzinha, Livia e Lara. Em especial, destaco os amigos que além de contribuir no laboratório, ganhei para o resto da vida: Filipe, Nat, Amandita e Van.

Aos colegas e amigos do Lab 28: Betão, Bruninha, Fernanda, Igor, Marina, Yasmine, Fe, Luciele, Adriano, Aline, Debora, Andrea, Priscila, Lu e Rafael. Obrigado pelos momentos divertidos que passamos.

Amigos que fiz pelos churrascos e corredores da Bioquímica: Lucas, Ju, Pati, Vinicius, Nico, Léo, Cleverson e Vini. Aos queridos Carol, Rafinha (em memória), aos irmãos que fiz na minha vida Vítinho e Robertinha.

Aos amigos do lab de mestrado por tantos momentos de alegria e vibraram por mim: Dafiny, Jota, Ivanice, Diego, Erika e Raulzito.

Aos amigos de graduação Dani, Magno, Gabi, Luciene e Rosemary. Por toda a amizade ao longo de muitos anos.

Aos amigos queridos Andrea e Ualcio por tantos momentos incríveis mesmo à distância. Aos amigos do IMT-RN por sempre proporcionarem momentos de alegria e diversão.

Aos primos (as) e tios (as) que sempre torceram por mim.

A minhas irmãs, sobrinhos e cunhados que sempre deram todo suporte e incentivo para que chegasse até aqui, sem dúvida o percurso foi menos difícil ao lado de vocês.

A meu pai (em memória) que perdi nessa trajetória... mas que me deu desde o primeiro dia todo apoio, amor, alegria, torcida e sempre estava feliz quando vinha me visitar. Por ter sido além de um grande Profissional, foi meu fã e meu ídolo. A minha mãe que me proporcionou uma base e firme na educação, responsabilidade, respeito, amor e carinho para que ao longo deste caminho profissional houvesse uma vitória e ela chegou em forma de tese.

SUMÁRIO

PARTE I.....	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
INTRODUÇÃO.....	6
1. Erros inatos do metabolismo e acidemias orgânicas.....	6
1.1 Acidemia metilmalônica e ácido metilmalônico	7
2. Células gliais.....	10
2.1 Células astrogliais C6.....	11
2.2 Sistema glutamatérgico	12
3. Homeostase redox.....	13
4. Resposta inflamatória.....	15
5. Melatonina	17
6. Resveratrol	18
JUSTIFICATIVA	21
OBJETIVOS	22
Objetivo geral	22
Objetivos específicos.....	22
PARTE II.....	23
CAPÍTULO I	24
CAPÍTULO II.....	40
PARTE III.....	54
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÕES.....	73

PERSPECTIVAS	74
APOIO FINANCEIRO	75
REFERÊNCIAS	76
LISTA DE FIGURAS	89

PARTE I

RESUMO

A acidemia metilmalônica é uma doença neurometabólica bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo do ácido metilmalônico (MMA) em diferentes tecidos, inclusive no sistema nervoso central (SNC). Os pacientes com este erro inato do metabolismo (EIM) apresentam, ao longo da vida, crises de descompensação metabólica com altos níveis de MMA nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes, que podem chegar até 5 mM no SNC, gerando significativos prejuízos neurológicos. As células astrogliais apresentam várias funções, como manutenção da homeostase glutamatérgica, defesa antioxidante e resposta inflamatória. Considerando a importância destas células, tanto em condições fisiológicas, quanto em situações de dano, nesta tese buscamos investigar os efeitos do MMA sobre parâmetros gliais, em dois tempos de exposição: 24 e 48 h. No capítulo I, observamos que o MMA (5 mM, 48 h) induziu uma redução nos níveis de MTT, indicativo de viabilidade celular, bem como nos níveis extracelulares de glutamato e glutamina, e um aumento na captação de glutamato, na atividade da enzima glutamina sintetase (GS) e nos níveis de RNAm do fator nuclear da cadeia κ de linfócitos B (NF κ B) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). No segundo capítulo da tese, a exposição de MMA em células C6 por 24 h diminuiu a redução de MTT, os níveis de glutathiona (GSH), a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx), e os níveis de RNAm do coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 α) e dos receptores de adenosina. Ainda, o MMA aumentou a expressão dos mediadores inflamatórios fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), ciclo-oxigenase 2 (COX-2), iNOS, fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), NF κ B, p21 e aquaporina 4 (AQP-4). Dessa forma, nossos resultados apontam efeitos diretos do MMA sobre parâmetros astrogliais, relacionados ao metabolismo glutamatérgico, resposta inflamatória e homeostasia redox, apoiando a ideia de que as alterações nas células astrogliais podem estar associadas à neurotoxicidade do MMA. Além disso, no capítulo II, demonstramos também que a melatonina e o resveratrol foram capazes de prevenir o aumento dos níveis extracelulares de TNF- α e IL-1 β , bem como a diminuição nos níveis de GSH, induzidos por MMA, podendo assim atuar como estratégias glioprotetoras frente aos danos induzidos por este ácido orgânico.

Palavras-chave: Ácido metilmalônico, células astrogliais C6, homeostase glutamatérgica, resposta inflamatória, estresse oxidativo, glioproteção.

ABSTRACT

Methylmalonic acidemia is a neurometabolic disorder biochemically characterized by the accumulation of methylmalonic acid (MMA) in different tissues, including in the central nervous system (CNS). Patients with this inborn error of metabolism (IEM) have lifelong crises of metabolic decompensation with high levels of MMA, which can reach up to 5 mM in the CNS, causing significant neurological damage. Astroglial cells have several functions, such as maintenance of glutamatergic homeostasis, antioxidant defense and inflammatory response. Considering the relevance of these cells in physiological and pathological conditions, in this thesis we aim to investigate the effects of MMA on astroglial parameters, at two exposure times: 24 and 48 h. In the Chapter I, we observed that MMA (5 mM, 48 h) induced a decrease in MTT levels, indicative of cell viability, as well as in extracellular levels of glutamate and glutamine, and an increase in glutamate uptake, in the glutamine synthetase (GS) activity, and in the mRNA levels of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). In the Chapter II, MMA exposure in C6 cells for 24 h decreased the levels of MTT, and glutathione (GSH), the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), as well as the mRNA levels of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α) and adenosine receptors. In addition, MMA increased the expression of inflammatory markers tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), cyclooxygenase 2 (COX-2), iNOS, nuclear factor erythroid 2-related to factor 2 (Nrf2), NFκB, p21, and aquaporin 4 (AQP-4). Therefore, our results point to direct effects of MMA on astroglial parameters, related to glutamatergic metabolism, inflammatory response, and redox homeostasis, supporting the idea that changes in astroglial cells may be associated with the toxic effects of MMA on the CNS. Furthermore, in Chapter II, we also demonstrated that melatonin and resveratrol were able to prevent the increase in extracellular levels of TNF-α and IL-1β, as well as the decrease in the GSH levels, induced by MMA, indicating their potential glioprotective effects against the damage induced by this organic acid.

Keywords: Methylmalonic acid, C6 astroglial cells, glutamatergic homeostasis, inflammatory response, oxidative stress, glioprotection.

LISTA DE ABREVIATURAS

AQP-4	Aquaporina 4
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
EAAC1	Carreador de aminoácidos excitatórios 1
EIM	Erros inatos do metabolismo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
GCL	Glutamato cisteína ligase
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLAST	Transportador glutamato-aspartato
GLT1	Transportador de glutamato tipo 1
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutationa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO1	Heme oxigenase 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
MMA	Ácido metilmalônico
MUT	Metilmalonil-CoA mutase

NFκB	Fator nuclear da cadeia κ de linfócitos B
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
PGC1-α	Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SOD1	Superóxido dismutase 1
SOD2	Superóxido dismutase 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α

INTRODUÇÃO

1. Erros inatos do metabolismo e acidemias orgânicas

Os erros inatos do metabolismo (EIM) foram descritos pela primeira vez por um médico e químico inglês, Sir Archibald Edward Garrod (Mak, Lee et al. 2013). Através de seus estudos com indivíduos portadores da alcaptonúria, ele descreveu a influência da individualidade química e os efeitos da consanguinidade sobre a geração de fenótipos distintos observados nos EIM (Garrod 1996). Os EIM incluem um grande grupo de distúrbios hereditários originados por um defeito em uma proteína, geralmente uma enzima ou transportador, ou ainda em um cofator em uma via metabólica específica, resultando no acúmulo de metabólitos tóxicos e a deficiência de produtos importantes para a homeostase celular (Giugliani, Dutra-Filho et al. 1989, Matalonga, Gort et al. 2017, Wajner 2019).

Individualmente os EIM são raros, mas coletivamente apresentam um grupo diverso de mais de 1000 doenças (Ferreira, van Karnebeek et al. 2019). Existe uma discrepância na literatura científica global referente a incidência geral dos EIM, provavelmente devido aos diferentes métodos de triagem, dificuldade de identificação e região geográfica, relativos a mudanças entre os países. No entanto, segundo alguns estudos, a prevalência é estimada entre 1 a cada 800 – 2.500 nascidos vivos (Ghosh, Schlecht et al. 2017, Ismail, Showalter et al. 2019). Os EIM incluem várias alterações em vias bioquímicas como: defeitos no ciclo da ureia, distúrbios do metabolismo de aminoácidos, carboidratos, purinas e pirimidinas, defeitos na oxidação de ácidos graxos, alterações mitocondriais, alterações em neurotransmissores, bem como uma variedade de outros efeitos biológicos (Wajner 2019, Dimitrov, Molema et al. 2020).

Em uma das classificações estabelecidas para os EIM, eles são subdivididos em 130 grupos, dentre eles o das acidemias orgânicas. Aproximadamente 65 acidemias orgânicas são descritas, sendo que a sua incidência entre os EIM se aproxima de 1 em cada 3.000 nascidos vivos (Villani, Gallo et al. 2017). As acidemias orgânicas são descritas com a presença de elevados níveis de ácidos mono, di e/ou tri carboxílicos (ácidos orgânicos) e derivados ésteres de coenzima A, carnitina e/ou glicina, que são considerados tóxicos em altas concentrações (Ramsay, Morton et al. 2018, Tuncel, Boy et al. 2018). A origem dessas alterações são mutações em genes que codificam enzimas envolvidas no catabolismo de aminoácidos, carboidratos ou lipídeos (Vaidyanathan, Narayanan et al. 2011, Ramsay, Morton et al. 2018). Entretanto, é o excesso de ácidos orgânicos em fluidos corporais que geralmente causa desequilíbrio ácido-básico, que pode levar posteriormente a alterações celulares, bem como uma variedade de sintomas clínicos, principalmente neurológicos (Villani, Gallo et al. 2017).

1.1 Acidemia metilmalônica e ácido metilmalônico

A acidemia metilmalônica, é uma doença neurometabólica autossômica recessiva e multissistêmica, que afeta aproximadamente 1 em cada 50.000 a 100.000 recém-nascidos; entretanto, esta prevalência pode estar subestimada, uma vez que, como mencionado anteriormente, existe uma proporção de casos que provavelmente permanecem não diagnosticados (Baumgartner, Horster et al. 2014, Almasi, Guey et al. 2019). Esta acidemia orgânica é caracterizada pelo acúmulo do ácido metilmalônico (MMA) e seus metabólitos, causada pela deficiência da enzima metilmalonil-CoA mutase (MUT) e/ou seu cofator, a

cianocobalamina (Manoli, Sloan et al. 2005). O MMA é um ácido orgânico (dicarboxílico) endógeno, que é originado a partir da degradação de valina, isoleucina, treonina, metionina, colesterol e ácidos graxos de cadeia ímpar, sendo posteriormente convertido a succinato e requerido para produção energética no ciclo do ácido cítrico, como mostrado na Figura 1 (Zhou, Cui et al. 2018, Wajner 2019).

Existem diferentes fenótipos da doença, com início das manifestações clínicas podendo ocorrer desde os primeiros dias de vida até a idade adulta. Todos os pacientes apresentam fenótipos caracterizados por períodos saudáveis e intermitentes com episódios de descompensação metabólica, que podem estar relacionadas a outros sintomas como: infecções do trato respiratório superior, pneumonia e gastroenterite (Zwickler, Haege et al. 2012, Zhou, Cui et al. 2018). Clinicamente, um episódio de descompensação metabólica ocorre pela apresentação de alguns sintomas característicos: vômitos recorrentes, recusa alimentar e consciência prejudicada (Zwickler, Haege et al. 2012). Além destes sintomas, os pacientes podem apresentar: hiperamonemia, encefalopatia, insuficiências renal crônica e hepática, letargia, hipotonia, hipotermia, cetoacidose, trombocitopenia, desidratação, anorexia, retardo mental, coma, convulsão e déficit cognitivo (Manoli, Sloan et al. 2005, Zwickler, Haege et al. 2012, Fraser and Venditti 2016).

O diagnóstico é baseado na detecção de elevados níveis de MMA, ácido 3-hidroxiopropiônico, ácido metilcítrico, glicina e propionilcarnitina no sangue (Fowler, Leonard et al. 2008). O tratamento da acidemia metilmalônica

atualmente é realizado de acordo com os sintomas apresentados, com acompanhamento médico específico. Em períodos de crise, primeiramente é realizada a restrição da ingestão proteica (fundamentado na restrição dos aminoácidos que podem gerar o MMA), administração intravenosa de glicose, eliminação de metabólitos por hemodiálise e transfusão exsanguínea (Jafari, Braissant et al. 2013, Baumgartner, Horster et al. 2014). Posteriormente uma terapia deve ser orientada com a utilização de L-carnitina (50 – 300 mg/Kg/dia), cuja importância está relacionada ao fato dos metabólitos tóxicos se unirem a carnitina para serem excretados, como propionilcarnitina. A suplementação é feita com complexos de vitaminas, minerais e aminoácidos livres precursores de valina, isoleucina, treonina e metionina. Por fim, antibióticos como neomicina e metronidazol também podem reduzir a produção do MMA pelas bactérias intestinais (Manoli, Sloan et al. 2005).

O MMA pode ser produzido nos tecidos e transportado ao plasma e líquido cefalorraquidiano onde pode atingir concentrações entre 2.5 – 5.0 mmol/L em crises de descompensação metabólicas (Fontella, Pulrolnik et al. 2000, Kolker, Sauer et al. 2006). No entanto, as concentrações no cérebro podem atingir níveis mais altos, e o excesso do MMA pode ser extremamente tóxico podendo levar a distúrbios no sistema nervoso central (SNC) (Melo, Kowaltowski et al. 2011).

No SNC, o excesso de MMA induz alterações relacionadas ao globo pálido, gânglios da base, hipodesenvolvimento cerebelar, atrofia cortical, dilatação do ventrículo e anormalidades na substância branca (Wajner and Coelho 1997, Yang, Guo et al. 2020). Também são observadas alterações neurológicas originadas pelo acúmulo de MMA que podem ser correlacionadas bioquimicamente com a inibição do ciclo do ácido cítrico, aumento na captação

de glicose, aumento de lactato e diminuição de adenosina trifosfato (ATP) (Narasimhan, Sklar et al. 1996). Muitos estudos têm demonstrado os efeitos neurotóxicos do MMA em células neuronais (Proctor, Turton et al. 2020, da Costa, Dos Santos et al. 2021), no entanto, poucos estudos têm abordado efeitos deste composto sobre as células gliais.

2. Células gliais

As células gliais foram descritas há mais de um século, e inicialmente elas eram conhecidas apenas como elementos celulares que davam suporte aos neurônios no SNC. No entanto, ao longo dos anos, outros estudos foram caracterizando a diversidade celular e funcional destas células, que são subdivididas principalmente em: astrócitos, oligodendrócitos e microglia (Parpura, Heneka et al. 2012).

Os astrócitos são as células gliais mais numerosas e diversificadas no SNC. Estas células são conhecidas por sua versatilidade e dinâmica, representando um elemento chave na homeostase cerebral, tanto em condições fisiológicas como em situações de dano (Verkhratsky, Nedergaard et al. 2015). As principais funções desempenhadas por estas células são: manutenção e homeostase de neurotransmissores, suporte metabólico através do ciclo glutamato-glutamina e do metabolismo da glicose, manutenção da homeostase de íons extracelulares, síntese e secreção de fatores tróficos e gliotransmissores, defesa antioxidante, participação na resposta inflamatória, através da produção e liberação de citocinas (Wang and Bordey 2008, Belanger, Allaman et al. 2011, Quincozes-Santos, Bobermin et al. 2014, Filous and Silver

2016, Argente-Arizon, Guerra-Cantera et al. 2017, Verkhatsky and Nedergaard 2018).

2.1 Células astrogliais C6

A linhagem celular C6 foi originada na década de 60 (Benda, Lightbody et al. 1968), a partir do isolamento de células de um glioma de rato Wistar-Furth, após injeções repetitivas com o agente alquilante, *N-nitrosometiluréia*. Após o isolamento, as células derivadas do sexto clone (por isso C6) foram plaqueadas e propagadas através de cultivo celular. Estas células têm sido empregadas para estudos neuroquímicos e constituem um modelo alternativo confiável para trabalhos baseados na resposta a agentes externos, possuindo uma vasta literatura como um modelo astrogliial (Bobermin, Quincozes-Santos et al. 2012, Galland, Seady et al. 2019). Após um determinado número de passagens (aproximadamente 100), estas células apresentam um perfil com características astrogliais, como a expressão da proteína S100 B, da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), atividade da enzima glutamina sintetase (GS) e transportadores de glutamato (Benda, Lightbody et al. 1968, Pfeiffer, Herschman et al. 1970, Quincozes-Santos, Bobermin et al. 2017).

Portanto, as células astrogliais C6 vêm sendo utilizadas amplamente para avaliar parâmetros astrogliais, como conteúdo de glutathiona (GSH), captação de glutamato, resposta a estresse oxidativo, resposta inflamatória e vias de sinalização. Neste sentido, vários trabalhos do nosso grupo têm confirmado sua relevância como modelo experimental *in vitro* de estudo de funções astrócitárias (Bobermin, Quincozes-Santos et al. 2012, Quincozes-Santos, Bobermin et al. 2014, Quincozes-Santos, Bobermin et al. 2017, Bobermin, Weber et al. 2020).

Por fim, ela representa uma ferramenta importante na prospecção de mecanismos bioquímicos, celulares e moleculares correlacionados a respostas astrogliais, em condições fisiológicas e patológicas.

2.2 Sistema glutamatérgico

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório encontrado no SNC. Ele desempenha um importante papel em diversas vias metabólicas e de sinalização, que são necessárias para homeostase neural, por isso ele tem sido estudado extensivamente tanto em condições fisiológicas, quanto de injúrias cerebrais (Meldrum 2000, Hertz 2006, McKenna, Stridh et al. 2016).

A liberação do glutamato é transitória na fenda sináptica neuronal e os seus níveis são finamente regulados pelos astrócitos (Andersen, Markussen et al. 2021). É importante ressaltar, que esse neurotransmissor exerce seu efeito excitatório através de receptores específicos: os ionotrópicos, que são canais iônicos permeáveis a cátions, e os metabotrópicos, que pertencem a família dos receptores acoplados a proteína G (Mayer and Armstrong 2004, Platt 2007, Traynelis, Wollmuth et al. 2010).

Os astrócitos são essenciais nas sinapses glutamatérgicas, pois desempenham um papel-chave na regulação da transmissão sináptica, através da captação, metabolismo e liberação deste neurotransmissor (Anderson and Swanson 2000, Schousboe and Waagepetersen 2005). Neste sentido, as concentrações extracelulares de glutamato são mantidas em níveis fisiológicos, através de dois principais transportadores astrocitários de alta afinidade, dependentes de sódio, conhecidos como transportador de glutamato tipo 1 (GLT1) e transportador glutamato-aspartato (GLAST) (Anderson and Swanson

2000). No entanto, as células astrogliais C6 expressam principalmente o transportador carreador de aminoácidos excitatórios 1 (EAAC1) (Murphy, Vines et al. 2009, Quincozes-Santos, Bobermin et al. 2017, Parkin, Udawela et al. 2018).

A GS é uma enzima majoritariamente astrocitária, o que a torna um marcador deste tipo de célula, desempenhando um papel fundamental no ciclo glutamato-glutamina, em relação a conversão do glutamato a glutamina (Hertz and Rothman 2017). A glutamina pode ser utilizada de várias formas como precursora de proteínas, ácidos nucleicos, purinas, pirimidinas, bem como fonte de carbono para oxidação em algumas células. Além disso, no SNC ela desempenha uma importante função em relação a transmissão glutamatérgica, atuando como precursora de glutamato e do ácido gama-aminobutírico (Newsholme, Lima et al. 2003, Newsholme, Procopio et al. 2003, Brusilow, Koehler et al. 2010).

3. Homeostase redox

O SNC mantém uma alta taxa metabólica, o que acarreta a geração de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), tornando-o mais vulnerável ao estresse oxidativo (Salim 2017). Tal condição está associada a um desequilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes, e no SNC os astrócitos são fundamentais na manutenção desta homeostasia redox (Chen, Qin et al. 2020). Assim, embora os astrócitos em certas condições patológicas possam ser uma das principais fontes de ERO, causando danos neurais, eles também produzem uma resposta antioxidante efetiva e que ajuda no controle do estresse oxidativo no SNC (Chen and Swanson 2003, Chen, Qin et al. 2020).

A GSH, o principal antioxidante não-enzimático presente nos astrócitos, atua em vários processos celulares para manutenção redox, metabolismo de nutrientes, proliferação celular e transdução sinal (Aquilano, Baldelli et al. 2014, McBean 2017). A síntese da GSH ocorre a partir da reação catalisada pela enzima a glutamato cisteína-ligase (GCL), que utiliza glutamato e cisteína para formar o dipeptídeo γ -glutamilcisteína, que juntamente com a glicina, através de uma reação catalisada pela glutathione sintetase, dará origem a GSH (Dringen 2000, Arus, Souza et al. 2017). Além disso, a glutathione peroxidase (GPx) converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água, oxidando a GSH a GSSG (Brigelius-Flohe and Maiorino 2013, Aquilano, Baldelli et al. 2014). A GSH é então regenerada pela enzima glutathione redutase (GR) por intermédio da oxidação do NADPH (McBean 2017).

Além do sistema antioxidante mencionado anteriormente, os astrócitos também apresentam enzimas importantes, como a superóxido dismutase (SOD) que dismuta o íon superóxido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a catalase que catalisa a redução do H_2O_2 a água e oxigênio molecular (Pisoschi and Pop 2015, Chen, Qin et al. 2020).

Em uma situação de dano oxidativo, pode ocorrer a indução de uma importante proteína, a heme oxigenase 1 (HO1), que é uma enzima que participa da defesa celular contra o estresse oxidativo e é um importante alvo terapêutico correlacionado com neuroproteção (Jazwa and Cuadrado 2010). A indução da HO1 por ERO está relacionada a ativação de vários fatores de transcrição, como o multifuncional fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) (Wegiel, Nemeth et al. 2014, Loboda, Damulewicz et al. 2016). O Nrf2 é um regulador chave em relação a resposta antioxidante, pois controla a expressão de

importantes genes citoprotetores (Ma 2013, Buendia, Michalska et al. 2016). Em condições fisiológicas, este fator de transcrição encontra-se inativo no citoplasma, sendo translocado ao núcleo para conter o dano redox (Giudice, Arra et al. 2010).

Mudanças no balanço redox também estão associadas ao coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PGC1- α), que está envolvido com a biogênese mitocondrial. O PGC1- α é um coativador que possui diversos alvos e é capaz de simultaneamente induzir a transcrição de muitos genes envolvidos no metabolismo energético e homeostase redox (Nijland, Witte et al. 2014, Rius-Perez, Torres-Cuevas et al. 2020).

4. Resposta inflamatória

Numerosos estudos suportam a relação interdependente entre o estresse oxidativo e a inflamação, e os astrócitos são fundamentais em ambos os processos (Rizor, Pajarillo et al. 2019, Sivandzade, Prasad et al. 2019). Um importante papel dos astrócitos é a vigilância imunológica, respondendo a lesões ou qualquer insulto, visto que eles são fontes de mediadores que vão impactar na resposta inflamatória no microambiente que os circundam (Jensen, Massie et al. 2013, Sofroniew 2014).

Durante o processo inflamatório ocorre a indução de importantes fatores de transcrição, como o fator nuclear da cadeia κ de linfócitos B (NF κ B). A ativação do NF κ B, por translocação do citoplasma para o núcleo, é essencial na regulação de diversos genes, que nas células gliais abrangem processos como a resposta a injúrias, controle central do metabolismo, captação do glutamato, além da resposta imune (Dresselhaus and Meffert 2019). O NF κ B na inflamação é

comumente ativado mediante estímulo celular apropriado, na maioria das vezes por sinais relacionados a patógenos ou estresse (Tak and Firestein 2001, Liu, Zhang et al. 2017). Neste sentido, no decorrer da resposta inflamatória, várias citocinas são induzidas a partir do estímulo do NFκB, como por exemplo, o fator de necrose tumoral tumoral-α (TNF-α).

Em desordens neurológicas, o TNF-α é liberado em grande quantidade pela microglia e pelos astrócitos (Sawada, Kondo et al. 1989, Frankola, Greig et al. 2011). Esta citocina é o primeiro sinal para recrutar outros mediadores que atuam na fase aguda da resposta inflamatória, como a interleucina 1β (IL-1β) (Zelova and Hosek 2013). A IL-1β é uma outra potente citocina pró-inflamatória, que pode ser secretada pela microglia e pelos astrócitos e, dentre outras funções, juntamente com o TNF-α, atua promovendo a ativação de outros mediadores, como a interleucina 6 (IL-6) (Jensen, Massie et al. 2013, Krasnow, Knoll et al. 2017). A IL-1β e IL-6 também podem trabalhar em conjunto para induzirem uma resposta imune sistêmica, e seu aumento é comumente observado em desordens neurológicas (Ng, Tam et al. 2018). Vale destacar também que a expressão das enzimas ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) está diretamente associada ao processo inflamatório (Minghetti 2004, Anavi and Tirosh 2020).

Durante a resposta inflamatória vários mecanismos celulares podem ser ativados concomitantemente. Dentro desse contexto, podem ocorrer alterações em relação ao sistema adenosinérgico. Fisiologicamente, a adenosina está envolvida em diversas funções, desde a inibição da ativação de leucócitos até proteção tecidual, durante processos inflamatórios (Hasko, Pacher et al. 2005, Boison, Chen et al. 2010). Os efeitos da adenosina são mediados, em parte por

sua interação e consequente ativação com os receptores adenosinérgicos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. No SNC a estimulação destes receptores está envolvida em funções como inibição de células nervosas, aumento de comunicação neuronal e em células gliais com a redução do processo inflamatório (Dare, Schulte et al. 2007, Hasko, Linden et al. 2008, Chen, Lee et al. 2014).

5. Melatonina

A busca por moléculas que tenham efeito anti-inflamatório e antioxidante pode representar uma estratégica terapêutica para diversas doenças, como a acidemia metilmalônica, particularmente em relação as alterações no SNC. A melatonina é uma indolamina, produzida principalmente pela glândula pineal e em outros locais como: retina, plaquetas, células da medula espinhal, cerebelo, pele e no trato gastrointestinal (Reiter, Mayo et al. 2016).

Os papéis fisiológicos deste hormônio no corpo humano são variados. A função mais conhecida é a cronobiológica, no entanto estudos mostram que esta molécula tem outras propriedades importantes e benéficas (Baburina, Lomovsky et al. 2021). Sabe-se que a melatonina possui receptores em vários outros tecidos e por isso tem-se observado uma versatilidade funcional sobre os sistemas cardiovascular, endócrino, gastrointestinal, imunológico e neural (Hardeland, Cardinali et al. 2011, Mahmood 2019). A ampla funcionalidade da melatonina pode ser explicada pelas características lipofílicas e hidrofílicas, que permitem que ela atravesse membranas biológicas facilmente (Tarocco, Carocchia et al. 2019). Portanto, a melatonina tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), podendo agir como um agente neuroprotetor (Alghamdi 2018).

A melatonina tem uma ação eficaz como antioxidante, pois pode atuar de várias formas, detoxificando diretamente os radicais livres, estimulando e aumentando a eficiência de outras moléculas antioxidantes, como a GSH, e ainda aumentando a fosforilação oxidativa mitocondrial (Reiter, Tan et al. 2003, NaveenKumar, Hemshekhar et al. 2020).

A melatonina também desempenha um papel importante na inflamação, provavelmente devido a interação entre sítios de ligação específicos localizados em macrófagos e linfócitos (Esposito and Cuzzocrea 2010). Estudos têm mostrado que a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 pode ser atenuada pela melatonina em modelos experimentais de inflamação, assim como a melatonina também pode inibir fatores de transcrição que estão envolvidos com a produção de citocinas pró-inflamatórias (Sanchez-Lopez, Ortiz et al. 2018, Arioiz, Tastan et al. 2019, Tarocco, Carocchia et al. 2019). Muitos estudos também destacam o importante papel neuroprotetor da melatonina, através da modulação de vias de sinalização e na melhora de sintomas em desordens neurológicas (Lee, Woo et al. 2019). Além disso, alguns estudos clínicos tem mostrado que ela age como uma competente e promissora ferramenta terapêutica em doenças neurodegenerativas (Alghamdi 2018, Chen, Zhang et al. 2020).

6. Resveratrol

O resveratrol é um polifenol natural que está presente em algumas plantas, como: uvas, amendoim, mirtilo, morango, amora e ainda em grandes quantidades no vinho tinto. O resveratrol é encontrado nas isoformas *cis* e *trans*, sendo o isômero *trans* o principal responsável por seus efeitos biológicos

(Galiniak, Aebisher et al. 2019). Embora este polifenol apresente importantes e diversificadas ações, ainda não foi descrito um receptor específico para ele, contudo ele modula importantes vias de sinalização a nível celular e molecular (Berman, Motechin et al. 2017).

Estudos evidenciam que o resveratrol pode prevenir ou amenizar danos em doenças como: câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e isquemia (Baur and Sinclair 2006, Singh, Singh et al. 2019). Dentro deste contexto, o SNC é um importante alvo do resveratrol, pois ele atravessa a BHE (Lange and Li 2018). Uma ampla gama de estudos em desordens neurodegenerativas tem mostrado que o resveratrol além de efeito neuroprotetor também apresenta um efeito glioprotetor, sendo estes efeitos mediados por vias de sinalização como Nrf2 e HO1, bem como por efeito direto (Quincozes-Santos, Andreazza et al. 2010, Bastianetto, Menard et al. 2015, Bobermin, Hansel et al. 2015, Quincozes-Santos, Santos et al. 2021).

A função antioxidante do resveratrol é, possivelmente, a mais difundida. Funcionalmente, esta atividade consiste no efeito “scavenger” (sequestrador) direto de radicais livres e metais exercida pelo resveratrol, além da inibição de genes que codificam proteínas/enzimas pró-oxidantes ou pela indução de sistemas antioxidantes (Bellaver, Souza et al. 2014, Grinan-Ferre, Bellver-Sanchis et al. 2021). Neste sentido, nosso grupo vem mostrando que o resveratrol modula a função antioxidante nas células astrogliais (Quincozes-Santos, Andreazza et al. 2007, Quincozes-Santos, Nardin et al. 2009, Arus, Souza et al. 2017, Bobermin, Souza et al. 2018, Dias, de Souza Almeida et al. 2022).

Outro efeito significativo do resveratrol é a sua ação anti-inflamatória em desordens neurológicas (Moussa, Hebron et al. 2017, Malaguarnera 2019, Tian, Fan et al. 2020). Nosso grupo também tem demonstrado através de diferentes modelos experimentais a eficiência do resveratrol em reduzir a inflamação, através da modulação de fatores de transcrição e de citocinas pró-inflamatórias (Bobermin, Quincozes-Santos et al. 2012, Bellaver, Souza et al. 2015, Bobermin, Roppa et al. 2019). Desta forma, o resveratrol surge como um potencial agente glioprotetor, frente a exposição das células astrogliais a agentes gliotóxicos e representa dessa maneira uma importante estratégia terapêutica para desordens neurológicas.

JUSTIFICATIVA

A acidemia metilmalônica é caracterizada pelo acúmulo tecidual do metabólito MMA e disfunções neurológicas são importantes manifestações clínicas encontradas nos pacientes. Embora vários estudos indiquem efeitos tóxicos do MMA sobre diferentes tecidos, os mecanismos patofisiológicos pelos quais o MMA exerce efeitos no SNC ainda permanecem pouco conhecidos. Neste sentido, as células astrogliais contribuem eficientemente na manutenção fisiológica do SNC, pois participam de funções importantes como regulação e metabolismo de neurotransmissores, resposta inflamatória e defesa antioxidante. Portanto, torna-se extremamente relevante estudar as alterações neuroquímicas induzidas pelo MMA sobre parâmetros astrogliais, bem como, potenciais moléculas glioprotetoras, que podem atenuar os danos gliotóxicos sobre o SNC.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar os efeitos do MMA em células astrogliais C6, focando em parâmetros glutamatérgicos, da homeostase redox, resposta inflamatória, bem como as vias de sinalização envolvidas nestes efeitos. Potenciais estratégias glioprotetoras foram testadas frente ao insulto com MMA.

Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos do MMA na viabilidade celular, níveis de lactato extracelular, captação de glutamato, atividade da GS, níveis extracelulares de glutamato e glutamina em células astrogliais C6;
2. Investigar os efeitos do MMA sobre sistemas de defesa antioxidante e os mecanismos envolvidos nesta resposta em células astrogliais;
3. Estudar os efeitos do MMA sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, mediadores inflamatórios, receptores adenosinérgicos, proteína p21, proteína AQP-4 e vias de sinalização relacionadas a estes eventos em células astrogliais;
4. Investigar o potencial efeito glioprotetor da melatonina e do resveratrol sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias e níveis da GSH em células astrogliais expostas ao MMA.

PARTE II

CAPÍTULO I

Artigo submetido no periódico NeuroReport

**Methylmalonic acid increases glutamate uptake and glutamine synthetase
activity in C6 astroglial cells**

Rômulo Rodrigo de Souza Almeida, Larissa Daniele Bobermin, Krista Minéia
Wartchow, Fernanda Urruth Fontella, Diogo Onofre Souza, Moacir Wajner,
Carlos-Alberto Gonçalves, Guilhian Leipnitz, André Quincozes-Santos

CAPÍTULO II

Artigo publicado no periódico Amino Acids

doi.org/10.1007/s00726-022-03191-z

Methylmalonic acid induces inflammatory response and redox homeostasis disruption in C6 astroglial cells: potential glioprotective roles of melatonin and resveratrol

Rômulo Rodrigo de Souza Almeida, Larissa Daniele Bobermin, Belisa Parmeggiani, Krista Minéia Wartchow, Diogo Onofre Souza, Carlos-Alberto Gonçalves, Moacir Wajner, Guilhian Leipnitz, André Quincozes-Santos

PARTE III

DISCUSSÃO

A acidemia metilmalônica é um EIM de origem genética autossômica recessiva, causada pela deficiência na atividade da MUT ou por defeito na síntese do seu cofator, a cianocobalamina, levando ao acúmulo de ácidos orgânicos, principalmente o MMA, em fluidos biológicos e tecidos (Manoli, Sloan et al. 2005, Horster, Baumgartner et al. 2007).

Os pacientes com esta acidemia orgânica mesmo com protocolos rígidos de tratamento, comumente apresentam graus variados de sintomas desde hiperamonemia a letargia, epilepsia e déficit mental/psicomotor. Indivíduos acometidos pela acidemia metilmalônica também apresentam crises de descompensação metabólica, nas quais ocorre um aumento dos níveis de MMA, contribuindo assim para as alterações neurológicas. Exames de neuroimagem de pacientes mostram anormalidades nos gânglios da base, necrose do globo pálido, dilatação ventricular e atrofia cerebral (Yang, Guo et al. 2020).

O MMA é considerado o principal metabólito encontrado na acidemia metilmalônica e encontra-se acumulado no SNC devido à baixa permeabilidade da BHE aos ácidos dicarboxílicos (Melo, Kowaltowski et al. 2011, Melo, Mirandola et al. 2012). É válido lembrar que após ser produzido dentro dos tecidos, o MMA é transportado ao plasma e líquido cefalorraquidiano, onde pode atingir altos níveis (5 mM), principalmente em períodos de crises (Fontella, Pulrolnik et al. 2000). Neste sentido, as células astrogliais coordenam ativamente diversas funções no SNC, muitas mencionadas anteriormente, que visam a manutenção da homeostase cerebral, em condições fisiológicas ou patológicas (Maragakis and Rothstein 2006, Phatnani and Maniatis 2015). Portanto, disfunções nestas células podem contribuir para uma degeneração neural

induzida pelo MMA. Levando em consideração os fatores mencionados, acreditamos que a neurodegeneração na acidemia metilmalônica pode estar associada também com a inflamação, desregulação da homeostase redox e alterações no metabolismo glutamatérgico das células astrogliais.

Frente ao exposto acima, esta tese se propôs a avaliar alterações neuroquímicas induzidas pelo MMA sobre parâmetros astrogliais em células C6. É válido mencionar que mesmo sem termos alteração enzimática da MUT, tentamos compreender os efeitos do MMA, utilizando uma alta concentração deste metabólito (5 mM), e o correlacionando dentro dos limites dos nossos resultados, com a acidemia metilmalônica. Além disso, o tratamento deste EIM se baseia no alto controle de dieta e associação com suplementos, com intuito de reduzir a sintomatologia, principalmente neurológica, então buscamos ainda moléculas com potencial de glioproteção, como a melatonina e o resveratrol. Neste contexto, destacamos um recente trabalho do nosso grupo onde revisamos o papel das células astrogliais na gliotoxicidade e glioproteção em diversas desordens neurológicas (Quincozes-Santos, Santos et al. 2021).

Desta forma, visando melhor compreender os efeitos da exposição do MMA nas células astrogliais, no primeiro capítulo desta tese avaliamos os efeitos *in vitro* do MMA sobre parâmetros glutamatérgicos e se haveria mudanças na resposta inflamatória.

Para tanto, as células astrogliais C6 foram expostas ao MMA (5 mM) durante 48 h. Primeiramente, nós observamos uma redução do MTT, que corrobora com dados anteriores da literatura em outros modelos experimentais (Portela, Bianchini et al. 2019, Proctor, Turton et al. 2020). Altas concentrações de MMA podem reduzir a viabilidade celular, indicando uma possível alteração

da função mitocondrial. Vale ressaltar que foi feita a marcação com iodeto de propídeo e não foi observada perda de integridade de membrana. O metabolismo do MMA está associado à mitocôndria e já está descrito que o MMA induz alterações nas atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons, provocando diversos danos celulares (da Costa, Dos Santos et al. 2021). Assim, possivelmente, a redução do MTT observada neste estudo, pode ser originada a partir de disfunção mitocondrial. Contrariamente, não observamos alterações nos níveis de lactato, e este mesmo resultado foi encontrado por outro estudo em condições semelhantes ao nosso modelo experimental (Costa, Santos et al. 2022). Este resultado dos níveis do lactato indica que o MMA em 48 h não interferiu no metabolismo energético das células astrogliais C6 e pode ser explicado pela capacidade deste ácido orgânico de inibir a atividade da lactato desidrogenase, fato este já descrito anteriormente (Saad, Mirandola et al. 2006).

Tendo em vista que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e os astrócitos são peças-chave na comunicação glutamatérgica, pois são as células responsáveis pela remoção do glutamato da fenda sináptica e posterior metabolização, decidimos avaliar o efeito do MMA sobre o metabolismo do glutamato. Interessantemente, a exposição ao MMA aumentou a captação de glutamato, e este aumento pode refletir uma resposta patofisiológica das células astrogliais ao MMA, uma vez que estas células podem evitar danos neuronais excitotóxicos, mantendo a homeostase glutamatérgica (Satarker, Bojja et al. 2022). Além disso, este resultado está de acordo com estudos prévios onde é reportado um aumento da captação de glutamato em astrócitos e córtex cerebral expostos a outros ácidos orgânicos, como 2-hidróxiglutárico e 3-hidróxiglutárico (Junqueira, Brusque et al. 2003, Frizzo, Schwarzbald et al. 2004). No entanto,

este resultado sobre a captação de glutamato não está relacionado a alterações da expressão do RNAm do EAAC1, o principal transportador de glutamato presente nas células C6 (Palos, Ramachandran et al. 1996). Tais dados sugerem um efeito direto do MMA sobre a atividade de transporte de glutamato, e não sobre a expressão do transportador.

Vale destacar que a atividade da GS também aumentou, acompanhando o efeito do MMA sobre a captação do glutamato. A GS é a principal enzima envolvida no metabolismo astrocitário do glutamato, permitindo assim uma depuração eficiente do glutamato pelas células astrogliais (Trabelsi, Amri et al. 2017). Este aumento da atividade da GS segue a ideia de que a célula astrogliar está respondendo através de um mecanismo compensatório a uma potencial injúria provocada pela exposição ao MMA por 48 h.

Os níveis extracelulares do glutamato e da glutamina foram reduzidos. Esse resultado pode indicar um maior consumo de glutamato e glutamina pelas células astrogliais em resposta ao MMA. Os resultados com estes aminoácidos estão de acordo com um estudo de outra acidemia orgânica, a acidemia propiônica, onde foi demonstrado que em pacientes no período de descompensação metabólica pode ocorrer uma redução de glutamato e glutamina nos núcleos da base (Davison, Davies et al. 2011). Vale ressaltar que o acúmulo e excesso de MMA podem levar a redução e um comprometimento do ciclo do ácido cítrico, além da falta de alfa-cetoglutarato, que está envolvido tanto com a síntese quanto com a degradação do glutamato e da glutamina (Melo, Mirandola et al. 2012, Wongkittichote, Cunningham et al. 2019). Assim, o glutamato e a glutamina captados pelas células astrogliais poderiam ser usados para fornecer intermediários para o ciclo do ácido cítrico e/ou para produção de

ATP. Nossos achados são corroborados também por outros estudos que anteriormente descreveram a interferência do MMA no metabolismo de aminoácidos (Toyoshima, Watanabe et al. 1996, Wajner and Coelho 1997, Okun, Horster et al. 2002). Portanto, múltiplos mecanismos podem atuar simultaneamente para explicar os resultados relacionados aos parâmetros glutamatérgicos desta tese, mostrando o papel das células astrogliais nos efeitos do MMA sobre o sistema glutamatérgico.

Alterações no metabolismo do glutamato estão correlacionadas a outros eventos celulares como a inflamação. A inflamação pode ser definida como uma resposta adaptativa complexa de defesa do organismo, que é desencadeada por estímulos adversos, estando sujeita a uma variedade de processos desde fisiológicos a patológicos. Independente da causa, a inflamação busca restaurar a homeostase do organismo (Medzhitov 2008). No SNC, a resposta inflamatória pode ser causada por lesão tecidual ou neurodegeneração e envolve diversas vias de sinalização, com pontos-chave que podem estar ativos ou inibidos. Dentre estes se destaca-se o fator de transcrição NFκB, que medeia respostas celulares em vários processos biológicos e participa ativamente na patofisiologia de diversas doenças (Liu, Zhang et al. 2017).

O MMA induziu aumento da expressão da subunidade p65 do NFκB, em acordo com um estudo prévio onde foi reportado um aumento dos níveis de NFκB em cultura de astrócitos de camundongos *knockout* para acidemia glutárica (Rodrigues, Seminotti et al. 2017). Esta ativação do NFκB é um evento celular importante, pois induz um conjunto de mediadores que resultam em uma condição pró-inflamatória. Uma das principais citocinas envolvidas na inflamação é o TNF-α, logo decidimos verificar se a exposição ao MMA levaria a mudanças

nesta citocina. Contrariamente à nossa hipótese, não foram encontradas diferenças significativas na expressão gênica e nem no conteúdo extracelular de TNF- α . Esta citocina tem sido encontrada expressa em altos níveis em desordens neuroinflamatórias e é definida como um agente iniciador da resposta imune frente a um dano (Olmos and Llado 2014). No entanto, uma vez que ela possui uma expressão rápida, um longo período de exposição ao MMA, como o utilizado neste trabalho, pode estar associado a este resultado.

O NF κ B também regula uma rede de sinalização durante a resposta inflamatória, incluindo a expressão da iNOS, que catalisa a síntese de NO a partir da L-arginina. Acompanhando o resultado que obtivemos na expressão do NF κ B, o MMA também induziu um aumento da expressão da iNOS. Nosso achado é corroborado por outro trabalho prévio, que descreveu um aumento da iNOS no córtex de ratos após a administração *in vivo* de MMA (Ribeiro, Della-Pace et al. 2013). O aumento da iNOS em modelos de acidemia metilmalônica pode levar a superprodução de NO, que pode mediar efeitos neurotóxicos (Ribeiro, Figuera et al. 2009), principalmente quando reage com o radical superóxido e forma peroxinitrito. Neste contexto, a regulação de NF κ B e iNOS pode representar um mecanismo importante pelo qual o MMA induz resposta astrogliar.

Os resultados do capítulo I desta tese demonstram os efeitos de uma exposição prolongada ao MMA nas células astrogliais, apontando que mudanças na funcionalidade destas células podem estar associadas a patogênese da acidemia metilmalônica. Portanto, considerando os resultados do capítulo I desta tese e os poucos estudos na literatura sobre a inflamação, no capítulo II investigamos os efeitos do MMA principalmente sobre o processo inflamatório e

a homeostase redox, assim como nos possíveis mediadores destes eventos nas células C6, durante um tempo menor em relação ao capítulo I (24 horas de exposição) e, por fim, potenciais moléculas com capacidade de proteção frente ao dano associado ao MMA.

O SNC possui uma resposta inflamatória particular em relação aos demais tecidos, pois a BHE limita o acesso de algumas moléculas ao cérebro (DiSabato, Quan et al. 2016). Portanto, a duração, o microambiente e o os tipos celulares envolvidos em uma resposta inflamatória, são aspectos críticos para progressão da inflamação em uma desordem neurológica. Apesar dos poucos dados sobre academia metilmalônica e inflamação, muitos estudos sugerem uma relação extremamente importante entre os EIM e o processo inflamatório (Olsen, Cornelius et al. 2015, Montanari, Parolisi et al. 2021).

Dentre as células do SNC, a microglia e os astrócitos são as principais células envolvidas na resposta inflamatória, e conseqüentemente, podem gerar mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, óxido nítrico, fatores de crescimento e espécies reativas, que modulam a resposta entre anti e/ou pró-inflamatória (Stephenson, Nutma et al. 2018, Kwon and Koh 2020). Começando pelo fator de transcrição NFκB p65, demonstramos no capítulo II o mesmo perfil de resultados do capítulo I com a mesma concentração de MMA (5 mM), embora com menor tempo de exposição (24 h). O NFκB é considerado o principal regulador inflamatório do SNC, portanto é ativado em consonância a uma resposta inflamatória. Este fator de transcrição encontra-se no citoplasma onde permanece inativo, e quando estimulado, transloca-se para o núcleo, induzindo genes comumente expressos em uma situação pró-inflamatória (Zhang, Lenardo et al. 2017). Classicamente, tem sido demonstrado

que as citocinas, que são os principais agentes da cascata neuroinflamatória, podem ser reguladas através do NFκB.

Ao contrário do observado em 48 h, um período de 24 h de exposição ao MMA levou a um aumento na secreção e expressão de TNF-α. Vale destacar que já havia sido demonstrado que o MMA aumenta os níveis de TNF-α no córtex cerebral de ratos (Ribeiro, Della-Pace et al. 2013), assim como, em um outro estudo com amostras de soro de pacientes com acidemia metilmalônica (Li, Jin et al. 2021). O TNF-α tem ação pleiotrópica, associada a importantes funções para manutenção da homeostase, mas principalmente em condições patológicas. Esta citocina induz inflamação, ativa o endotélio vascular, recruta células do sistema imune e promove danos teciduais (Kallioli and Ivashkiv 2016). A IL-1β é uma outra potente citocina pró-inflamatória, que também foi induzida pela exposição ao MMA. O nosso resultado corrobora com outros estudos que têm demonstrado que este ácido orgânico leva ao aumento da IL-1β (Goyenechea, Andrade et al. 2012, Li, Song et al. 2017, Gabbi, Nogueira et al. 2018). Esta citocina também tem várias funções, como: ativar a resposta imune inata, induzir a expressão de várias outras citocinas e quimiocinas, aumentar a atividade fagocítica das células imunes, bem como facilitar a ativação das respostas imunes adaptativas. Portanto, tem sido implicada na perpetuação da resposta inflamatória em desordens neurodegenerativas (Eder 2009, Mendiola and Cardona 2018).

No nosso segundo trabalho foi observado que o MMA também levou a um aumento da expressão da iNOS em 24 h. Concomitantemente, o MMA aumentou a expressão gênica da COX-2. Esta enzima é mais um elemento da cascata da inflamação fortemente associada a função astrogliar (Minghetti 2004). O

aumento da COX-2 pode ter ocorrido tanto pela ação do NF κ B como em resposta a um aumento da produção de NO (através da expressão da iNOS), que por sua vez ativa a COX-2. Assim, o MMA pode estar relacionado à produção de prostaglandinas em células astrogliais, as quais podem agravar o processo inflamatório. Vale destacar ainda que o aumento dos mediadores inflamatórios, TNF- α e IL-1 β , pode estar diretamente associado ao aumento da COX-2.

Tendo em vista alterações em diversos mediadores da resposta inflamatória, ainda avaliamos a proteína p21, cuja expressão pode também ser estimulada por citocinas pró-inflamatórias (Scatizzi, Mavers et al. 2009, Zonis, Pechnick et al. 2015). Além de ser um importante regulador do ciclo celular, a p21 também pode ser alterada em uma condição inflamatória, e o MMA induziu um aumento da sua expressão, possivelmente pela ativação de NF κ B e indução das citocinas relatadas anteriormente. Outros trabalhos recentes do nosso grupo tem mostrado alterações e destacado esta proteína em astrócitos (Bellaver, Dos Santos et al. 2018, Bobermin, Roppa et al. 2020). A partir dos efeitos inflamatórios do MMA observados em células astrogliais, avaliamos a expressão da aquaporina 4 (AQP4), a qual também foi aumentada pelo MMA. A AQP-4 é uma proteína de membrana que regula a permeabilidade de água, sendo encontrada abundantemente no SNC. A AQP-4 é importante tanto no contexto fisiológico, como por exemplo na transmissão sináptica, assim como em situações de injúrias, apresentando um perfil inflamatório em desordens neurológicas (Li, Zhang et al. 2011, Ikeshima-Kataoka 2016).

De maneira interessante, observamos também neste capítulo que o MMA diminuiu os níveis de expressão dos receptores adenosinérgicos A₁ e A_{2A}, que apresentam funções imunomoduladoras em células gliais (Gessi, Merighi et al.

2013, Bobermin, Roppa et al. 2019). A ativação do receptor A_1 induz um efeito neuroprotetor e o receptor A_{2A} é capaz de bloquear a neuroinflamação (Marti Navia, Dal Ben et al. 2020). A ativação destes receptores poderia inibir a resposta imune, suprimindo a produção de mediadores pró-inflamatórios (Nakav, Chaimovitz et al. 2008), Assim, a redução dos níveis de expressão do RNAm dos receptores A_1 e A_{2A} vai ao encontro a uma condição neuroinflamatória induzida pelo MMA.

Tomados em conjuntos os resultados da resposta inflamatória no capítulo II, observamos que as células astrogliais apresentam um perfil pró-inflamatório, com aumento da expressão gênica de importantes mediadores envolvidos com este processo, tais como: IL-1 β , TNF- α , iNOS, COX-2, AQP-4, p21, além da redução da expressão gênica dos receptores adenosinérgicos A_1 e A_{2A} . Paralelamente, observamos um aumento da expressão gênica do fator de transcrição NF κ B. Até onde sabemos, este é um dos primeiros trabalhos a demonstrar que o MMA é capaz de modular a expressão de genes extremamente relacionados ao processo inflamatório nas células astrogliais.

É válido lembrar que o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias leva a superprodução de ERO e de espécies reativas de nitrogênio (ERN). Neste sentido, destaca-se o papel da neuroinflamação e do estresse oxidativo/nitrosativo como importantes fatores de risco para neuroprogressão de muitos EIM. Com a finalidade de investigar os efeitos do MMA no sistema de defesa antioxidante, avaliamos os níveis da GSH e as atividades das enzimas GPx, GST, GR e SOD.

Primeiramente, observamos o efeito do MMA nos níveis da GSH, que é o principal antioxidante não-enzimático de defesa das células astrogliais. Este

ácido orgânico reduziu os níveis da GSH, corroborando com resultados encontrados em outros estudos com MMA e defesas antioxidantes (Viegas, Zanatta et al. 2014, Li, Jin et al. 2021). A GSH é crucial para a eliminação de ERO, portanto possivelmente a capacidade das células astrogliais de prevenir danos oxidativos foi comprometida pela exposição ao MMA. A GSH também está envolvida em múltiplos processos celulares, então é esperado que distúrbios no metabolismo da GSH estejam implicadas nas alterações neurológicas relacionadas ao MMA e outros EIM (Dringen, Brandmann et al. 2015, Goncalves, Rodrigues et al. 2018). Ainda, destacamos que a depleção da GSH em células astrogliais pode estar correlacionada a citotoxicidade e neuroinflamação (Lee, Cho et al. 2010, Arus, Souza et al. 2017).

A partir dos resultados de GSH, avaliamos a GCL e observamos que o MMA também foi capaz de induzir uma redução da expressão gênica desta enzima. A GCL é uma enzima limitante da taxa de síntese da GSH, pois ela é responsável pela formação de γ -glutamilcisteína a partir do glutamato e da cisteína (Lu 2013). Portanto, possivelmente alguns intermediários essenciais para a formação da GSH como a γ -glutamilcisteína e o glutamato, podem estar depletados frente ao estresse oxidativo induzido pelo MMA.

O MMA também diminuiu a atividade da GPx, e este resultado está de acordo com outro trabalho sobre EIM (Fernandes, Borges et al. 2011). A relação entre GSH e GPx desempenha um importante papel na eliminação de ERO e ERN, onde a GPx catalisa a redução de muitas espécies reativas utilizando a GSH como um substrato (Panday, Talreja et al. 2020). Diante disso, a redução da atividade da GPx pode estar associada ao comprometimento dos níveis da GSH causados pelo MMA. Cabe ressaltar ainda que a GPx é uma enzima

envolvida na prevenção do acúmulo prejudicial de H_2O_2 intracelular, e uma diminuição em sua atividade pode contribuir para uma maior suscetibilidade a dano oxidativo, e conseqüentemente, neuropatologias (Lubos, Loscalzo et al. 2011). Por outro lado, as atividades da GR, outra enzima antioxidante importante para restabelecer os níveis de GSH, e da GST, enzima que pode reduzir os hidroperóxidos a álcool usando GSH, não foram alteradas pelo MMA.

Em relação à SOD, defesa enzimática crucial das células astrogliais, verificou-se que o MMA diminuiu sua atividade, assim como diminuiu a expressão gênica da superóxido dismutase 1 (SOD1) e superóxido dismutase 2 (SOD2). Este resultado de redução da atividade da SOD já havia sido descrito em outros trabalhos (Schuck, Alves et al. 2013, Li, Song et al. 2017, Portela, Bianchini et al. 2019), inclusive em um estudo realizado com pacientes com acidemia metilmalônica (Li, Jin et al. 2021). No entanto, até onde sabemos, este é um dos primeiros trabalhos a mostrar esta alteração na expressão gênica de isoformas da SOD relacionadas ao MMA. A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e oxigênio molecular, atuando junto a outras enzimas antioxidantes na prevenção de danos do radical superóxido e seus derivados (Miao and St Clair 2009). A SOD1 é encontrada em vários locais: no citosol, no núcleo, no espaço intermembranas mitocondrial, no retículo endoplasmático e no lisossomo. Já a SOD2 é encontrada principalmente na matriz mitocondrial. O nosso resultado de redução da atividade da SOD está diretamente associado à regulação negativa de SOD1 e SOD2, cujos genes estão envolvidos na proteção contra o superóxido gerado pela cadeia transportadora de elétrons e outras reações metabólicas. Desta forma, o MMA pode induzir um aumento de espécies reativas através de uma redução crítica

do sistema de defesa antioxidante, promovendo assim um desequilíbrio redox nas células astrogliais, contribuindo para os danos neurológicos observados em pacientes afetados pela acidemia metilmalônica.

Alterações na homeostase redox são também associadas com o PGC-1 α , assim observamos que a sua expressão gênica foi diminuída pela exposição ao MMA. A redução do PGC-1 α também foi encontrada em outros modelos de EIM (Grings, Moura et al. 2017, da Rosa-Junior, Parmeggiani et al. 2019). O PGC-1 α é um coativador transcricional que se liga a vários fatores de transcrição, possuindo um conjunto de efeitos biológicos em diversos tecidos e desempenhando um papel fundamental na regulação do metabolismo oxidativo (Puigserver and Spiegelman 2003). Desta forma, o PGC-1 α é capaz de modular a biogênese mitocondrial, a resposta inflamatória e a produção de espécies reativas (Rius-Perez, Torres-Cuevas et al. 2020).

Além disso, o MMA aumentou a expressão do RNAm do fator de transcrição Nrf2. Este fator de transcrição é um regulador da expressão de uma rede de genes antioxidantes envolvidos na citoproteção (Lim, Wilhelmus et al. 2014). Hipoteticamente, o nosso resultado pode estar associado a mecanismos compensatórios celulares para evitar a gliotoxicidade induzida por MMA, em uma tentativa de conter o estresse oxidativo através do aumento da transcrição gênica do Nrf2. No entanto, esse mecanismo poderia se tornar saturado ou ainda insuficiente para induzir a expressão de antioxidantes, visto que a GSH, GPx e SOD foram comprometidas pela exposição ao MMA. Curiosamente, não foram observadas mudanças na expressão gênica da enzima HO1, que apresenta propriedades antioxidante e anti-inflamatória (Wegiel, Nemeth et al. 2014). Cabe ressaltar que as células astrogliais podem ser o tipo de célula predominante para

a ativação do sistema Nrf2/HO1 no SNC (Liddell 2017), e diversos trabalhos vêm mostrando a estrita relação entre ambos nas células astrogliais (Chen-Roetling and Regan 2017, Chen, Xi et al. 2019, Bobermin, Weber et al. 2020).

Tendo em vista todas as alterações induzidas pelo MMA verificadas neste trabalho, torna-se extremamente relevante a busca por moléculas que possuam uma ação no SNC e sejam capazes de levar a uma proteção contra danos em células astrogliais. Nos últimos anos diversas moléculas neuroprotetoras têm sido estudadas, e baseado nestas informações, a melatonina e o resveratrol poderiam ter um efeito protetor frente ao MMA, por estarem relacionadas ao controle do estresse oxidativo e da resposta inflamatória.

O resveratrol apresenta inúmeros efeitos biológicos destacando-se os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, cardioprotetores, antienvhecimento, neuroprotetores e glioprotetores (Xia, Daiber et al. 2017, Ramirez-Garza, Laveriano-Santos et al. 2018, Galiniak, Aebischer et al. 2019, Quincozes-Santos, Santos et al. 2021). Esta molécula tem se mostrado eficaz em prevenir danos em diversos modelos experimentais, bem como em estudos clínicos, de desordens que acometem o SNC, como a doença de Alzheimer, isquemia, esclerose lateral amiotrófica e diabetes (Foti Cuzzola, Ciurleo et al. 2011, Tellone, Galtieri et al. 2015, Hou, Tain et al. 2019). Embora o resveratrol não tenha um receptor específico, ele pode exercer seus efeitos benéficos sobre a resposta celular através da modulação de vias de sinalização e enzimas envolvidas na resposta ao estresse. Portanto, apesar de já existirem estudos abordando as desordens mencionadas anteriormente, poucos estudos têm investigado o seu efeito protetor em modelos experimentais de EIM.

Primeiramente investigamos o efeito do resveratrol na resposta inflamatória induzida pelo MMA. O pré-tratamento com resveratrol preveniu o aumento da liberação de TNF- α e IL-1 β causado pelo MMA, mas nenhuma mudança nos níveis da IL-6 foi observada. Em seguida avaliamos se a influência do resveratrol nos níveis da GSH, e novamente o pré-tratamento com resveratrol restaurou os níveis da GSH que haviam sido reduzidos pelo MMA.

A hiperamonemia é uma das principais alterações bioquímicas encontradas em pacientes com acidemia metilmalônica, além disso é uma das principais causas da neurotoxicidade nestes pacientes. O nosso grupo vem trabalhando com o resveratrol e células astrogliais há alguns anos em diversos estudos, buscando compreender os seus efeitos, inclusive frente a toxicidade da amônia nas células astrogliais (Quincozes-Santos, Nardin et al. 2009, Quincozes-Santos, Bobermin et al. 2013, Bobermin, Hansel et al. 2015, Bobermin, Souza et al. 2018). Nesse sentido, um trabalho prévio do nosso grupo observou que a exposição a amônia induziu um aumento de TNF- α e IL-1 β em células astrogliais, e o resveratrol preveniu a liberação das mesmas (Bobermin, Quincozes-Santos et al. 2012), similarmente ao nosso resultado onde o resveratrol reduziu a secreção das citocinas TNF- α e IL-1 β induzidas pelo MMA. Extrapolando nossos resultados, possivelmente o resveratrol tenha um efeito inibitório sobre a ativação do NF κ B frente ao insulto do MMA, desta maneira diminuindo a inflamação nas células astrogliais. Quanto à GSH, o resveratrol foi capaz de aumentar seus níveis em comparação ao MMA, tendo esse efeito sido encontrado também frente à exposição com amônia (Bobermin, Hansel et al. 2015). Tal efeito do resveratrol possivelmente pode ter ocorrido de várias maneiras: por modular a síntese da GSH, por diminuir a oxidação da GSH, ou

ainda pelo resveratrol controlar vias de sinalização antioxidantes, contribuindo assim para diminuir os danos oxidativos induzidos pelo MMA.

Outra molécula que tem recebido atenção é a melatonina, que além da sua conhecida função de regulação do ciclo circadiano, apresenta outras funções como: antiapoptótica, anticâncer, antioxidante e anti-inflamatória (Chen, Zhang et al. 2020). Estas propriedades da melatonina associadas com a neuroproteção podem desempenhar um importante papel na redução de sintomas de desordens neurológicas (Gunata, Parlakpınar et al. 2020). A melatonina apresenta um curto tempo de meia-vida e por ser uma molécula com potencialidade terapêutica, sistemas de liberação controlados têm sido desenvolvidos (Gooneratne, Edwards et al. 2012).

Considerando o exposto acima, verificamos se a melatonina também teria efeito protetor nas células astrogliais frente a exposição ao MMA. Na resposta inflamatória induzida pelo MMA, o pré-tratamento com a melatonina também atenuou o aumento de TNF- α e IL-1 β , porém não teve efeito sobre a IL-6. O resultado sobre estas duas citocinas corrobora com um estudo onde foi utilizado o H₂O₂ como um indutor de inflamação em uma linhagem neuronal, e a melatonina preveniu estes efeitos (Nopparat, Chantadol et al. 2017). O aumento destas citocinas pode ter mais de uma resposta envolvida, como mostramos nos dois trabalhos desta tese e a melatonina provavelmente pode inibir a atividade transcricional do NF κ B ou modular os efeitos do Nrf2 promovendo um aumento das defesas antioxidantes, inclusive da GSH, restaurando assim a sua função e promovendo proteção. Esse mecanismo de ação da melatonina já foi observado em outro estudo utilizando as células C6 (Jumnongprakhon, Govitrapong et al. 2015). Outro trabalho também mostrou que a melatonina é capaz de aumentar

a expressão da GCL, o que levaria a síntese da GSH (Limon-Pacheco and Gonsebatt 2010).

Considerando que existe uma resposta astrogliial induzida por MMA, tanto o resveratrol quanto a melatonina apresentaram um potencial glioprotetor, sendo capazes de prevenir a resposta inflamatória e a diminuição dos níveis da GSH induzidas pelo MMA. A melatonina e o resveratrol têm demonstrado vários efeitos biológicos em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, incluindo propriedades antioxidantes/eliminadoras de espécies reativas, anti-inflamatórias e ainda com capacidade de glioprotetoras.

Considerando a interação entre os processos inflamatórios e oxidativos e que os desfechos dos pacientes com acidemia metilmalônica envolvem esses eventos, moléculas com capacidade de modular e proteger as células astrogliais poderiam contribuir para preservar a integridade funcional do SNC, atenuando a neurotoxicidade induzida pelo MMA. É tentador especular que esses compostos têm potencial e poderiam, após um aprofundamento de suas propriedades terapêuticas até chegarem a estudos clínicos, como uma terapia adjuvante para prevenir ou atenuar os danos oxidativos e a neuroinflamação em pacientes com acidemia metilmalônica.

Por fim, as células gliais desempenham papéis cruciais na manutenção da homeostase do cérebro e na organização do desenvolvimento neural, eventos críticos que muitas vezes são alterados com a progressão da acidemia metilmalônica. Assim, os resultados da presente tese mostraram que as defesas antioxidantes, resposta inflamatória e parâmetros glutamatérgicos das células astrogliais foram afetadas pela exposição ao MMA, apoiando a ideia de que as

alterações nas células astrogliais estão associadas à patogênese da disfunção induzida pelo MMA.

CONCLUSÕES

Os dados apresentados nesta tese sugerem que o MMA provoca alterações no metabolismo do glutamato, na homeostase redox e no processo inflamatório. Além disso, o MMA alterou vias de sinalização como NFκB, Nrf2 e PGC-1α, que podem estar mediando os efeitos gliotóxicos deste ácido orgânico. No entanto, a melatonina e o resveratrol foram capazes de prevenir alterações induzidas pelo MMA. Assim, acreditamos que os resultados deste trabalho contribuam para o melhor entendimento da fisiopatologia da acidemia metilmalônica, particularmente em relação a funcionalidade glial. Por fim, as estratégias glioprotetoras testadas podem representar potenciais agentes adjuvantes terapêuticos ou preventivos para reduzir danos em pacientes com este EIM.

PERSPECTIVAS

- Investigar os efeitos do MMA sobre o processo inflamatório em 48 h;
- Investigar vias de sinalização que possam ser alteradas pelo MMA em 48 h, como do PGC1- α , HO1 e p38 MAPK;
- Avaliar os efeitos da melatonina e resveratrol frente as alterações induzidas pelo MMA em 48 h;
- Verificar os efeitos do MMA em fatias e em cultura primária de astrócitos.

APOIO FINANCEIRO

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

REFERÊNCIAS

- Alghamdi, B. S. (2018). "The neuroprotective role of melatonin in neurological disorders." *J Neurosci Res* **96**(7): 1136-1149.
- Almasi, T., L. T. Guey, C. Lukacs, K. Csetneki, Z. Voko and T. Zelei (2019). "Systematic literature review and meta-analysis on the epidemiology of methylmalonic acidemia (MMA) with a focus on MMA caused by methylmalonyl-CoA mutase (mut) deficiency." *Orphanet J Rare Dis* **14**(1): 84.
- Anavi, S. and O. Tirosh (2020). "iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions." *Free Radic Biol Med* **146**: 16-35.
- Andersen, J. V., K. H. Markussen, E. Jakobsen, A. Schousboe, H. S. Waagepetersen, P. A. Rosenberg and B. I. Aldana (2021). "Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration." *Neuropharmacology* **196**: 108719.
- Anderson, C. M. and R. A. Swanson (2000). "Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions." *Glia* **32**(1): 1-14.
- Aquilano, K., S. Baldelli and M. R. Ciriolo (2014). "Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant." *Front Pharmacol* **5**: 196.
- Argente-Arizon, P., S. Guerra-Cantera, L. M. Garcia-Segura, J. Argente and J. A. Chowen (2017). "Glial cells and energy balance." *J Mol Endocrinol* **58**(1): R59-R71.
- Arioz, B. I., B. Tastan, E. Tarakcioglu, K. U. Tufekci, M. Olcum, N. Ersoy, A. Bagriyanik, K. Genc and S. Genc (2019). "Melatonin Attenuates LPS-Induced Acute Depressive-Like Behaviors and Microglial NLRP3 Inflammasome Activation Through the SIRT1/Nrf2 Pathway." *Front Immunol* **10**: 1511.
- Arus, B. A., D. G. Souza, B. Bellaver, D. O. Souza, C. A. Goncalves, A. Quincozes-Santos and L. D. Bobermin (2017). "Resveratrol modulates GSH system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway." *Mol Cell Biochem* **428**(1-2): 67-77.
- Baburina, Y., A. Lomovsky and O. Krestinina (2021). "Melatonin as a Potential Multitherapeutic Agent." *J Pers Med* **11**(4).
- Bastianetto, S., C. Menard and R. Quirion (2015). "Neuroprotective action of resveratrol." *Biochim Biophys Acta* **1852**(6): 1195-1201.
- Baumgartner, M. R., F. Horster, C. Dionisi-Vici, G. Haliloglu, D. Karall, K. A. Chapman, M. Huemer, M. Hochuli, M. Assoun, D. Ballhausen, A. Burlina, B. Fowler, S. C. Grunert, S. Grunewald, T. Honzik, B. Merinero, C. Perez-Cerda, S. Scholl-Burgi, F. Skovby, F. Wijburg, A. MacDonald, D. Martinelli, J. O. Sass, V. Valayannopoulos and A. Chakrapani (2014). "Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia." *Orphanet J Rare Dis* **9**: 130.
- Baur, J. A. and D. A. Sinclair (2006). "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence." *Nat Rev Drug Discov* **5**(6): 493-506.
- Belanger, M., I. Allaman and P. J. Magistretti (2011). "Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation." *Cell Metab* **14**(6): 724-738.
- Bellaver, B., J. P. Dos Santos, D. T. Leffa, L. D. Bobermin, P. H. A. Roppa, I. L. da Silva Torres, C. A. Goncalves, D. O. Souza and A. Quincozes-Santos (2018). "Systemic Inflammation as a Driver of Brain Injury: the Astrocyte as an Emerging Player." *Mol Neurobiol* **55**(3): 2685-2695.
- Bellaver, B., D. G. Souza, L. D. Bobermin, D. O. Souza, C. A. Goncalves and A. Quincozes-Santos (2015). "Resveratrol Protects Hippocampal Astrocytes

- Against LPS-Induced Neurotoxicity Through HO-1, p38 and ERK Pathways." Neurochem Res **40**(8): 1600-1608.
- Bellaver, B., D. G. Souza, D. O. Souza and A. Quincozes-Santos (2014). "Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats." Toxicol In Vitro **28**(4): 479-484.
- Benda, P., J. Lightbody, G. Sato, L. Levine and W. Sweet (1968). "Differentiated rat glial cell strain in tissue culture." Science **161**(3839): 370-371.
- Berman, A. Y., R. A. Motechin, M. Y. Wiesenfeld and M. K. Holz (2017). "The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials." NPJ Precis Oncol **1**.
- Bobermin, L. D., G. Hansel, E. B. Scherer, A. T. Wyse, D. O. Souza, A. Quincozes-Santos and C. A. Goncalves (2015). "Ammonia impairs glutamatergic communication in astroglial cells: protective role of resveratrol." Toxicol In Vitro **29**(8): 2022-2029.
- Bobermin, L. D., A. Quincozes-Santos, M. C. Guerra, M. C. Leite, D. O. Souza, C. A. Goncalves and C. Gottfried (2012). "Resveratrol prevents ammonia toxicity in astroglial cells." PLoS One **7**(12): e52164.
- Bobermin, L. D., R. H. A. Roppa, C. A. Goncalves and A. Quincozes-Santos (2020). "Ammonia-Induced Glial-Inflammation." Mol Neurobiol **57**(8): 3552-3567.
- Bobermin, L. D., R. H. A. Roppa and A. Quincozes-Santos (2019). "Adenosine receptors as a new target for resveratrol-mediated glioprotection." Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis **1865**(3): 634-647.
- Bobermin, L. D., D. O. Souza, C. A. Goncalves and A. Quincozes-Santos (2018). "Resveratrol prevents ammonia-induced mitochondrial dysfunction and cellular redox imbalance in C6 astroglial cells." Nutr Neurosci **21**(4): 276-285.
- Bobermin, L. D., F. B. Weber, T. M. Dos Santos, A. Bello-Klein, A. T. S. Wyse, C. A. Goncalves and A. Quincozes-Santos (2020). "Sulforaphane Induces Glioprotection After LPS Challenge." Cell Mol Neurobiol.
- Boison, D., J. F. Chen and B. B. Fredholm (2010). "Adenosine signaling and function in glial cells." Cell Death Differ **17**(7): 1071-1082.
- Brigelius-Flohe, R. and M. Maiorino (2013). "Glutathione peroxidases." Biochim Biophys Acta **1830**(5): 3289-3303.
- Brusilow, S. W., R. C. Koehler, R. J. Traystman and A. J. Cooper (2010). "Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy." Neurotherapeutics **7**(4): 452-470.
- Buendia, I., P. Michalska, E. Navarro, I. Gameiro, J. Egea and R. Leon (2016). "Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases." Pharmacol Ther **157**: 84-104.
- Chen-Roetling, J. and R. F. Regan (2017). "Targeting the Nrf2-Heme Oxygenase-1 Axis after Intracerebral Hemorrhage." Curr Pharm Des **23**(15): 2226-2237.
- Chen, D., T. Zhang and T. H. Lee (2020). "Cellular Mechanisms of Melatonin: Insight from Neurodegenerative Diseases." Biomolecules **10**(8).
- Chen, J. F., C. F. Lee and Y. Chern (2014). "Adenosine receptor neurobiology: overview." Int Rev Neurobiol **119**: 1-49.
- Chen, X., Z. Xi, H. Liang, Y. Sun, Z. Zhong, B. Wang, L. Bian and Q. Sun (2019). "Melatonin Prevents Mice Cortical Astrocytes From Hemin-Induced Toxicity Through Activating PKC α /Nrf2/HO-1 Signaling in vitro." Front Neurosci **13**: 760.

- Chen, Y., C. Qin, J. Huang, X. Tang, C. Liu, K. Huang, J. Xu, G. Guo, A. Tong and L. Zhou (2020). "The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing." Cell Prolif: e12781.
- Chen, Y. and R. A. Swanson (2003). "Astrocytes and brain injury." J Cereb Blood Flow Metab **23**(2): 137-149.
- Costa, R. T., M. B. Santos, C. Alberto-Silva, D. C. Carrettiero and C. A. J. Ribeiro (2022). "Methylmalonic Acid Impairs Cell Respiration and Glutamate Uptake in C6 Rat Glioma Cells: Implications for Methylmalonic Acidemia." Cell Mol Neurobiol.
- da Costa, R. T., M. B. Dos Santos, I. C. S. Silva, R. P. de Almeida, M. S. Teruel, D. C. Carrettiero and C. A. J. Ribeiro (2021). "Methylmalonic Acid Compromises Respiration and Reduces the Expression of Differentiation Markers of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells." ACS Chem Neurosci **12**(14): 2608-2618.
- da Rosa-Junior, N. T., B. Parmeggiani, M. S. da Rosa, N. M. Glanzel, L. de Moura Alvorcem, M. Wajner and G. Leipnitz (2019). "Bezafibrate In Vivo Administration Prevents 3-Methylglutaric Acid-Induced Impairment of Redox Status, Mitochondrial Biogenesis, and Neural Injury in Brain of Developing Rats." Neurotox Res **35**(4): 809-822.
- Dare, E., G. Schulte, O. Karovic, C. Hammarberg and B. B. Fredholm (2007). "Modulation of glial cell functions by adenosine receptors." Physiol Behav **92**(1-2): 15-20.
- Davison, J. E., N. P. Davies, M. Wilson, Y. Sun, A. Chakrapani, P. J. McKiernan, J. H. Walter, P. Gissen and A. C. Peet (2011). "MR spectroscopy-based brain metabolite profiling in propionic acidemia: metabolic changes in the basal ganglia during acute decompensation and effect of liver transplantation." Orphanet J Rare Dis **6**: 19.
- Dias, F. R. P., R. R. de Souza Almeida, V. Sovrani, N. K. Thomaz, C. A. Goncalves, A. Quincozes-Santos and L. D. Bobermin (2022). "Glioprotective Effects of Resveratrol Against BMAA-Induced Astroglial Dysfunctions." Neurotox Res **40**(2): 530-541.
- Dimitrov, B., F. Molema, M. Williams, J. Schmiesing, C. Muhlhausen, M. R. Baumgartner, A. Schumann and S. Kolker (2020). "Organic acidurias: Major gaps, new challenges, and a yet unfulfilled promise." J Inherit Metab Dis.
- DiSabato, D. J., N. Quan and J. P. Godbout (2016). "Neuroinflammation: the devil is in the details." J Neurochem **139** Suppl 2: 136-153.
- Dresselhaus, E. C. and M. K. Meffert (2019). "Cellular Specificity of NF-kappaB Function in the Nervous System." Front Immunol **10**: 1043.
- Dringen, R. (2000). "Metabolism and functions of glutathione in brain." Prog Neurobiol **62**(6): 649-671.
- Dringen, R., M. Brandmann, M. C. Hohnholt and E. M. Blumrich (2015). "Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes." Neurochem Res **40**(12): 2570-2582.
- Eder, C. (2009). "Mechanisms of interleukin-1beta release." Immunobiology **214**(7): 543-553.
- Esposito, E. and S. Cuzzocrea (2010). "Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system." Curr Neuropharmacol **8**(3): 228-242.
- Fernandes, C. G., C. G. Borges, B. Seminotti, A. U. Amaral, L. A. Knebel, P. Eichler, A. B. de Oliveira, G. Leipnitz and M. Wajner (2011). "Experimental evidence that methylmalonic acid provokes oxidative damage and compromises antioxidant defenses in nerve terminal and striatum of young rats." Cell Mol Neurobiol **31**(5): 775-785.

- Ferreira, C. R., C. D. M. van Karnebeek, J. Vockley and N. Blau (2019). "A proposed nosology of inborn errors of metabolism." *Genet Med* **21**(1): 102-106.
- Filous, A. R. and J. Silver (2016). ""Targeting astrocytes in CNS injury and disease: A translational research approach"." *Prog Neurobiol* **144**: 173-187.
- Fontella, F. U., V. Pulrolnik, E. Gassen, C. M. Wannmacher, A. B. Klein, M. Wajner and C. S. Dutra-Filho (2000). "Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats." *Neuroreport* **11**(3): 541-544.
- Foti Cuzzola, V., R. Ciurleo, S. Giacoppo, S. Marino and P. Bramanti (2011). "Role of resveratrol and its analogues in the treatment of neurodegenerative diseases: focus on recent discoveries." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **10**(7): 849-862.
- Fowler, B., J. V. Leonard and M. R. Baumgartner (2008). "Causes of and diagnostic approach to methylmalonic acidurias." *J Inherit Metab Dis* **31**(3): 350-360.
- Frankola, K. A., N. H. Greig, W. Luo and D. Tweedie (2011). "Targeting TNF-alpha to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **10**(3): 391-403.
- Fraser, J. L. and C. P. Venditti (2016). "Methylmalonic and propionic acidemias: clinical management update." *Curr Opin Pediatr* **28**(6): 682-693.
- Frizzo, M. E., C. Schwarzbald, L. O. Porciuncula, K. B. Dalcin, R. B. Rosa, C. A. Ribeiro, D. O. Souza and M. Wajner (2004). "3-hydroxyglutaric acid enhances glutamate uptake into astrocytes from cerebral cortex of young rats." *Neurochem Int* **44**(5): 345-353.
- Gabbi, P., V. Nogueira, F. Haupental, F. S. Rodrigues, P. S. do Nascimento, S. Barbosa, J. Arend, A. F. Furian, M. S. Oliveira, A. R. S. Dos Santos, L. F. F. Royes and M. R. Figuera (2018). "Ammonia role in glial dysfunction in methylmalonic acidemia." *Toxicol Lett* **295**: 237-248.
- Galiniak, S., D. Aebisher and D. Bartusik-Aebisher (2019). "Health benefits of resveratrol administration." *Acta Biochim Pol* **66**(1): 13-21.
- Galland, F., M. Seady, J. Taday, S. S. Smaili, C. A. Goncalves and M. C. Leite (2019). "Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells." *Neurochem Int* **131**: 104538.
- Garrod, A. E. (1996). "The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. 1902." *Mol Med* **2**(3): 274-282.
- Gessi, S., S. Merighi, A. Stefanelli, D. Fazzi, K. Varani and P. A. Borea (2013). "A(1) and A(3) adenosine receptors inhibit LPS-induced hypoxia-inducible factor-1 accumulation in murine astrocytes." *Pharmacol Res* **76**: 157-170.
- Ghosh, A., H. Schlecht, L. E. Heptinstall, J. K. Bassett, E. Cartwright, S. S. Bhaskar, J. Urquhart, A. Broomfield, A. A. Morris, E. Jameson, B. C. Schwahn, J. H. Walter, S. Douzgou, H. Murphy, C. Hendriksz, R. Sharma, G. Wilcox, E. Crushell, A. A. Monavari, R. Martin, A. Doolan, S. Senniappan, S. C. Ramsden, S. A. Jones and S. Banka (2017). "Diagnosing childhood-onset inborn errors of metabolism by next-generation sequencing." *Arch Dis Child* **102**(11): 1019-1029.
- Giudice, A., C. Arra and M. C. Turco (2010). "Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents." *Methods Mol Biol* **647**: 37-74.
- Giugliani, R., C. S. Dutra-Filho, M. L. Barth, J. C. Dutra, M. Wajner, C. M. Wannmacher and L. T. Montagner (1989). "Inborn errors of metabolism. Sensitivity of screening tests in high risk patients." *Clin Pediatr (Phila)* **28**(11): 494-497.
- Goncalves, C. A., L. Rodrigues, L. D. Bobermin, C. Zanotto, A. Vizuete, A. Quincozes-Santos, D. O. Souza and M. C. Leite (2018). "Glycolysis-Derived Compounds

- From Astrocytes That Modulate Synaptic Communication." Front Neurosci **12**: 1035.
- Gooneratne, N. S., A. Y. Edwards, C. Zhou, N. Cuellar, M. A. Grandner and J. S. Barrett (2012). "Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults." J Pineal Res **52**(4): 437-445.
- Goyenechea, E., F. Andrade, J. de Las Heras, S. Lage, J. A. Prieto, N. Ruiz and L. Aldamiz-Echevarria (2012). "Expression of proinflammatory factors in renal cortex induced by methylmalonic acid." Ren Fail **34**(7): 885-891.
- Grinan-Ferre, C., A. Bellver-Sanchis, V. Izquierdo, R. Corpas, J. Roig-Soriano, M. Chillon, C. Andres-Lacueva, M. Somogyvari, C. Soti, C. Sanfeliu and M. Pallas (2021). "The pleiotropic neuroprotective effects of resveratrol in cognitive decline and Alzheimer's disease pathology: From antioxidant to epigenetic therapy." Ageing Res Rev **67**: 101271.
- Grings, M., A. P. Moura, B. Parmeggiani, J. T. Pletsch, G. M. F. Cardoso, P. M. August, C. Matte, A. T. S. Wyse, M. Wajner and G. Leinritz (2017). "Bezafibrate prevents mitochondrial dysfunction, antioxidant system disturbance, glial reactivity and neuronal damage induced by sulfite administration in striatum of rats: Implications for a possible therapeutic strategy for sulfite oxidase deficiency." Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis **1863**(9): 2135-2148.
- Gunata, M., H. Parlakpinar and H. A. Acet (2020). "Melatonin: A review of its potential functions and effects on neurological diseases." Rev Neurol (Paris) **176**(3): 148-165.
- Hardeland, R., D. P. Cardinali, V. Srinivasan, D. W. Spence, G. M. Brown and S. R. Pandi-Perumal (2011). "Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule." Prog Neurobiol **93**(3): 350-384.
- Hasko, G., J. Linden, B. Cronstein and P. Pacher (2008). "Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases." Nat Rev Drug Discov **7**(9): 759-770.
- Hasko, G., P. Pacher, E. S. Vizi and P. Illes (2005). "Adenosine receptor signaling in the brain immune system." Trends Pharmacol Sci **26**(10): 511-516.
- Hertz, L. (2006). "Glutamate, a neurotransmitter--and so much more. A synopsis of Wierzba III." Neurochem Int **48**(6-7): 416-425.
- Hertz, L. and D. L. Rothman (2017). "Glutamine-Glutamate Cycle Flux Is Similar in Cultured Astrocytes and Brain and Both Glutamate Production and Oxidation Are Mainly Catalyzed by Aspartate Aminotransferase." Biology (Basel) **6**(1).
- Hirotsu, A., E. Kusudo, N. Mori, Y. Miyai, K. Suzuki, S. Kawamoto and K. Fukuda (2018). "Successful perioperative management of living-donor liver transplantation for a patient with severe methylmalonic acidemia: a case report." JA Clin Rep **4**(1): 83.
- Horster, F., M. R. Baumgartner, C. Viardot, T. Suormala, P. Burgard, B. Fowler, G. F. Hoffmann, S. F. Garbade, S. Kolker and E. R. Baumgartner (2007). "Long-term outcome in methylmalonic acidurias is influenced by the underlying defect (mut0, mut-, cblA, cblB)." Pediatr Res **62**(2): 225-230.
- Hou, C. Y., Y. L. Tain, H. R. Yu and L. T. Huang (2019). "The Effects of Resveratrol in the Treatment of Metabolic Syndrome." Int J Mol Sci **20**(3).
- Ikeshima-Kataoka, H. (2016). "Neuroimmunological Implications of AQP4 in Astrocytes." Int J Mol Sci **17**(8).
- Ismail, I. T., M. R. Showalter and O. Fiehn (2019). "Inborn Errors of Metabolism in the Era of Untargeted Metabolomics and Lipidomics." Metabolites **9**(10).

- Jafari, P., O. Braissant, P. Zavadakova, H. Henry, L. Bonafe and D. Ballhausen (2013). "Brain damage in methylmalonic aciduria: 2-methylcitrate induces cerebral ammonium accumulation and apoptosis in 3D organotypic brain cell cultures." Orphanet J Rare Dis **8**: 4.
- Jazwa, A. and A. Cuadrado (2010). "Targeting heme oxygenase-1 for neuroprotection and neuroinflammation in neurodegenerative diseases." Curr Drug Targets **11**(12): 1517-1531.
- Jensen, C. J., A. Massie and J. De Keyser (2013). "Immune players in the CNS: the astrocyte." J Neuroimmune Pharmacol **8**(4): 824-839.
- Jumnongprakhon, P., P. Govitrapong, C. Tocharus, D. Pinkaew and J. Tocharus (2015). "Melatonin Protects Methamphetamine-Induced Neuroinflammation Through NF-kappaB and Nrf2 Pathways in Glioma Cell Line." Neurochem Res **40**(7): 1448-1456.
- Junqueira, D., A. M. Brusque, L. O. Porciuncula, L. N. Rotta, C. A. Ribeiro, M. E. Frizzo, C. S. Dutra Filho, C. M. Wannmacher, A. T. Wyse, D. O. Souza and M. Wajner (2003). "Effects of L-2-hydroxyglutaric acid on various parameters of the glutamatergic system in cerebral cortex of rats." Metab Brain Dis **18**(3): 233-243.
- Kalliolias, G. D. and L. B. Ivashkiv (2016). "TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies." Nat Rev Rheumatol **12**(1): 49-62.
- Kolker, S., S. W. Sauer, R. A. Surtees and J. V. Leonard (2006). "The aetiology of neurological complications of organic acidaemias—a role for the blood-brain barrier." J Inher Metab Dis **29**(6): 701-704; discussion 705-706.
- Krasnow, S. M., J. G. Knoll, S. C. Verghese, P. R. Lavesseur and D. L. Marks (2017). "Amplification and propagation of interleukin-1beta signaling by murine brain endothelial and glial cells." J Neuroinflammation **14**(1): 133.
- Kwon, H. S. and S. H. Koh (2020). "Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes." Transl Neurodegener **9**(1): 42.
- Lange, K. W. and S. Li (2018). "Resveratrol, pterostilbene, and dementia." Biofactors **44**(1): 83-90.
- Lee, J. G., Y. S. Woo, S. W. Park, D. H. Seog, M. K. Seo and W. M. Bahk (2019). "The Neuroprotective Effects of Melatonin: Possible Role in the Pathophysiology of Neuropsychiatric Disease." Brain Sci **9**(10).
- Lee, M., T. Cho, N. Jantaratnotai, Y. T. Wang, E. McGeer and P. L. McGeer (2010). "Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases." FASEB J **24**(7): 2533-2545.
- Li, L., H. Zhang, M. Varrin-Doyer, S. S. Zamvil and A. S. Verkman (2011). "Proinflammatory role of aquaporin-4 in autoimmune neuroinflammation." FASEB J **25**(5): 1556-1566.
- Li, Q., H. Jin, Y. Liu, Y. Rong, T. Yang, X. Nie and W. Song (2021). "Determination of Cytokines and Oxidative Stress Biomarkers in Cognitive Impairment Induced by Methylmalonic Acidemia." Neuroimmunomodulation **28**(3): 178-186.
- Li, Q., W. Song, Z. Tian and P. Wang (2017). "Aminoguanidine alleviated MMA-induced impairment of cognitive ability in rats by downregulating oxidative stress and inflammatory reaction." Neurotoxicology **59**: 121-130.
- Liddell, J. R. (2017). "Are Astrocytes the Predominant Cell Type for Activation of Nrf2 in Aging and Neurodegeneration?" Antioxidants (Basel) **6**(3).
- Lim, J. L., M. M. Wilhelmus, H. E. de Vries, B. Drukarch, J. J. Hoozemans and J. van Horsen (2014). "Antioxidative defense mechanisms controlled by Nrf2: state-of-the-art and clinical perspectives in neurodegenerative diseases." Arch Toxicol **88**(10): 1773-1786.

- Limon-Pacheco, J. H. and M. E. Gensebatt (2010). "The glutathione system and its regulation by neurohormone melatonin in the central nervous system." Cent Nerv Syst Agents Med Chem **10**(4): 287-297.
- Liu, T., L. Zhang, D. Joo and S. C. Sun (2017). "NF-kappaB signaling in inflammation." Signal Transduct Target Ther **2**.
- Loboda, A., M. Damulewicz, E. Pyza, A. Jozkowicz and J. Dulak (2016). "Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism." Cell Mol Life Sci **73**(17): 3221-3247.
- Lu, S. C. (2013). "Glutathione synthesis." Biochim Biophys Acta **1830**(5): 3143-3153.
- Lubos, E., J. Loscalzo and D. E. Handy (2011). "Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities." Antioxid Redox Signal **15**(7): 1957-1997.
- Ma, Q. (2013). "Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity." Annu Rev Pharmacol Toxicol **53**: 401-426.
- Mahmood, D. (2019). "Pleiotropic Effects of Melatonin." Drug Res (Stuttg) **69**(2): 65-74.
- Mak, C. M., H. C. Lee, A. Y. Chan and C. W. Lam (2013). "Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update." Crit Rev Clin Lab Sci **50**(6): 142-162.
- Malaguarnera, L. (2019). "Influence of Resveratrol on the Immune Response." Nutrients **11**(5).
- Manoli, I., J. L. Sloan and C. P. Venditti (2005). Isolated Methylmalonic Acidemia. GeneReviews((R)). M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon et al. Seattle (WA).
- Maragakis, N. J. and J. D. Rothstein (2006). "Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease." Nat Clin Pract Neurol **2**(12): 679-689.
- Marti Navia, A., D. Dal Ben, C. Lambertucci, A. Spinaci, R. Volpini, I. Marques-Morgado, J. E. Coelho, L. V. Lopes, G. Marucci and M. Buccioni (2020). "Adenosine Receptors as Neuroinflammation Modulators: Role of A1 Agonists and A2A Antagonists." Cells **9**(7).
- Matalonga, L., L. Gort and A. Ribes (2017). "Small molecules as therapeutic agents for inborn errors of metabolism." J Inherit Metab Dis **40**(2): 177-193.
- Mayer, M. L. and N. Armstrong (2004). "Structure and function of glutamate receptor ion channels." Annu Rev Physiol **66**: 161-181.
- McBean, G. J. (2017). "Cysteine, Glutathione, and Thiol Redox Balance in Astrocytes." Antioxidants (Basel) **6**(3).
- McKenna, M. C., M. H. Stridh, L. F. McNair, U. Sonnewald, H. S. Waagepetersen and A. Schousboe (2016). "Glutamate oxidation in astrocytes: Roles of glutamate dehydrogenase and aminotransferases." J Neurosci Res **94**(12): 1561-1571.
- Medzhitov, R. (2008). "Origin and physiological roles of inflammation." Nature **454**(7203): 428-435.
- Meldrum, B. S. (2000). "Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology." J Nutr **130**(4S Suppl): 1007S-1015S.
- Melo, D. R., A. J. Kowaltowski, M. Wajner and R. F. Castilho (2011). "Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia." J Bioenerg Biomembr **43**(1): 39-46.
- Melo, D. R., S. R. Mirandola, N. A. Assuncao and R. F. Castilho (2012). "Methylmalonate impairs mitochondrial respiration supported by NADH-linked substrates: involvement of mitochondrial glutamate metabolism." J Neurosci Res **90**(6): 1190-1199.
- Mendiola, A. S. and A. E. Cardona (2018). "The IL-1beta phenomena in neuroinflammatory diseases." J Neural Transm (Vienna) **125**(5): 781-795.

- Miao, L. and D. K. St Clair (2009). "Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease." Free Radic Biol Med **47**(4): 344-356.
- Minghetti, L. (2004). "Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases." J Neuropathol Exp Neurol **63**(9): 901-910.
- Montanari, C., S. Parolisi, E. Borghi, L. Putignani, G. Bassanini, J. Zuvadelli, C. Bonfanti, A. Tummolo, C. Dionisi Vici, G. Biasucci, A. Burlina, M. T. Carbone and E. Verduci (2021). "Dysbiosis, Host Metabolism, and Non-communicable Diseases: Dialogue in the Inborn Errors of Metabolism." Front Physiol **12**: 716520.
- Moussa, C., M. Hebron, X. Huang, J. Ahn, R. A. Rissman, P. S. Aisen and R. S. Turner (2017). "Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer's disease." J Neuroinflammation **14**(1): 1.
- Murphy, A., A. Vines and G. J. McBean (2009). "Stimulation of EAAC1 in C6 glioma cells by store-operated calcium influx." Biochim Biophys Acta **1788**(2): 551-558.
- Nakav, S., C. Chaimovitz, Y. Sufaro, E. C. Lewis, G. Shaked, D. Czeiger, M. Zlotnik and A. Douvdevani (2008). "Anti-inflammatory preconditioning by agonists of adenosine A1 receptor." PLoS One **3**(5): e2107.
- Narasimhan, P., R. Sklar, M. Murrell, R. A. Swanson and F. R. Sharp (1996). "Methylmalonyl-CoA mutase induction by cerebral ischemia and neurotoxicity of the mitochondrial toxin methylmalonic acid." J Neurosci **16**(22): 7336-7346.
- NaveenKumar, S. K., M. Hemshekhar, S. Jagadish, K. Manikanta, G. J. Vishalakshi, K. Kemparaju and K. S. Girish (2020). "Melatonin restores neutrophil functions and prevents apoptosis amid dysfunctional glutathione redox system." J Pineal Res **69**(3): e12676.
- Newsholme, P., M. M. Lima, J. Procopio, T. C. Pithon-Curi, S. Q. Doi, R. B. Bazotte and R. Curi (2003). "Glutamine and glutamate as vital metabolites." Braz J Med Biol Res **36**(2): 153-163.
- Newsholme, P., J. Procopio, M. M. Lima, T. C. Pithon-Curi and R. Curi (2003). "Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function." Cell Biochem Funct **21**(1): 1-9.
- Ng, A., W. W. Tam, M. W. Zhang, C. S. Ho, S. F. Husain, R. S. McIntyre and R. C. Ho (2018). "IL-1beta, IL-6, TNF- alpha and CRP in Elderly Patients with Depression or Alzheimer's disease: Systematic Review and Meta-Analysis." Sci Rep **8**(1): 12050.
- Nijland, P. G., M. E. Witte, B. van het Hof, S. van der Pol, J. Bauer, H. Lassmann, P. van der Valk, H. E. de Vries and J. van Horssen (2014). "Astroglial PGC-1alpha increases mitochondrial antioxidant capacity and suppresses inflammation: implications for multiple sclerosis." Acta Neuropathol Commun **2**: 170.
- Nopparat, C., V. Chantadol, K. Permpoonputtana and P. Govitrapong (2017). "The anti-inflammatory effect of melatonin in SH-SY5Y neuroblastoma cells exposed to sublethal dose of hydrogen peroxide." Mech Ageing Dev **164**: 49-60.
- Okun, J. G., F. Horster, L. M. Farkas, P. Feyh, A. Hinz, S. Sauer, G. F. Hoffmann, K. Unsicker, E. Mayatepek and S. Kolker (2002). "Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity." J Biol Chem **277**(17): 14674-14680.
- Olmos, G. and J. Llado (2014). "Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity." Mediators Inflamm **2014**: 861231.

- Olsen, R. K., N. Cornelius and N. Gregersen (2015). "Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism." J Inherit Metab Dis **38**(4): 703-719.
- Palos, T. P., B. Ramachandran, R. Boado and B. D. Howard (1996). "Rat C6 and human astrocytic tumor cells express a neuronal type of glutamate transporter." Brain Res Mol Brain Res **37**(1-2): 297-303.
- Panday, S., R. Talreja and M. Kavdia (2020). "The role of glutathione and glutathione peroxidase in regulating cellular level of reactive oxygen and nitrogen species." Microvasc Res **131**: 104010.
- Parkin, G. M., M. Udawela, A. Gibbons and B. Dean (2018). "Glutamate transporters, EAAT1 and EAAT2, are potentially important in the pathophysiology and treatment of schizophrenia and affective disorders." World J Psychiatry **8**(2): 51-63.
- Parpura, V., M. T. Heneka, V. Montana, S. H. Oliet, A. Schousboe, P. G. Haydon, R. F. Stout, Jr., D. C. Spray, A. Reichenbach, T. Pannicke, M. Pekny, M. Pekna, R. Zorec and A. Verkhratsky (2012). "Glial cells in (patho)physiology." J Neurochem **121**(1): 4-27.
- Pfeiffer, S. E., H. R. Herschman, J. Lightbody and G. Sato (1970). "Synthesis by a clonal line of rat glial cells of a protein unique to the nervous system." J Cell Physiol **75**(3): 329-339.
- Phatnani, H. and T. Maniatis (2015). "Astrocytes in neurodegenerative disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(6).
- Pisoschi, A. M. and A. Pop (2015). "The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review." Eur J Med Chem **97**: 55-74.
- Platt, S. R. (2007). "The role of glutamate in central nervous system health and disease-a review." Vet J **173**(2): 278-286.
- Portela, J. L., M. C. Bianchini, A. A. Boligon, M. R. S. Carrico, R. Roehrs, F. A. A. Soares, M. G. de Gomes, W. Hassan and R. L. Puntel (2019). "Ilex paraguariensis Attenuates Changes in Mortality, Behavioral and Biochemical Parameters Associated to Methyl Malonate or Malonate Exposure in *Drosophila melanogaster*." Neurochem Res **44**(9): 2202-2214.
- Proctor, E. C., N. Turton, E. J. Boan, E. Bennett, S. Philips, R. A. Heaton and I. P. Hargreaves (2020). "The Effect of Methylmalonic Acid Treatment on Human Neuronal Cell Coenzyme Q10 Status and Mitochondrial Function." Int J Mol Sci **21**(23).
- Puigserver, P. and B. M. Spiegelman (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator." Endocr Rev **24**(1): 78-90.
- Quincozes-Santos, A., A. C. Andreazza, C. A. Goncalves and C. Gottfried (2010). "Actions of redox-active compound resveratrol under hydrogen peroxide insult in C6 astroglial cells." Toxicol In Vitro **24**(3): 916-920.
- Quincozes-Santos, A., A. C. Andreazza, P. Nardin, C. Funchal, C. A. Goncalves and C. Gottfried (2007). "Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells." Neurotoxicology **28**(4): 886-891.
- Quincozes-Santos, A., L. D. Bobermin, A. M. de Assis, C. A. Goncalves and D. O. Souza (2017). "Fluctuations in glucose levels induce glial toxicity with glutamatergic, oxidative and inflammatory implications." Biochim Biophys Acta **1863**(1): 1-14.
- Quincozes-Santos, A., L. D. Bobermin, A. Latini, M. Wajner, D. O. Souza, C. A. Goncalves and C. Gottfried (2013). "Resveratrol protects C6 astrocyte cell line

- against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1." PLoS One **8**(5): e64372.
- Quincozes-Santos, A., L. D. Bobermin, D. G. Souza, B. Bellaver, C. A. Goncalves and D. O. Souza (2014). "Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role of heme oxygenase 1." J Neurochem **130**(1): 61-74.
- Quincozes-Santos, A., P. Nardin, D. F. de Souza, D. P. Gelain, J. C. Moreira, A. Latini, C. A. Goncalves and C. Gottfried (2009). "The janus face of resveratrol in astroglial cells." Neurotox Res **16**(1): 30-41.
- Quincozes-Santos, A., C. L. Santos, R. R. de Souza Almeida, A. da Silva, N. K. Thomaz, N. L. F. Costa, F. B. Weber, I. Schmitz, L. S. Medeiros, L. Medeiros, B. S. Dotto, F. R. P. Dias, V. Sovrani and L. D. Bobermin (2021). "Gliotoxicity and Glioprotection: the Dual Role of Glial Cells." Mol Neurobiol.
- Ramirez-Garza, S. L., E. P. Laveriano-Santos, M. Marhuenda-Munoz, C. E. Storniolo, A. Tresserra-Rimbau, A. Vallverdu-Queralt and R. M. Lamuela-Raventos (2018). "Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials." Nutrients **10**(12).
- Ramsay, J., J. Morton, M. Norris and S. Kanungo (2018). "Organic acid disorders." Ann Transl Med **6**(24): 472.
- Reiter, R. J., J. C. Mayo, D. X. Tan, R. M. Sainz, M. Alatorre-Jimenez and L. Qin (2016). "Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers." J Pineal Res **61**(3): 253-278.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, J. C. Mayo, R. M. Sainz, J. Leon and Z. Czarnocki (2003). "Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans." Acta Biochim Pol **50**(4): 1129-1146.
- Ribeiro, L. R., I. D. Della-Pace, A. P. de Oliveira Ferreira, V. R. Funck, S. Pinton, F. Bobinski, C. V. de Oliveira, F. da Silva Fiorin, M. M. Duarte, A. F. Furian, M. S. Oliveira, C. W. Nogueira, A. R. Dos Santos, L. F. Royes and M. R. Figuera (2013). "Chronic administration of methylmalonate on young rats alters neuroinflammatory markers and spatial memory." Immunobiology **218**(9): 1175-1183.
- Ribeiro, L. R., M. R. Figuera, M. S. Oliveira, A. F. Furian, L. M. Rambo, A. P. Ferreira, A. L. Saraiva, M. A. Souza, F. D. Lima, D. V. Magni, R. Dezengrini, E. F. Flores, D. A. Butterfield, J. Ferreira, A. R. dos Santos, C. F. Mello and L. F. Royes (2009). "Methylmalonate-induced seizures are attenuated in inducible nitric oxide synthase knockout mice." Int J Dev Neurosci **27**(2): 157-163.
- Rius-Perez, S., I. Torres-Cuevas, I. Millan, A. L. Ortega and S. Perez (2020). "PGC-1alpha, Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism." Oxid Med Cell Longev **2020**: 1452696.
- Rizor, A., E. Pajarillo, J. Johnson, M. Aschner and E. Lee (2019). "Astrocytic Oxidative/Nitrosative Stress Contributes to Parkinson's Disease Pathogenesis: The Dual Role of Reactive Astrocytes." Antioxidants (Basel) **8**(8).
- Rodrigues, M. D. N., B. Seminotti, A. Zanatta, A. de Mello Goncalves, B. Bellaver, A. U. Amaral, A. Quincozes-Santos, S. I. Goodman, M. Wootner, D. O. Souza and M. Wajner (2017). "Higher Vulnerability of Menadione-Exposed Cortical Astrocytes of Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient Mice to Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Cell Death: Implications for the Neurodegeneration in Glutaric Aciduria Type I." Mol Neurobiol **54**(6): 4795-4805.

- Saad, L. O., S. R. Mirandola, E. N. Maciel and R. F. Castilho (2006). "Lactate dehydrogenase activity is inhibited by methylmalonate in vitro." Neurochem Res **31**(4): 541-548.
- Salim, S. (2017). "Oxidative Stress and the Central Nervous System." J Pharmacol Exp Ther **360**(1): 201-205.
- Sanchez-Lopez, A. L., G. G. Ortiz, F. P. Pacheco-Moises, M. A. Mireles-Ramirez, O. K. Bitzer-Quintero, D. L. C. Delgado-Lara, L. J. Ramirez-Jirano and I. E. Velazquez-Brizuela (2018). "Efficacy of Melatonin on Serum Pro-inflammatory Cytokines and Oxidative Stress Markers in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis." Arch Med Res **49**(6): 391-398.
- Satarker, S., S. L. Bojja, P. C. Gurram, J. Mudgal, D. Arora and M. Nampoothiri (2022). "Astrocytic Glutamatergic Transmission and Its Implications in Neurodegenerative Disorders." Cells **11**(7).
- Sawada, M., N. Kondo, A. Suzumura and T. Marunouchi (1989). "Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture." Brain Res **491**(2): 394-397.
- Scatizzi, J. C., M. Mavers, J. Hutcheson, B. Young, B. Shi, R. M. Pope, E. M. Ruderman, D. S. Samways, J. A. Corbett, T. M. Egan and H. Perlman (2009). "The CDK domain of p21 is a suppressor of IL-1beta-mediated inflammation in activated macrophages." Eur J Immunol **39**(3): 820-825.
- Schousboe, A. and H. S. Waagepetersen (2005). "Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity." Neurotox Res **8**(3-4): 221-225.
- Schuck, P. F., L. Alves, L. F. Pettenuzzo, F. Felisberto, L. B. Rodrigues, B. W. Freitas, F. Petronilho, F. Dal-Pizzol, E. L. Streck and G. C. Ferreira (2013). "Acute renal failure potentiates methylmalonate-induced oxidative stress in brain and kidney of rats." Free Radic Res **47**(3): 233-240.
- Singh, A. P., R. Singh, S. S. Verma, V. Rai, C. H. Kaschula, P. Maiti and S. C. Gupta (2019). "Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies." Med Res Rev **39**(5): 1851-1891.
- Sivandzade, F., S. Prasad, A. Bhalerao and L. Cucullo (2019). "NRF2 and NF-B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches." Redox Biol **21**: 101059.
- Sofroniew, M. V. (2014). "Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators." Neuroscientist **20**(2): 160-172.
- Stephenson, J., E. Nutma, P. van der Valk and S. Amor (2018). "Inflammation in CNS neurodegenerative diseases." Immunology **154**(2): 204-219.
- Tak, P. P. and G. S. Firestein (2001). "NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases." J Clin Invest **107**(1): 7-11.
- Tarocco, A., N. Carocchia, G. Morciano, M. R. Wieckowski, G. Ancora, G. Garani and P. Pinton (2019). "Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care." Cell Death Dis **10**(4): 317.
- Tellone, E., A. Galtieri, A. Russo, B. Giardina and S. Ficarra (2015). "Resveratrol: A Focus on Several Neurodegenerative Diseases." Oxid Med Cell Longev **2015**: 392169.
- Tian, Q., X. Fan, J. Ma, Y. Han, D. Li, S. Jiang, F. Zhang, H. Guang, X. Shan, R. Chen, P. Wang, Q. Wang, J. Yang, Y. Wang, L. Hu, Y. Shentu, Y. Gong and J. Fan (2020). "Resveratrol ameliorates lipopolysaccharide-induced anxiety-like behavior by attenuating YAP-mediated neuro-inflammation and promoting hippocampal autophagy in mice." Toxicol Appl Pharmacol **408**: 115261.

- Toyoshima, S., F. Watanabe, H. Saido, E. H. Pezacka, D. W. Jacobsen, K. Miyatake and Y. Nakano (1996). "Accumulation of methylmalonic acid caused by vitamin B12-deficiency disrupts normal cellular metabolism in rat liver." Br J Nutr **75**(6): 929-938.
- Trabelsi, Y., M. Amri, H. Becq, F. Molinari and L. Aniksztejn (2017). "The conversion of glutamate by glutamine synthase in neocortical astrocytes from juvenile rat is important to limit glutamate spillover and peri/extrasynaptic activation of NMDA receptors." Glia **65**(2): 401-415.
- Traynelis, S. F., L. P. Wollmuth, C. J. McBain, F. S. Menniti, K. M. Vance, K. K. Ogden, K. B. Hansen, H. Yuan, S. J. Myers and R. Dingledine (2010). "Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function." Pharmacol Rev **62**(3): 405-496.
- Tuncel, A. T., N. Boy, M. A. Morath, F. Horster, U. Mutze and S. Kolker (2018). "Organic acidurias in adults: late complications and management." J Inherit Metab Dis **41**(5): 765-776.
- Vaidyanathan, K., M. P. Narayanan and D. M. Vasudevan (2011). "Organic acidurias: an updated review." Indian J Clin Biochem **26**(4): 319-325.
- Verkhatsky, A. and M. Nedergaard (2018). "Physiology of Astroglia." Physiol Rev **98**(1): 239-389.
- Verkhatsky, A., M. Nedergaard and L. Hertz (2015). "Why are astrocytes important?" Neurochem Res **40**(2): 389-401.
- Viegas, C. M., A. Zanatta, M. Grings, F. H. Hickmann, W. O. Monteiro, L. E. Soares, A. Sitta, G. Leipnitz, F. H. de Oliveira and M. Wajner (2014). "Disruption of redox homeostasis and brain damage caused in vivo by methylmalonic acid and ammonia in cerebral cortex and striatum of developing rats." Free Radic Res **48**(6): 659-669.
- Villani, G. R., G. Gallo, E. Scolamiero, F. Salvatore and M. Ruoppolo (2017). "'Classical organic acidurias': diagnosis and pathogenesis." Clin Exp Med **17**(3): 305-323.
- Wajner, M. (2019). "Neurological manifestations of organic acidurias." Nat Rev Neurol.
- Wajner, M. and J. C. Coelho (1997). "Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production." J Inherit Metab Dis **20**(6): 761-768.
- Wang, D. D. and A. Bordey (2008). "The astrocyte odyssey." Prog Neurobiol **86**(4): 342-367.
- Wegiel, B., Z. Nemeth, M. Correa-Costa, A. C. Bulmer and L. E. Otterbein (2014). "Heme oxygenase-1: a metabolic nike." Antioxid Redox Signal **20**(11): 1709-1722.
- Wongkittichote, P., G. Cunningham, M. L. Summar, E. Pumbo, P. Forny, M. R. Baumgartner and K. A. Chapman (2019). "Tricarboxylic acid cycle enzyme activities in a mouse model of methylmalonic aciduria." Mol Genet Metab **128**(4): 444-451.
- Xia, N., A. Daiber, U. Forstermann and H. Li (2017). "Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system." Br J Pharmacol **174**(12): 1633-1646.
- Yang, L., B. Guo, X. Li, X. Liu, X. Wei and L. Guo (2020). "Brain MRI features of methylmalonic acidemia in children: the relationship between neuropsychological scores and MRI findings." Sci Rep **10**(1): 13099.
- Zelova, H. and J. Hosek (2013). "TNF-alpha signalling and inflammation: interactions between old acquaintances." Inflamm Res **62**(7): 641-651.
- Zhang, Q., M. J. Lenardo and D. Baltimore (2017). "30 Years of NF-kappaB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology." Cell **168**(1-2): 37-57.

- Zhou, X., Y. Cui and J. Han (2018). "Methylmalonic acidemia: Current status and research priorities." Intractable Rare Dis Res **7**(2): 73-78.
- Zonis, S., R. N. Pechnick, V. A. Ljubimov, M. Mahgerefteh, K. Wawrowsky, K. S. Michelsen and V. Chesnokova (2015). "Chronic intestinal inflammation alters hippocampal neurogenesis." J Neuroinflammation **12**: 65.
- Zwickler, T., G. Haege, A. Riderer, F. Horster, G. F. Hoffmann, P. Burgard and S. Kolker (2012). "Metabolic decompensation in methylmalonic aciduria: which biochemical parameters are discriminative?" J Inherit Metab Dis **35**(5): 797-806.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via metabólica da acidemia metilmalônica.