

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

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAESTRIATAL DO ÁCIDO
ETILMALÔNICO SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO EM CÉREBRO
DE RATOS JOVENS**

Luciana Ritter

Orientador: Dr. César Augusto João Ribeiro

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica.**

Porto Alegre, 2014.

Aos meus pais, Luiz Antonio e Susanna.

CIP - Catalogação na Publicação

Ritter, Luciana

Efeitos da administração intraestriatal do ácido etilmalônico sobre o metabolismo energético em cérebro de ratos jovens / Luciana Ritter. -- 2014.
73 f.

Orientador: César Augusto João Ribeiro.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2014.

1. metabolismo energético. 2. ácido etilmalônico.
3. estriado. I. Ribeiro, César Augusto João, orient.
II. Título.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”

Eduardo Galeano

Agradecimentos:

Gostaria de agradecer, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao departamento de bioquímica, pela infraestrutura que proporcionou que meu trabalho fosse desenvolvido.

Ao meu orientador, César Ribeiro, pela paciência, dedicação e conhecimentos transmitidos.

Ao professor Moacir Wajner, pelo carinho e por me proporcionar um grande aprendizado durante estes anos.

Aos meus colegas de laboratório, 38 e 27, pelo convívio, aprendizado, ajuda e momentos divertidos durante estes anos.

À Paula Eichler, com quem trabalhei grande parte do meu tempo como bolsista de iniciação científica, pelo grande aprendizado.

A minha bolsista Daniele Kleemann, por toda a dedicação e ajuda, fundamentais para a execução do meu trabalho.

À Fernanda Hickmann (Duda), por toda a ajuda na parte inicial do meu mestrado e pelo companheirismo na faculdade de farmácia e na nossa época de bolsistas.

A minha parceria de almoços, Carolina Fernandes, pelas risadas e bobagens compartilhadas

À Bianca Seminotti, pelas conversas com chimarrão às 7:30 da manhã e pelo apoio durante o meu mestrado.

Ao meu namorado Jefferson, pelo amor, apoio e por aguentar minhas reclamações quando nada dava certo.

Ao meu irmão, Luiz Felipe, meu grande exemplo de inteligência, meu companheiro de sempre.

Por último e que considero mais importante: aos meus pais, Luiz Antonio e Susanna, a quem dedico este trabalho. Por terem me ensinado a dar valor aos estudos e pelos esforços para que eu tivesse uma educação de qualidade em

bons colégios. Por todo amor, dedicação e por sempre apoiarem as minhas escolhas.

Obrigada!

SUMÁRIO

PARTE I

Resumo	8
Abstract	10
Lista de abreviaturas	12

I.1 INTRODUÇÃO

I.1.1 Erros Inatos do Metabolismo	14
I.1.2 Acidúrias Orgânicas	16
I.1.3 Acidúria Etilmalônica	17
I.1.4 Deficiência da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta	17
I.1.5 Encefalopatia Etilmalônica	20
I.1.6 Metabolismo energético cerebral	21
I.1.7 Metabolismo energético cerebral em doenças neurodegenerativas	23
I.1.8 Mecanismos fisiopatogênicos das doenças onde o ácido etilmalônico está acumulados	25

I.2 OBJETIVOS

I.2.1 Objetivo geral	26
I.2.2 Objetivos específicos	26

PARTE II

Capítulo I	28
------------------	----

PARTE III

III.1 Discussão	59
III.2 Conclusões	63
III.3 Perspectivas	64

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
LISTA DE FIGURAS	73

PARTE I:

Introdução e Objetivos

RESUMO

Os mecanismos fisiopatológicos exatos, responsáveis pelas manifestações clínicas das doenças em que altas concentrações de ácido etilmalônico (EMA) têm sido observadas como a deficiência da atividade das acil-CoA de cadeia curta (SCADD) e a encefalopatia etilmalônica (EE), permanecem ainda desconhecidos. Dessa forma, no presente trabalho, investigamos os efeitos *ex vivo* da administração intraestriatal de EMA sobre importantes parâmetros do metabolismo energético em estriado de ratos jovens, incluindo a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glicose, as atividades dos complexos I-IV da cadeia respiratória (fosforilação oxidativa), da enzima creatina quinase (CK) (transferência intracelular de ATP) e a atividade da Na^+K^+ -ATPase (NaK) sináptica (neurotransmissão). Avaliamos também o efeito da injeção intraestriatal de EMA sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH), uma importante defesa antioxidante cerebral. O EMA reduziu significativamente a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glicose 2 e 24 horas após a injeção intraestriatal, sugerindo que esse metabólito compromete a atividade da via glicolítica e/ou ciclo do ácido cítrico. Além disso, o EMA diminuiu as atividades dos complexos II e II-III da cadeia respiratória apenas 24 horas após sua administração, bem como, a atividade da NaK de membrana sináptica em ambos os tempos. O EMA também diminuiu os níveis de GSH. O pré tratamento de ratos com N-acetilcisteína por 3 dias preveniu a redução nos níveis de GSH, causado pelo EMA, sem modificar a inibição da atividade da NaK. Considerando a importância da via glicolítica, do ciclo do ácido cítrico e do transporte de

elétrons através da cadeia respiratória para a transformação de energia e da NaK para a manutenção do potencial de membrana da célula, os dados apresentados indicam que o EMA altera a homeostase energética cerebral e a neurotransmissão. Presume-se que esses mecanismos possam estar envolvidos no dano neuronal encontrado nos pacientes afetados pela SCADD e pela EE.

ABSTRACT

The pathophysiological mechanism responsible for the clinical manifestations of the diseases in which high concentrations of ethylmalonic acid (EMA) have been observed as short acyl-CoA dehydrogenase deficiency activity (SCADD) and ethylmalonic encephalopathy (EE) are unknown. Therefore, in the present work we investigated the *in vivo* effects of administration of EMA (2 and 24 hours), on important parameters of energy metabolism in rat cerebral striatum, including $^{14}\text{CO}_2$ production from glucose, enzyme activities of the respiratory chain complexes I-IV (oxidative phosphorylation), creatine kinase (CK) (intracellular ATP transfer), and synaptic Na^+K^+ -ATPase (NaK) (neurotransmission). We also tested the effect of EMA on reduced glutathione (GSH) levels, an important non-enzymatic antioxidant defense. EMA significantly reduced $^{14}\text{CO}_2$ production from glucose 2 and 24 hours after its administration, implying that this compound compromises the citric acid cycle activity. Furthermore, EMA diminished the activities of complex II and II-III of the respiratory chain only 24 hours after administration and synaptic membrane NaK activity in both times. EMA also decreased the levels of GSH. Pre-treatment of rats with N-acetylcysteine for 3 days prevented the reduction of GSH levels caused by EMA, without modifying the inhibition of NaK activity. Considering the importance of the citric acid cycle and the glycolytic pathway, the electron flow through the respiratory chain for brain energy transformation and the NaK for the maintenance of the cell membrane potential, the present data indicate that EMA potentially impairs mitochondrial brain energy homeostasis and neurotransmission. We presumed that these pathomechanisms

are involved in the neurological damage found in patients affected by SCADD and EE.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACADS: Desidrogenases das acilas- CoA

CK: Creatina quinase

CoQ: Coenzima Q

CTE: Cadeia transportadora de elétrons

EE: Encefalopatia etilmalônica

EIM: Erros inatos do metabolismo

EMA: Ácido etilmalônico

ETF: Flavoproteína transferidora de elétrons

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

GSH: Glutathiona reduzida

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

MCAD: Desidrogenases das acilas-CoA de cadeia média

NaK: Enzima Na⁺K⁺ATPase

Pi: Fosfato

SCAD: Desidrogenases das acilas-CoA de cadeia curta

SCADD: Deficiência das desidrogenases das acilas-CoA de cadeia curta

SNC: Sistema nervoso central

VLCAD : Desidrogenases das acilas-CoA de cadeia muito longa

I.1 INTRODUÇÃO:

I.1.1. Erros inatos do metabolismo:

Até os dias de hoje, foram descritos mais de 500 erros inatos do metabolismo (EIM), a maioria envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Scriver, 2001). O termo foi utilizado pela primeira vez por Sir Archibald Garrod, no ano de 1908, para designar um grupo de doenças como a alcaptonúria, em que os indivíduos afetados apresentam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. A maior frequência dessa doença foi observada por ele em indivíduos pertencentes a uma mesma família e maior incidência em pacientes cujos pais apresentavam consanguinidade. A partir de tais observações e, levando em consideração as leis de Mendel aliado ao fato de os pais dos indivíduos afetados não apresentarem a doença, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para esse distúrbio. Visto que o ácido homogentísico é um metabólito normal na degradação proteica e que os pacientes apresentavam um excesso dele na urina, ele relacionou esse acúmulo a um bloqueio na rota de catabolismo do aminoácido tirosina.

Com o surgimento de novos distúrbios relacionados a alterações genéticas que envolviam o acúmulo de substâncias nos líquidos biológicos dos afetados, postulou-se que este grupo de doenças resultava de uma síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, com atividade enzimática ou não, pertencente ao metabolismo (Scriver, 2001). A ausência

ou deficiência severa na atividade de uma enzima leva a um bloqueio metabólico, com acúmulo de substratos e seus derivados (a formação de rotas metabólicas alternativas e a deficiência de produtos essenciais ao organismo (Bickel et al, 1987)) cuja repercussão clínica é variável no indivíduo, dependendo da rota afetada (Mittchell et al,2001). Embora individualmente raras, essas doenças em seu conjunto afetam aproximadamente 1 a cada 500/2.000 recém nascidos vivos (Baric et al, 2001).

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

As manifestações clínicas são muito variáveis e inespecíficas, inclusive entre pacientes que apresentam o mesmo distúrbio. Essa variação deve-se basicamente aos diferentes graus de deficiência enzimática, área do metabolismo e tecidos afetados. No período neonatal, algumas manifestações clínicas aparecem com maior frequência como: vômitos, diarréia, deficiência no crescimento, odor peculiar na pele e urina, convulsões, letargia, coma. Outras como atraso no desenvolvimento psicomotor e neurodegeneração progressiva podem aparecer mais tarde (Burton et al, 1987).

O protocolo para investigação laboratorial inicial é dirigido principalmente para o diagnóstico dos EIM de moléculas pequenas (aminoacidopatias, acidemias orgânicas, intolerância a açúcares, etc) através de uma triagem simples. Essa triagem contempla uma bateria de testes e cromatografia

semiquantitativa de aminoácidos em sangue e urina. Os testes de triagem urinários, em sua maioria, não são específicos mas o resultado positivo indica a necessidade de avaliações mais específicas.

A cromatografia de aminoácidos pode ser realizada em camada delgada ou em papel. É um teste semiquantitativo, pois somente avaliamos a presença de bandas aumentadas indicando que aquele aminoácido está em quantidade acima do normal (Ersser et al, 1976). É aconselhável realizar uma dosagem quantitativa, quando observamos que um aminoácido está em concentração elevada, através de uma cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou cromatografia de troca iônica (Joseph et al, 1986), dessa forma, avaliando a concentração exata do aminoácido em questão.

I.1.2. Acidúrias Orgânicas

As acidemias ou acidúrias orgânicas são distúrbios hereditários do metabolismo relativamente freqüentes em crianças hospitalizadas, onde ocorre o acúmulo tecidual de um ou mais ácidos carboxílicos (Chalmers et al, 1982: Scriver, 2001). Os pacientes afetados apresentam severa disfunção neurológica com anormalidades cerebrais relevantes (atrofia cerebral), cuja etiopatogenia é pouco conhecida. Isso ocorre devido a um bloqueio metabólico causado pela deficiência severa da atividade de uma enzima, usualmente do metabolismo dos aminoácidos, podendo também comprometer o metabolismo dos lipídios e dos carboidratos. Dessa forma, defeitos na oxidação dos ácidos graxos caracterizados bioquimicamente pelo acúmulo de ácidos dicarboxílicos

de cadeia média de carbonos, bem como, de vários ácidos carboxílicos específicos para cada doença, podem ser considerados como acidúrias orgânicas (Roe et al, 1995: Rinaldo et al, 1998).

I.1.3. Acidúria Etilmalônica

O aumento de ácido etilmalônico (>18-20 mmol/mol creatina) tem sido observado em várias desordens metabólicas com manifestações neurológicas como a encefalopatia etilmalônica (EE) e a deficiência da desidrogenase das Acilas-CoA de cadeia curta (SCADD).

I.1.4. Deficiência da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta:

A deficiência da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta (SCADD) (OMIM 201470) apresenta prevalência estimada em 1:50.000 nascidos vivos podendo acometer desde crianças com menos de um ano de idade até adultos. Embora tenha uma apresentação basicamente neurológica e muscular, caracterizada por atraso no desenvolvimento, convulsões, hipotonia, miopatia, epilepsia e desordens de comportamento (Zolkipli et al, 2011), muitos pacientes portadores de SCADD são assintomáticos.

As desidrogenases das acilas-CoA (ACADs) são uma família de enzimas que catalizam a α,β desidrogenação dos ésteres acil-CoA, transferindo elétrons para a flavoproteína transferidora de elétrons (ETF). As desidrogenases de acilas-CoA de cadeia muito longa (VLCAD), cadeia média (MCAD) e cadeia

curta (SCAD) catalizam o primeiro passo na β -oxidação, cujos substratos ótimos são respectivamente ácidos graxos com 16, 8 e 4 carbonos. A oxidação mitocondrial de ácidos graxos resulta na clivagem sequencial de duas unidades de carbono dos ácidos graxos e representa uma importante fonte de energia para o corpo durante episódios de jejum e estresse metabólico. Essa oxidação é também fonte contínua de energia para o músculo cardíaco.

Acredita-se que a prevalência das desordens de oxidação de ácidos graxos seja subestimada, visto que seu diagnóstico depende da detecção dos metabólitos acumulados por métodos sofisticados e equipamentos de alto custo que poucos laboratórios possuem (Walker et al, 1994). Além disso, devido à semelhança do quadro clínico, uma parte considerável dos pacientes afetados por defeitos de oxidação de ácidos graxos é diagnosticada erroneamente como síndrome de morte súbita da infância, infecção bacteriana aguda (septicemia), síndrome de Reye, fígado gorduroso da gravidez ou síndrome de vômito cíclico (Rinaldo et al, 1998).

Aproximadamente 60 mutações no gene da SCADD foram descritos, sendo essa doença classificada de duas formas:

- Uma forma primária: causada por alterações no gene que codificada a enzima;
- e uma secundária, ocasionada por um defeito na flavoproteína-ubiquinona oxirredutase transferidora de elétrons ou por deficiência de dinucleotídeo de flavina e adenina (Gregersen et al., 1998; Nagan et al., 2003).

A SCAD é um homotetrâmero, no qual cada monômero contém uma ligação não covalente e uma molécula de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como grupo prostético. Ela é codificada no genoma nuclear como uma proteína precursora mas, comum a todas ACADs, é a sua função na mitocôndria. A redução da enzima, via desidrogenação do substrato, ocorre quando o resíduo de glutamato age como uma base catalítica abstraído o α - carbono do substrato como um próton. Elétrons dessa reação são passados a flavoproteína transferidora de elétrons e diretamente para a cadeia transportadora de elétrons via flavoproteína ubiquinona oxidoreductase.

A deficiência na atividade dessa enzima leva ao acúmulo de butiril-CoA, o qual é convertido em etilmalonil-CoA pela enzima propionil-CoA carboxilase, sendo o etilmalonil-CoA hidrolizado a ácido etilmalônico (EMA) livre, pela ação da acil-CoA hidrolase, e/ou em butiril-carnitina (Fig. 1) (Roe and Ding, 2001). Apesar da SCADD se diferenciar de outros defeitos de oxidação de ácidos graxos, como as deficiências das desidrogenases de cadeia média e longa, pela frequência de anormalidades no SNC e a aparente ausência de episódios de encefalopatia hipocetótica hipoglicêmica (Bhala et al, 1995; Tein et al,1999), a acidemia láctica intermitente e alterações mitocondriais na microscopia são achados dessa doença, sugerindo um comprometimento do metabolismo energético mitocondrial (Dawson et al, 1995., Bennet et al, 1996; Roe and Ding, 2001).

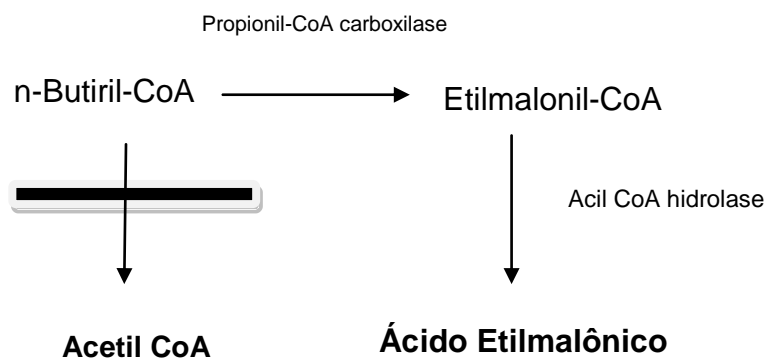


Figura 1: Formação de metabólitos na deficiência de SCAD a partir do metabolismo alternativo do n-butiril-CoA (adaptado de Sewell, 1993)

I.1.5. Encefalopatia Etimalônica (EE)

A encefalopatia etimalônica (EE) é uma desordem monogênica causada exclusivamente por mutações no gene ETHE1. É caracterizada clinicamente por deterioração neurológica precoce, diarreia crônica, petéquia recorrente e acrocianose ortostática levando a morte nos primeiros anos de vida (Giordano et al, 2011). Além disso, durante crises encefalopáticas agudas, pacientes com EE acumulam e excretam grandes quantidades de ácido láctico, sugerindo disfunção mitocondrial (Zafeiriou et al., 2007; Tiranti et al., 2004; Tiranti et al., 2006; Drousiotou et al., 2011). Lesões necróticas simétricas nas estruturas da substância cinzenta profunda são o principal achado neuropatológico da doença (Tiranti et al, 2004). A consequência principal da perda de ETHE1 é o acúmulo de sulfeto de hidrogênio (H₂S), o qual, além de outros efeitos, bloqueia a degradação de ácidos graxos de cadeia curta levando ao acúmulo de EMA, bem como apresenta efeitos vasoativos e vasotóxicos que explicam as lesões vasculares na pele e, possivelmente em outros órgãos, apresentados

pelos pacientes (Dweikat et al, 2012., Giordano et al, 2011). Bioquimicamente, a EE é caracterizada por acidemia láctica, concentrações elevadas de acilcarnitinas C4 e C5 no plasma, excreção urinária aumentada de EMA na urina, bem como elevação de ácido metilsuccínico e acilglicinas, notadamente isobutirilglicina e 2-metilbutirilglicina.

I.1.6. Metabolismo Energético Cerebral

O cérebro é um dos órgãos mais ativos metabolicamente, no entanto, possui reservas energéticas extremamente pequenas em relação a sua alta taxa metabólica (Dickinson et al, 1996). A glicose é o principal substrato energético utilizado pelo sistema nervoso central (SNC), e a fosforilação oxidativa também é particularmente importante para o cérebro pois é responsável por fornecer mais de 95% do ATP sintetizado. No entanto, no jejum os corpos cetônicos podem substituir as necessidades energéticas do cérebro em mais de 50% (Dickinson et al, 1996).

A oxidação da glicose através da via glicolítica forma piruvato, que é convertido a CO_2 e H_2O no ciclo de Krebs e na cadeia transportadora de elétrons. O acoplamento entre a cadeia transportadora e a fosforilação oxidativa gera grande parte do ATP necessário ao cérebro. Uma vez que, a fosforilação oxidativa é responsável por quase a totalidade do ATP produzido no SNC, a regulação de respiração mitocondrial se torna essencial para o correto metabolismo energético cerebral (Erecinska e Silver, 1994).

Em condições normais, onde não existe falta de oxigênio a fosforilação oxidativa é dependente de dois parâmetros: a concentração de ATP, ADP e fosfato (Pi) e da razão mitocondrial NADH/NAD⁺, a qual é determinada pela atividade da cadeia transportadora de elétrons e pelo fornecimento de equivalentes reduzidos (elétrons) por enzimas mitocondriais. A cadeia transportadora de elétrons oxida o NADH e bombeia prótons para o espaço intermembrana da mitocôndria formando assim, um gradiente de prótons que ativa a ATP sintase e produz ATP na fosforilação oxidativa (Erecinska e Silver, 1994).

A respiração celular começa com a oxidação de substratos em várias vias metabólicas com a transferência de elétrons para o NAD⁺ e o FAD, convertendo-os em NADH e FAD(2H), respectivamente (Marks et al,1996). Em uma segunda fase, os elétrons do NADH e do FAD(2H) são transferidos através da cadeia respiratória por uma sequência de pares redox, fornecendo energia para a síntese de ATP, na fosforilação oxidativa. Segundo a teoria quimiosmótica, tal energia origina-se do gradiente de prótons gerado pelo bombeamento de prótons pelos complexos I, III e IV da cadeia respiratória para o espaço intermembranas (entre as membranas mitocondrial interna e externa) (Marks et al, 1996).

A cadeia respiratória possui vários complexos proteicos: NADH desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), complexo citocromo b-c1(complexo III) e citocromo oxidase (complexo IV), além de elementos móveis que se localizam entre os complexos. Entre esses elementos móveis estão a coenzima Q (CoQ), que é um componente não

proteico, lipossolúvel, que carrega elétrons entre os complexos I e III ou II e III, e o citocromo c, uma pequena proteína localizada na face externa da membrana que transfere elétrons do complexo III para o complexo IV (Marks et al, 1996).

A enzima NaK é uma enzima transmembrana que cataliza o transporte ativo de sódio e potássio através da membrana celular. Esse transporte é de grande importância já que mais de um terço do ATP consumido é utilizado para bombear tais íons (Aperia et al, 2007). A NaK está presente em quase todas as células incluindo as do cérebro, músculo esquelético e cardíaco (Aperia et al, 2007). No cérebro, desempenha um papel fundamental sendo responsável pela manutenção dos gradientes iônicos e pela propagação do impulso nervoso. A inibição dessa enzima tem sido associada a fisiopatologia de diversas doenças como as desordens neurodegenerativas (Yu et al, 2003), epilepsia (Grisar et al, 1984) e isquemia cerebral (Wyse et al, 2000).

I.1.7. Metabolismo cerebral em doenças neurodegenerativas

Historicamente, maior atenção tem sido dada ao estudo da expressão ou funcionamento dos componentes da cadeia respiratória em doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington e Parkinson. De fato, numerosas evidências relacionam essas doenças neurodegenerativas a uma diminuição no metabolismo energético. Uma das hipóteses é de que alterações na cadeia transportadora de elétrons seriam o evento etiológico primário (Parker et al 1990, Swerdlow et al 1998).

Luft e colaboradores (Luft et al, 1962) descreveram, pela primeira vez, um caso clínico com disfunção mitocondrial, onde o efeito estava representado por um desacoplamento da respiração mitocondrial, ou seja, a transferência de elétrons através da cadeia respiratória não estava em sincronia com a síntese de ATP. Estudos demonstraram uma diminuição na atividade do complexo I da CTE em cérebros postmortem de pacientes portadores de doença de Parkinson (Janetzky et al, 1994; Schapira et al. 1990), relato de defeitos nos complexos II e III da CTE e na enzima alfa cetoglutarato desidrogenase, importante enzima do ciclo do ácido cítrico, nessa doença (Mizuno et al., 1990).

Na doença de Alzheimer, a mais comum dentre as doenças neurodegenerativas, é encontrada principalmente uma redução na atividade do complexo IV da CTE (Maurer et al. 2000). Estudos em cérebros postmortem demonstraram uma diminuição na atividade do complexo enzimático da piruvato desidrogenase e na atividade da enzima alfa cetoglutarato desidrogenase na doença de Alzheimer (Gibson et al, 1988; Mastrogiacomo et al, 1993; Perry et al, 1980).

As principais consequências da disfunção mitocondrial parecem envolver indução de estresse oxidativo, alteração na homeostase do cálcio, apoptose e disfunção metabólica.

I.1.8. Mecanismos fisiopatogênicos das doenças onde o ácido etilmalônico está acumulado

Os mecanismos da disfunção neurológica nessas doenças não estão bem esclarecidos, podendo ser, no entanto, atribuídos ao acúmulo de EMA. Neste sentido, estudos *in vitro* mostram que o EMA inibe a atividade da creatina quinase em córtex cerebral de ratos (Schuck et al., 2002; Leipnitz et al., 2003) e as atividades enzimáticas da creatina quinase e de complexos da cadeia transportadora de elétrons em músculo esquelético de humanos (Barschak et al., 2006), assim como induz dano oxidativo lipídico e proteico em córtex cerebral de ratos (Schuck et al., 2010) e em fibroblastos de pacientes com SCADD (Pedersen et al., 2010; Zolkipli et al., 2011). Além disso, foi observado um déficit na memória espacial na tarefa do labirinto aquático de Morris em ratos injetados cronicamente com EMA (Schuck et al., 2009).

Finalmente, num estudo recente, nosso grupo demonstrou que o EMA diminui o consumo de oxigênio e o potencial de membrana em preparações mitocondriais de cérebro de ratos a partir de succinato e malato provavelmente por competir com o transporte desses substratos pelo translocador mitocondrial de dicarboxilatos (Amaral et al., 2012).

I.2 OBJETIVOS:

I.2.1. Objetivo Geral:

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da administração intraestriatal de EMA sobre importantes parâmetros da bioenergética em cérebro de ratos jovens, visando uma melhor compreensão da fisiopatologia das doenças em que o EMA se acumula.

I.2.2. Objetivos Específicos

- Estudar se a administração intraestriatal de EMA provoca alterações no metabolismo energético, através da determinação dos seguintes parâmetros: produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glicose (oxidação aeróbica, ciclo de Krebs), atividades das enzimas citrato sintase, α -cetoglutarato desidrogenase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase, dos complexos II, II-III, IV da cadeia respiratória, bem como da creatina quinase e da NaK.

- Avaliar se a administração intraestriatal de EMA modifica os níveis de glutathiona (GSH), um importante antioxidante não-enzimático intracelular.

- Estudar o possível papel protetor da N-acetilcisteína sobre os efeitos causados pelo EMA.

PARTE II

Artigo científico

**Intrastriatal injection of ethylmalonic acid compromises energy
homeostasis in striatum of young rats**

Luciana Ritter, Daniele Kleemann, Fernanda Hermes Hickmann, Alexandre
Umpierrez Amaral, Moacir Wajner, César Augusto João Ribeiro.

Artigo científico a ser submetido à revista

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

Intrastriatal injection of ethylmalonic acid compromises energy homeostasis in striatum of young rats

Luciana Ritter^a, Daniele Kleemann^a, Fernanda Hermes Hickmann^a, Alexandre Umpierrez Amaral^a, Moacir Wajner^{a,b}, César Augusto João Ribeiro^{a,*}.

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil.

^b Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-RS, Brazil.

* Corresponding Author: César A.J. Ribeiro

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo. Phone: +55 51 33085572. E-mail address:

cesar.ribeiro@ufrgs.br

Abstract

High concentrations of ethylmalonic acid (EMA) have been observed in various metabolic disorders with neurological disease manifestation, as short acyl-CoA dehydrogenase deficiency activity (SCAD) and ethylmalonic encephalopathy (EE). In the present study we evaluate the *ex vivo* effects of intraestriatal administration of EMA, on striatal energy metabolism in order to better understand the pathophysiology of diseases in which EMA accumulates. We also tested the effect of EMA on reduced glutathione (GSH) levels (non-enzymatic antioxidant defenses). Our results show that EMA significantly reduced CO₂ production from glucose 2 and 24 hours after its injection, implying that this compound compromises the glycolytic pathway and/or citric acid cycle activity. Furthermore, EMA diminished the activities of complex II and II-III of the respiratory chain, as well as the activity of citrate synthase, only 24 hours after administration and synaptic membrane NaK activity in both times. EMA also decreased the levels of reduced glutathione (GSH). Pre-treatment of rats with N-acetylcysteine for 3 days prevented the reduction of GSH levels caused by EMA, without modifying the inhibition of NaK activity. Considering the importance of the citric acid cycle and the glycolytic pathway, the electron flow through the respiratory chain for brain energy production and the NaK for the maintenance of the cell membrane potential, the present data indicate that EMA compromises mitochondrial energy homeostasis and neurotransmission in striatum. We presumed that these pathomechanisms are involved in the neurological damage found in patients affected by SCAD and EE.

Keywords: Ethylmalonic acid, energy metabolism, striatum.

Introduction

Increased levels of ethylmalonic acid (EMA) has been observed tissue and body fluids of patients with various metabolic disorders with neurological disease manifestation, e.g, ethylmalonic encephalopathy (OMIM 602473) and short-chain acyl-CoA dehydrogenation deficiency (MADD; OMIM 231680) (Pedersen et al, 2010). Short acil-CoA dehydrogenase (SCAD) is a nuclear-encoded enzyme involved in degradation of short-chain fatty acids in the mitochondrial β -oxidation pathway (Pedersen et al, 2010). Deficiency of SCAD activity leads to the accumulation of butyryl-CoA, which is converted to EMA that is responsible for a toxic effect on neuronal and muscular tissue (Jiang et al, 2012). Clinically, these patients present developmental delay, ketotic hypoglycemia, epilepsy, behavioral disorders (Gallant et al, 2012), hypotonia and seizures (Pedersen et al, 2010). Ethylmalonic encephalopathy (EE) is a monogenic disorder caused by mutation in the *ETHE1* gene and characterized by the early onset of neurological deterioration, chronic diarrhea, recurrent petechiae and orthostatic acrocyanosis leading to the death in the first years of life (Dweikat et al, 2012). During acute encephalopathic crises, patients acumulate and excrete large amounts of lactic acid suggesting mitochondrial dysfunction. The main consequence of *ETHE1* loss is the accumulation of hydrogen sulfide (H_2S), which blocks short chain fatty acids causing accumulation of EMA.

In *vitro* studies demonstrated that EMA inhibits creative kinase activity in cerebral cortex of rats (Schuck et al, 2002; Leipnitz et al 2003), and activities of

creatine kinase and complexes of the respiratory chain in human skeletal muscle (Barchak et al, 2006), as well as induces lipid and protein oxidative damage in cerebral cortex of rats (Schuck et al, 2010) and fibroblasts of patients with SCAD (Pedersen et al., 2010; Zolkipli et al., 2011). Despite these *in vitro* observations regarding EMA toxicity, to our knowledge, the *in vivo* effects of increased concentrations of EMA remains unknown.

Thus, in the present study we evaluate the *ex vivo* effects of EMA on striatal energy metabolism in order to better understand the pathophysiology of diseases in which EMA accumulates. We tested the influence of *in vivo* intraestriatal administration of EMA on parameters of aerobic glycolysis (CO₂ production from [U-14C] glucose), the enzyme activities of the citric acid cycle, electron transfer flow through the respiratory chain (complex II–IV activities), as well as on intracellular ATP transfer (creatine kinase activity) and the activity of NaK, an important enzyme necessary for normal neurotransmission, in striatum from young rats. We also tested the effect of EMA administration on levels of reduced glutathione (GSH), an important intracellular non-enzymatic antioxidant defense.

Experimental Procedures

Animals

We used 30-day-old Wistar rats obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, in the assays. The animals had free access to water and to a standard commercial chow and were maintained on a 12:12 h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature (22±1°C) colony room. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication no.80-23, revised 1996) were followed in all experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Intrastriatal Administration of Ethylmalonic Acid (EMA)

The rats were deeply anesthetized with ketamine plus xylazine and placed on stereotaxic apparatus. Two small holes were drilled in the skull for microinjection, and a dose of 1.5 µmol of EMA (pH adjusted with NaOH) or NaCl (controls) at the same volume and concentration, was slowly injected bilaterally over 3 min via needles connected by a polyethylene tube to a 25 µl Hamilton syringe. The needles (one in each striatum) were left in place for another 1 min before softly removed. The coordinates for injections were as follows: 0.6 mm posterior to bregma, ± 2.6 mm lateral to midline and 4.5 mm ventral from dura (Paxinos e Watson, 1986), and were confirmed by injection of methylene blue and histological analysis.

In some experiments, animals were pre-treated i.p. with N-acetylcysteine (NAC; 150 mg kg⁻¹) for 3 days, one injection per day (Farbiszewski et al. 2000). Control animals received the same volumes of saline solution (0.9 %). After pre-treatment, animals received intrastriatal injection of EMA or NaCl.

Striatal preparation

Animals (male rats) were killed by decapitation 2 or 24 hours after intrastriatal injection of EMA or NaCl, and the brain was immediately removed, the vessels and blood removed and kept on ice plate. The striatum was dissected, weighed and kept chilled until homogenization. For the CO₂ production, the striatum was cut in 400 µm slices and incubated in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4. For the determination of the activities of the respiratory chain complexes II, II-III and IV, striatum was homogenized (1:20, w/v) in SETH buffer, pH 7.4 (250mM sucrose, 2.0mM EDTA, 10mM Trizma base and 50UI ml⁻¹ heparin). The homogenate was centrifuged at 800xg for 10 min and the supernatant was kept at -70 °C until being used for enzymatic activity determination. For the determination of citric acid cycle enzyme activities, mitochondria were isolated from striatum of 30-day-old rats as described by Rosenthal and coworkers [18], with slight modifications. Animals were killed by decapitation, had their brains rapidly removed, the striatum dissected, and placed in ice-cold isolation buffer containing 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 1 mM EGTA, 0.1 % bovine serum albumin (BSA; fatty acid free), and 10 mM HEPES, pH 7.2. The striatum was cut into small pieces using surgical scissors, extensively washed to remove blood and homogenized 1:10 in a glass homogenizer using both a loose-fitting and a tight-fitting pestle. The

homogenate was centrifuged for 3 min at 2,000×g. After centrifugation, the supernatant was centrifuged for 8 min at 12,000×g. The pellet-containing mitochondria was suspended in 20 mL of isolation buffer containing 20 µL of 10 % digitonin and centrifuged for 8 min at 12,000×g. The supernatant was discarded and the final pellet gently washed and suspended in isolation buffer devoid of EGTA, at an approximate protein concentration of 4 mg/mL. For creatine kinase activity determination, the striatum was homogenized (1:10 w/v) in isosmotic saline solution. The period between tissue preparation and measurement of the various parameters was always less than 5 days, except CO₂ production assays, whose experiments were performed on the same day of the preparations.

Preparation of Synaptic Membrane from Rat Striatum

Striatum was homogenized in 10 vol of 0.32 mM sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 1.0 mM EDTA. Synaptical plasma membranes were prepared afterward according to the method of Jones and Matus (1974) modified by Wyse et al (2001) using a discontinuous sucrose density gradient consisting of successive layers of 0.3, 0.8 and 1.0 mM. After centrifugation at 69,000 Xg for 2 h, the fraction at the 0.8-1.0 mM sucrose interface was taken as the membrane enzyme preparation.

CO₂ production

For CO₂ production, 50 mg of striatal slices were added to small flasks (11 cm³), which were pre-warmed in a metabolic shaker at 37 °C for 10 min. After pre-warming, [U-¹⁴C] glucose (0.055 µCi) plus 5.0 mM of unlabeled glucose were added to the incubation medium in a final incubation volume of 500 µL. The flasks were gassed with O₂:CO₂ (95:5) mixture and sealed with rubber stoppers and parafilm. Glass center wells containing a folded 65 mm/5 mm piece of filter paper were hung from the stoppers. After 60 min of incubation at 37 °C, 200µL of 50% trichloroacetic acid were added to the medium and 100 µL of benzethonium hydroxide were added to the center wells with needles introduced introduced through the rubber stopper. The flasks were left to stand for 30 min to complete ¹⁴CO₂ trapping and then opened. The filter papers were removed and added to vials containing scintillation fluid, and radioactivity was measured (Dutra-Filho et al, 1995). Results correspond to pmol glucose oxidized h⁻¹ mg protein⁻¹.

Citric Acid Cycle (CAC) Enzyme Activities

Citrate synthase activity was measured according to Srere (1969), by determining DTNB reduction at $\lambda = 412$ nm. The activity of α -ketoglutarate dehydrogenase complex was evaluated according to Viegas et al. (2009), at wavelengths of excitation and emission of 340 and 466 nm, respectively. The activity of succinate dehydrogenase was determined as described by Fischer et al. (1985). Malate dehydrogenase activity was measured according to Kitto (1969) by following the reduction of NADH at wavelengths of excitation and emission of 340 and 466 nm, respectively. The activities of the CAC enzymes

were calculated as nmol/min/mg protein, mmol/min/mg protein or $\mu\text{mol/min/mg}$ protein.

Electron Transfer Chain Complexes II-IV Activities

The activities of succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP)-oxidoreductase (complex II) and succinate:cytochrome *c* oxidoreductase (complex II-III) were determined in homogenates from striatum according to Fischer et al. (1985) and that of cytochrome *c* oxidase (complex IV) according to Rustin et al. (1994).

The activity of the respiratory chain enzyme complex succinate:DCIP oxidoreductase (complex II) was determined by following the decrease in absorbance because of the reduction of 2,6-DCIP at 600 nm with 700 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}$). The reaction medium consisting of 40 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, 16.0 mM sodium succinate and 8 μM DCIP was preincubated with 40-80 μg homogenate protein at 30 °C for 30 min. Subsequently, 4 mM sodium azide and 7 μM rotenone were added, and the reaction was initiated by addition of 40 μM DCIP and was monitored for 5 min. Results were expressed as nmol of reduced DCIP per min per mg protein.

Complex II-III (succinate: cytochrome *c* oxidoreductase) activity was measured by following the increase in absorbance because of the reduction of cytochrome *c* at 550 nm as the reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}$). The reaction medium consisting of 40mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, and 16 mM sodium succinate was preincubated with 40-80 μg homogenate protein at 30 °C for 30min. Subsequently, 4 mM sodium azide and 7 μM rotenone were added and reaction was initiated by addition of 0.6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cytochrome *c* and monitored for 5 min.

The activity of cytochrome c oxidase (complex IV, COX) was measured by following the decrease in absorbance because of the oxidation of previously reduced cytochrome c at 550 nm with 580 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}$). The reaction mixture contained 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 0.6 mM *n*-dodecil- β -D-maltoside, 2-4 μg homogenate protein and the reaction was initiated with addition of 0.7 μg reduced cytochrome c. The activity of complex IV was measured at 25 °C for 10 min.

Creatine Kinase Activity

Creatine kinase (CK) activity was measured in total homogenates according to Hughes (1962) with slight modifications (da Silva et al, 2004). In brief, the reaction mixture consisted of 50mM Tris buffer, pH 7.5, containing 7.0 mM phosphocreatine, 7.5 mM MgSO_4 , and striatal homogenates in a final volume of 0.1 ml. The reaction was then started by addition of 4.0 mM ADP and stopped after 10 min by addition of 0.02 ml of 50 mM *p*-hydroxy-mercuribenzoic acid. The creatine formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes (1962). The color was developed by the addition of 0.1 ml 20% diacetyl in a final volume of 1.0 ml and read after 20 min at $\lambda = 540 \text{ nm}$. Results were calculated as $\mu\text{mol of creatine min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$.

Na^+K^+ -ATPase Activity (NaK)

The NaK activity was determined according to Wyse et al (2001), in a medium containing 5 mM MgCl_2 , 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 40 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, and purified striatal synaptic membranes (approximately 20 μg protein) in a final volume of 200 μl . The enzymatic assay occurred at 37 °C

during 5 min and started by the addition of ATP (disodium salt, vanadium free) to a final concentration of 3 mM. The reaction was stopped by the addition of 200 μ l of 10% trichloroacetic acid. Mg^{+2} -ATPase ouabain-insensitive was assayed under the same conditions with the addition of 1 mM ouabain. NaK activity was calculated by the difference between the two assays (Tsakiris and Deliconstantinos, 1984). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan et al. (1986). Enzyme-specific activities were calculated as nmol Pi released $^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$.

Determination of reduced glutathione (GSH) levels

GSH levels were evaluated according to Browne and Armstrong (1998). Striatal supernatants were diluted in 20 volumes (1:20, v/v) of 100 mM sodium phosphate buffer pH 8.0, containing 5 mM EDTA. One hundred microlitres of this preparation was incubated with an equal volume of o-phthaldialdehyde (1 mg/mL methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 nm and 420 nm, respectively. Calibration curve was performed with standard GSH (0.001-0.1 mM), and GSH concentrations were calculated as nmol/mg protein.

Protein Determination

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

Statistical Analysis

Unless otherwise stated, results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Assays were performed in duplicated or triplicate and the mean or median was used for statistical analysis. Data was analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post-hoc Duncan multiple range test when F was significant. Differences between groups were rated significant at $P < 0.05$. All analyses were carried out in IBM-compatible PC computer using the Statistical for the Social Sciences (SPSS) software.

Results

We first investigated the *ex vivo* effects of EMA on CO₂ production from glucose in striatum of young rats to evaluate whether this compound could affect the citric acid cycle (CAC) function. We verified that glucose oxidation was significantly decreased by EMA, in both 2 and 24 hours after injection [up to 30% respectively, $F = 8.66$, $p < 0.05$] (Fig.1), suggesting a blockage of the CAC that may occur caused by a blockage of the electron transfer flow through the respiratory chain.

We also evaluated the effect of EMA administration on the activities of some CAC enzymes in mitochondrial preparations. We found a significant reduction (22%, $p < 0.05$, Figure 3A) in citrate synthase activity only 24 hours after EMA injection. The activity of α -ketoglutarate dehydrogenase was increased (40%, $p < 0.01$, Figure 3B) at short period after EMA injection (2 hours), and 24 hours after EMA injection this enzymatic activity returned to

control levels. The activity of succinate dehydrogenase and malate dehydrogenase were not changed by EMA injection (Figure 3C and 3D).

The next experiments were performed to evaluate the effect of EMA on various respiratory chain complex activities in an attempt to elucidate whether EMA could reduce the activity of the electron transfer chain. Figure 2A shows that EMA significantly inhibited the activity of complex II [up to 30% $F= 3.98$ $p<0.05$] 24 hours after injection and the activity of complex II-III of the respiratory chain [up to 20%, $F= 3.54$, $p<0.05$, respectively] (Fig. 2B) 2 and 24 hours after injection without affecting complex IV activity (Fig. 2C).

Next, we evaluated the effects of EMA on creatine kinase (CK) activity in homogenates from rat striatum. This enzyme activity was not modified by EMA injection. Since CK plays a role in intracellular ATP transfer and buffering, it is possible that intracellular energy transfer is not mainly altered by EMA (data not shown).

We also evaluated the effects of EMA on synaptic NaK activity, a critical enzyme for maintenance of the membrane potential necessary for neurotransmission. Figure 4 shows that intrastriatal injection of EMA significantly inhibited NaK activity measured in purified synaptic membranes [Fig 4, up to 30%, $F= 5.48$, $p<0.05$].

Striatal GSH levels measured 2 or 24 hours after EMA administration revealed that EMA significantly decreased GSH levels in 24 hours [up to 20%, $F= 4.26$, $p< 0.05$] (Fig 5).

We then investigated the effects of N-acetylcysteine (NAC) on EMA-induced decrease of the activity of NaK and GSH levels in striatum 24 hours after EMA injection. NAC totally prevented the reduction of GSH levels (Fig. 6A) and NaK activity (Fig 6B).

Discussion

The pathogenesis of the neurological dysfunction observed in patients affected by ethylmalonic encephalopathy and short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in which EMA accumulates and is excreted in high amounts remains unknown. High amounts of butyryl-CoA and its derivative EMA produced in the liver of SCAD-deficient patients and launched in the circulation could reach the brain because short-chain fatty acids easily cross the blood-brain barrier (Oldendorf, 1973). In this context, some evidences indicate that EMA provokes *in vitro* alterations of bioenergetics and induces oxidative damage in cerebral cortex and hippocampus of young rats (Schuck et al, 2002; Leipnitz et al, 2003; Schuck et al, 2010, Schuck et al, 2009).

Most patients diagnosed at the neonatal period with this condition are asymptomatic. We believe that EMA accumulation, especially during episodes of metabolic decompensation characterized by intense fatty acid catabolism, may act synergistically with other environmental factors provoking neurological damage. The clinical variability is normal in metabolic disorders such EE and SCADD and the neuroradiological investigations (Grosso et al, 2002) in patients with EE showed increasing hyperintensities of the basal ganglia on T2-weighted

images suggesting an impairment of the striatum. The hyperintensities have been considered result of infarcts, possibly related to the toxicity of accumulating organic acids such as EMA, or secondary to the vascular changes commonly observed in this disorder (Grosso et al, 2002). In this context, we showed for the first time that *ex vivo* intrastriatal administration of EMA compromises energy metabolism in striatum of rats.

EMA intraestriatal administration decreased CO₂ production from glucose in striatum, suggesting a disruption in the aerobic glycolytic pathway and/or the CAC. Although we did not measure the activities of the enzymes of the glycolytic pathway, we demonstrated that the activities of citrate synthase and complex II and II-III of electron transfer chain were significantly inhibited by EMA in striatum that may possibly explain the reduction of CO₂ generation caused by this organic acid. We observed an increase in α -KGDH activity (up to 40%) in mitochondrial preparations from striatum of rats 2 hours after EMA injection. This could be explained as a mechanism to compensate the reduction in CAC flux. In this context, Graf et al (2013) recently demonstrated an up-regulation in α -KGDH activity as a stress response, suggesting that post-translational modifications in this enzyme would be the primary and immediate measure to alleviate the metabolic stress.

We also tested the influence of EMA intraestriatal injection on electron transfer chain function by measuring the activities of complexes I–IV. EMA inhibited the activity of complex II and complex II-III of the electron transfer chain (Fig. 2A and 2B) only 24 hours after EMA injection. In this context, it was also observed that chronic subcutaneous administration of EMA to young rats

does not modify the activities of critical enzymes of energy metabolism (Ferreira et al, 2006). Furthermore, it has been suggested an inhibitory effect of EMA on mitochondrial succinate oxidation probably due to a competition between succinate and EMA for the same mitochondrial membrane carrier (Amaral et al, 2012). Considering that reduction of the electron transport chain flow (impaired oxidative phosphorylation) results in lower ATP synthesis, our present data suggest that energy production is compromised *in vivo* by EMA in striatum of young rats.

We also found that the activity of creatine kinase, a crucial enzyme for intracellular ATP transfer and buffering, was not affected 2 or 24 hours after intrastriatal administration of EMA. Previous *in vitro* studies demonstrated alterations in this activity in different cerebral structures (Schuck et al, 2002., Schuck et al, 2009., Leipnitz et al, 2009). Our data suggest that the energy transfer is not mainly altered in striatum by EMA *in vivo* administration. However, other factors are involved in this system and should be further investigated to clarify this matter.

Intrastriatal injection of EMA reduced NaK activity, which is necessary for neuronal excitability and cellular volume control. This enzyme is present in high concentration in the brain, consuming about 40-50% of the ATP generated in this tissue, highlighting its importance for normal brain functioning. It was recently reported that acute EMA administration (three subcutaneous injections) increased brain NaK activity in cerebral cortex (Schuck et al, 2013). Another study intrastriatal administration of methylmalonic acid (MMA), structurally similar to EMA, induced a local persistent decrease in NaK activity in striatum

and an increase in cerebral cortex (Malfatti et al, 2003). One interesting possibility that explain these data is the differential expression of NaK isoenzymes, which have different sensitivity to the reactive oxygen species between cerebral structures. In this context, Schuck et al demonstrated a decrease in mRNA expression of cerebral cortex NaK subunits ($\alpha 1$ and $\alpha 3$) in EMA-treated animals (Schuck et al, 2013).

We also found that EMA reduced the total content of GSH in rat striatum 24 h after intraestriatal injection, implying a decrease of non-enzymatic antioxidant defenses in the striatum. Endogenous GSH is the main naturally-occurring antioxidant in the brain and is used to evaluate the non-enzymatic antioxidant capacity of a tissue to prevent the damage associated to free radical processes (Halliwell and Gutteridge, 2007). Considering that, it can be presumed that the rat striatum non-enzymatic antioxidant defenses were compromised by EMA administration. It is conceivable that the reduction of GSH levels may reflect increased reactive species generation elicited by EMA. This is in accordance with previous studies demonstrating that EMA increases lipid and protein damages in vitro in cerebral cortex of rats (Schuck et al, 2010). On the other hand, the mitochondrial dicarboxylate carrier inhibition caused by EMA, proposed by Amaral et al, (Amaral et al, 2012) may also inhibit GSH transport into the brain mitochondria, promoting redox imbalance.

Regarding to the decrease of NaK activity caused by EMA intraestriatal administration, we verified that pre-treatment with the antioxidant NAC, besides restoring GSH striatal levels (Figure 6A), was not able to prevent EMA-elicited reduction of this important enzyme activity (Figure 6B). Although NaK is

vulnerable to oxidative damage, particularly through oxidation of essential sulfhydryl groups of the enzyme (Abeywardena et al, 1983; Carfagna and Muhoberac, 1993), the present data suggest that this inhibition is not caused by oxidation of these essential sulfhydryl groups. Our findings suggest that the reduced activity may be possibly be caused by oxidation of membrane lipids leading indirectly to inhibition of NaK activity.

In conclusion, we reported for the first time that *in vivo* intrastriatal administration of EMA causes disturbance in brain energy homeostasis in the striatum suggesting that this pathomecanism may be involved in the neurological dysfunction presented by the disorders in which this organic acid accumulates.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq, PRONEX II, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS and FINEP research grant REDE Instituto Brasileiro de Neurociências (IBN-Net) #01.06.0842-00 and INT-EN

References

Abeywardena MY, Allen TM, Charnock JS (1983) Lipid-protein interactions of reconstituted membrane-associated adenosine triphosphatases. *Biochim Biophys Acta* 729:62–74

Amaral, A.U., Cecatto, C., Busanello, E.N.B., Ribeiro, C.A.J., Melo, D.R., Leipnitz, G., Castilho, R.F., Wajner, M. (2012): Ethylmalonic acid impairs brain mitochondrial succinate and malate transport. *Mol Gen and Metab* 105: 84-90.

Barschak, A.G., Ferreira, G.C., André, K.R et al (2006): Inhibition of the electron transport chain and creatine kinase activity by ethylmalonic acid in human skeletal muscle. *Metab Brain Dis* 21: 11-19.

Browne, R.W., Armstrong, D. (1998): Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol*, 108, 347-352.

Carfagna MA, Muhoberac BB (1993) Interactions of tricyclic drug analogs with synaptic plasma membranes: structure mechanism relationships in inhibition of neuronal Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Mol Pharmacol* 44:129–141

Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K.D.(1986): A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem*, 157, 2, 375-380.

Da Silva, C.G., Bueno A.R., Schuck, P.F., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A., Rosa, R.B., Dutra Filho, C.S., Wyse, A.T., Wannamacher, C.M, Wajner, M.

Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Wannamacher, C.M., Gassen, E., Candiago, R.H., Wilhems, A.M., de Malfussi, H.F.(1995): 2-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate inhibit CO₂ formation from labeled substrates by rat cerebral cortex. *Biochem Soc Trans*, 23, 2, 228S.

Dweikat, I., Naser, E., Damsah, N., Libdeh, B.A., Bakri I. (2012): Ethylmalonic encephalopathy associated with crescentic glomerulonephritis 27:613-616.

Jiang, M., Liu, L., Peng, M., Liang, C., Sheng, H., Cai, Y. (2012): First case report of short acyl-CoA dehydrogenase deficiency in China. *J Pediatr Endocr Met* 25(7-8): 795-797.

Ferreira, G.C., Andre, K.R., Schuck, P.F., Viegas, C.M., Tonin, A.M., Coelho, D.M., Wyse, A.T.S., Wannamacher, C.D., Vargas, C.R., Wajner, M.(2006): Effect of in vivo administration of ethylmalonic acid on energy metabolism in rat tissues. *Metab Brain Dis*, 21, 29-39.

Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M., Veerkamp, J.H, Stadhouders, A.M., Sengers, R.C., Janseen, A.j. (1985): Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*, 153, 1, 23-36.

Gallant, N.M., Leydiker, K., Tang, H., Feuchtbaum, L., Lorey, F., Puckett, R., Deignan, J.L., Neidich, J., Dorrani, N., Chang, E., Barshop, B.A., Cederbaum, S.D., Abdenur, J.E., Wang, R.Y. (2012): Biochemical, molecular, and clinical characteristics of children with short chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency detected by newborn screening in California. *106*, 55-61.

Grosso, S., Mostardini, R., Farnetani, M.A., Molinelli, M., Berardi, R., Dionisi-Vici, C., Rizzo, C., Morgese, G., Balestri, P. (2002): Ethylmalonic encephalopathy- Further clinical and neuroradiological characterization. *J Neurol*, *249*, 1446-1450.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007), Measurement of reactive species. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth edition (Halliwell B, Gutteridge JMC, eds), pp. 268-340. Oxford University Press, Oxford.

Hughes, B.P.(1962): A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Chin Chim Acta*, *7*, 597-603.

Jones, D.H., Matus, A.I., (1974): Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta*, *356*, 3, 276-287.

Leipnitz, G., Schuck, P.F., Ribeiro, C.A., Dalcin, K.B., Assis, D.R., Barschak, A.G., Pulrolnik, V., Wannamacher, C.M., Wyse, A.T., Wajner, M. (2003): Ethylmalonic acid inhibits mitochondrial creatine kinase activity from cerebral cortex of young rats in vitro. *Neurochem Res* *28*:771-777.

Leipnitz, G., Seminotti, B., Fernandes, G.C., Amaral, A.U., Beskow, A.P. da Silva, L de B., Zanatta, A., Ribeiro, C.A., Vargas, C.R., Wajner, M. (2009): Striatum is more vulnerable to oxidative damage induced by the metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency as compared to liver. *Int J Dev Neurosci*, *27*, 4, 351-356.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, *193*, 1, 265-275.

Malfatti, C.R.M., Royes, L.F.F., Francescato, L., Sanabria, E.R.G., Rubin, M.A., Cavalheiro, E.A., Mello, C.F. (2003): Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na⁺, K⁺-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. *Epilepsia*, *44*, 6, 761-767.

Oldendorf, W.H. (1973): Carrier mediated blood-brain transport of short-chain monocarboxylic organic acids. *Am J Physiol*, *224*(6), 1450-1453.

Pedersen, C.B., Zolkipli, Z., Vang, S., Palmfeldt, M., Kjeldsen, J., Stenbroen, V., Schmidt, S.P., Wanders, J.P., Ruiter, F., Wibrand, I., Tein, I., Gregersen,

N.(2010): Antioxidant dysfunction: potential risk for neurotoxicity in ethylmalonic aciduria. *J.Inherit. Metab.Dis*, 33:211-222.

Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J.m., Munnich, A.(1994): Biochemical and molecular investigation in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*, 228, 1, 35-51.

Shapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D. et al. (1990): Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 54:823-827.

Schuck, P.F., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A., Dalcin, K.B., Assis, D.R., Barschak, A.G., Pulrolnik, V., Wannamacher, C.M., Wyse, A.T., Wajner, M. (2002): Inhibition of creatine kinase activity in vitro by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. *Neurochem Res* 27: 1633-1639.

Schuck, P.F., Ferreira, G.C., Moura, A.P, et al. (2009): Medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency elicit lipid and protein oxidative damage and decrease non-enzymatic antioxidant defenses in rat brain. *Neurochem Int* 54:519-525.

Schuck, P.F., Busanello, EN., Moura, A.P., Tonin, A.M., Grings, M., Ritter, L., Vargas, C.R., Ferreira, G.C., Wajner, M. (2010): Promotion of lipid and protein damage in rat brain by ethylmalonic acid. *Neurochem Res* 35:298-305.

Schuck, P.F., De Assis, D.R., Viegas, C.M., Pereira, T.C.B., Machado, J.L., Furlanetto, C.B., Bogo, M.R., Streck, E.L., Ferreira, G.C.(2013). Ethylmalonic acid Modulates Na⁺K⁺-ATPase activity and mRNA Levels in Rat Cerebral Cortex. *Synapse*, 67, 111-117.

Tsakiris, S., Deliconstantinos, G. (1984): Influence of phosphatidylserine on (Na⁺-K⁺)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes. *Biochem J*, 220,1,301-307.

Zolkipli, Z., Pedersen, C.B., Lamhonwah, A.M., Gregersen, N., Tein, I. (2011): Vulnerability to Oxidative Stress In Vitro in Pathophysiology of Mitochondrial Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Response to Antioxidants. *Plos one*, Vol 6 (4), e17534.

Legends of figures:

Figure 1. Effect of EMA on CO₂ production from [1-¹⁴C] glucose in rat striatum. Values are mean +- SEM for four to five independent experiments (animals) per group and expressed as pmol CO₂ h⁻¹ g tissue⁻¹. *P<0.05 compared to control (ANOVA followed by Duncan multiple range test).

Figure 2. Effect of EMA on the activities of the respiratory chain complexes II-IV in rat striatum. Values are mean +- SEM for five to nine independent experiments (animals) per group. The activity of complex II (a) as nmol DCIP reduced min⁻¹ mg protein⁻¹. The activities of complexes II-III (B) and IV (C) are expressed respectively, as nmol cytochrome c reduced min⁻¹ mg protein⁻¹ and nmol cytochrome c oxidized min⁻¹ mg protein⁻¹. *P<0.05 compared to control (ANOVA followed by Duncan multiple range test).

Figure 3. Effect of EMA on citric acid cycle enzyme citrate synthase (CS, A), α-ketoglutarate dehydrogenase (α-KGDH, B), succinate dehydrogenase (SDH, C) and malate dehydrogenase (MDH, D) activities in rat striatum. Values are mean +- SEM for four to six independent experiments (animals) and are expressed as expressed as nmol TNB/min/mg protein (CS), nmol NADH/min/mg protein⁻¹ (α-KGDH and MDH), and nmol DCIP/min/mg protein (SDH). *P<0.05 compared to control (ANOVA followed by Duncan multiple range test)

Figure 4. Effect of EMA on Na⁺ K⁺ ATPase activity from purified synaptic plasma membranes from rat striatum. Values are mean +- SEM for four independent experiments (animals) and are expressed as nmol Pi min⁻¹ mg protein⁻¹. *P<0.05 compared to control (ANOVA followed by Duncan multiple range test).

Figure 5. Effect of EMA on GSH levels in rat striatum. Values are mean +- SEM for five to six independent experiments (animals) and are expressed as nmol mg protein⁻¹. *P<0.05 compared to control (ANOVA followed by Duncan multiple range test).

Figure 6. Effect of N-acetylcysteine (NAC) on levels of glutathione (A) reduction and Na⁺,K⁺-ATPase activity (B) inhibition caused by EMA intrastriatal injection. Animals were intraperitoneally pre-treated with saline or NAC (3 days, one injection per day). Rats were killed 24 hours after EMA administration. Data are represented as mean ± SEM for four to six independent experiments (animals) performed in triplicate. *P<0.05 (ANOVA followed by Duncan's multiple range test)

Figure 1

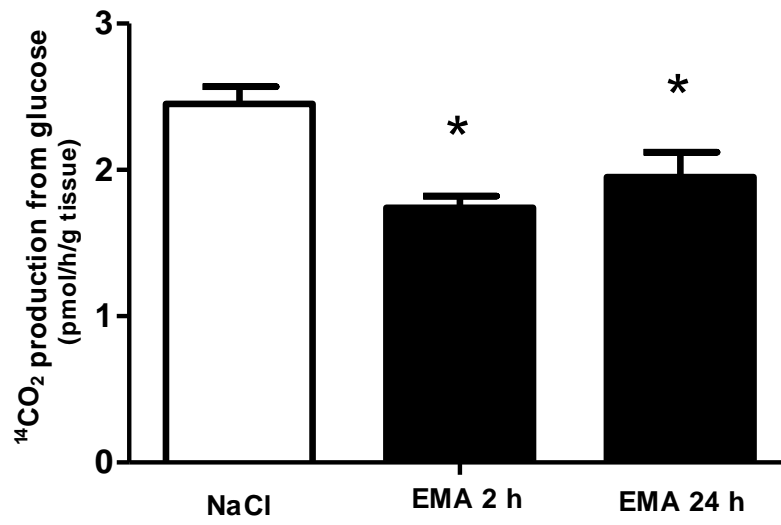


Figure 2

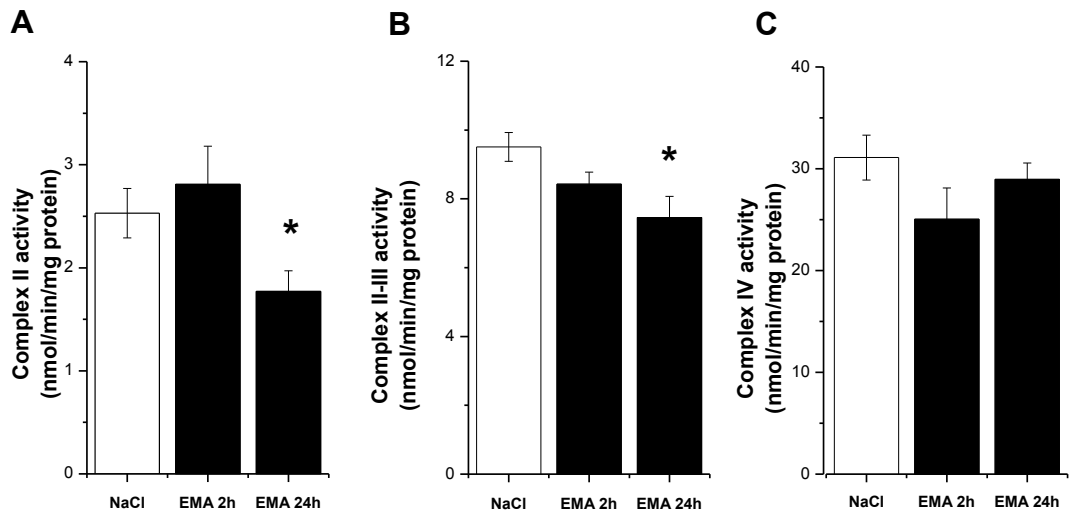


Figure 3

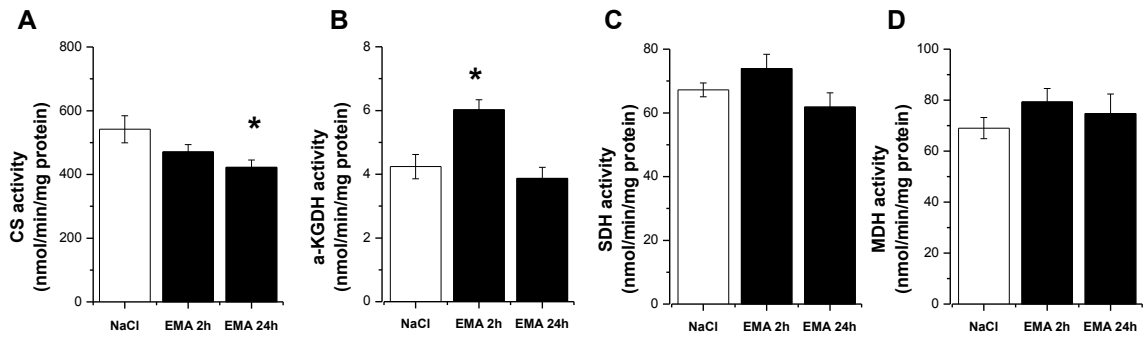


Figure 4

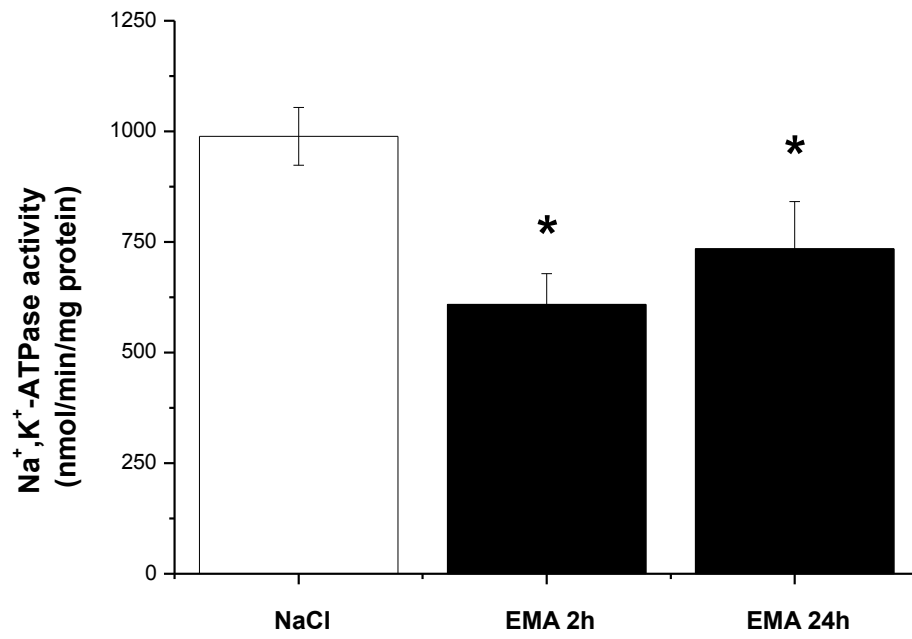


Figure 5

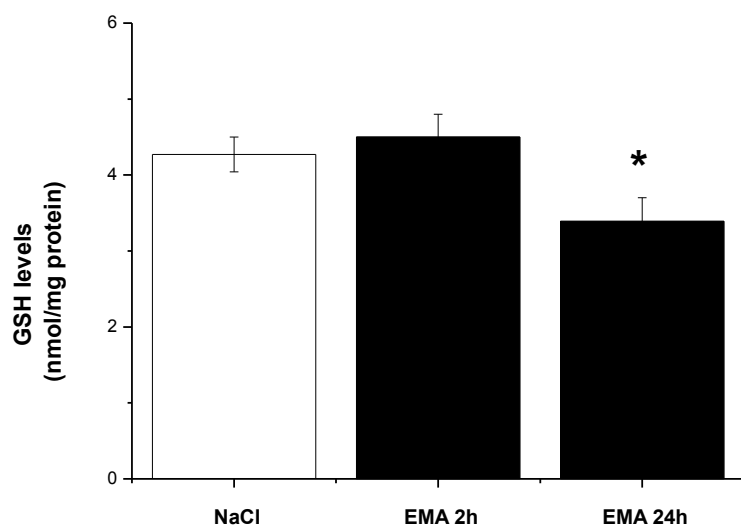
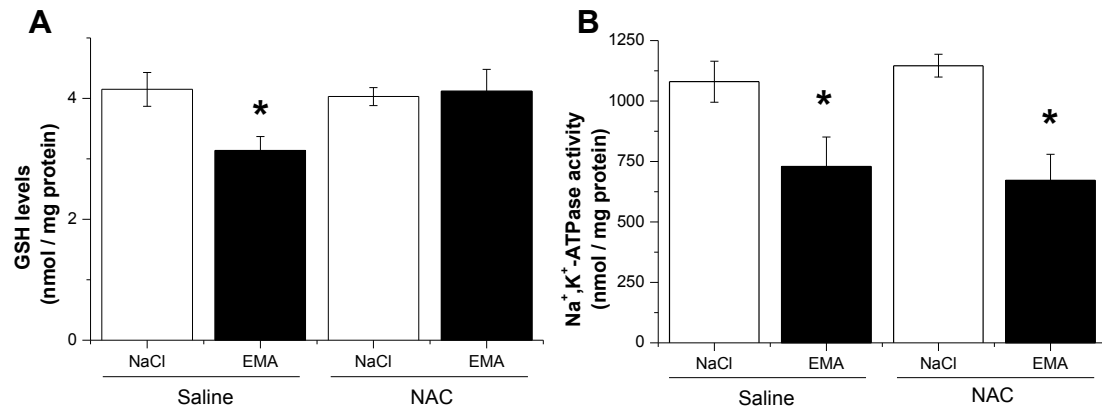


Figure 6



PARTE III:

Discussão e Conclusões

III. 1 Discussão:

A patogênese da disfunção neuronal observada nos pacientes afetados pela encefalopatia etilmalônica e pela deficiência da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta, doenças nas quais o ácido etilmalônico se acumula e é excretado em grandes quantidades, permanece desconhecida. Sabe-se que altas quantidades de butiril-CoA e seu derivado, o ácido etilmalônico, produzidos no fígado de pacientes afetados pela deficiência da SCAD e, lançados na circulação podem chegar ao cérebro. Isso ocorre porque os ácidos graxos de cadeia curta podem ultrapassar facilmente a barreira hematoencefálica (Oldendorf, 1973). Dessa forma, algumas evidências *in vitro* indicam que o EMA provoca alterações na bioenergética e induzem dano oxidativo em córtex cerebral e hipocampo de ratos jovens (Schuck et al, 2002; Leipnitz et al, 2003; Schuck et al, 2010, Schuck et al, 2009).

Uma vez que muitos pacientes diagnosticados no período neonatal são assintomáticos, nós acreditamos que o acúmulo de EMA, especialmente durante os episódios de descompensação metabólica caracterizados por intenso catabolismo de ácidos graxos, podem atuar sinergisticamente com outros fatores ambientais provocando o dano neuronal. Investigações neuroradiológicas em pacientes com EE demonstraram um aumento na hipersensibilidade dos gânglios da base, sugerindo também um comprometimento do estriado. Essa hipersensibilidade é considerada resultados de infartos, possivelmente relacionados a toxicidade dos ácidos orgânicos acumulados, como o EMA, ou secundário a mudanças vasculares comumente observadas nessa desordem (Grosso et al, 2002). Nesse contexto,

demonstramos pela primeira vez que a administração intraestriatal de EMA causa alterações em parâmetros de metabolismo energético.

Nós verificamos inicialmente que a oxidação de glicose foi significativamente diminuída pelo EMA, 2 e 24 horas após a administração, sugerindo um bloqueio no ciclo do ácido cítrico que pode ocorrer devido a uma inibição de uma ou mais atividades de enzimas do ciclo ou, alternativamente, secundária a um bloqueio do transporte de elétrons através da cadeia respiratória. Nesse sentido, nós demonstramos que o EMA diminuiu significativamente a atividade do complexo II e do complexo II-III da cadeia respiratória (fig. 2A e 2B), bem como da enzima citrato sintase (Figura 3A). Estudos relacionados verificaram que administração crônica subcutânea de EMA em ratos jovens não modificou as atividades de enzimas importantes do metabolismo (Ferreira et al, 2006). Além disso, sugere-se que o efeito inibitório do EMA na oxidação mitocondrial de succinato é devido, provavelmente, a competição entre o EMA e o succinato pelo mesmo transportador de membrana mitocondrial (Amaral et al, 2012). Assim, considerando que a redução do fluxo na cadeia de transporte de elétrons resulta em reduzida síntese de ATP, nossos dados sugerem que a produção energética é comprometida *in vivo* pelo EMA em estriado de ratos.

A enzima creatina quinase, crucial para a transferência e o tamponamento intracelular de ATP, não teve sua atividade afetada pela administração intraestriatal de EMA *in vivo* após 2 e 24 horas. No entanto, estudos prévios *in vitro* demonstraram alterações na sua atividade em diferentes estruturas cerebrais (hipocampo e cortex cerebral) (Schuck et al

2002, Schuck et al 2009, Leipnitz et al, 2009). Dessa forma, nossos achados sugerem que a transferência de energia não é alterada no estriado pela administração *in vivo*. Outros fatores, envolvidos nesse sistema, são passíveis de investigação.

A injeção intraestriatal de EMA reduz a atividade da NaK, enzima necessária para a excitabilidade neuronal e controle do volume celular e, presente em altas concentrações no cérebro consumindo por volta de 40-50% do ATP gerado nesse tecido. Demonstrou-se recentemente que a administração aguda de EMA (três injeções subcutâneas) aumentou a atividade da NaK em cortex cerebral (Schuck et al, 2013). Outro estudo que utilizou uma injeção intraestriatal de ácido metilmalônico (MMA), estruturalmente similar ao EMA, induziu uma diminuição persistente na atividade da NaK em estriado e uma aumento em cortex de ratos (Malfatti et al, 2003). Uma possibilidade interessante que explica esses achados é relacionada a expressão diferencial das isoenzimas da NaK, as quais possuem sensibilidades diferentes a espécies reativas de oxigênio entre as estruturas cerebrais. Nesse contexto, Schuck e colaboradores demonstraram uma diminuição na expressão de RNAm das diferentes subunidades da NaK ($\alpha 1$ e $\alpha 3$) em cortex cerebral de animais tratados com EMA (Schuck et al, 2013).

Outros estudos mostraram que o EMA aumenta o dano lipídico e proteico *in vitro* em cortex cerebral de ratos (Schuck et al, 2010). Considerando que a NaK é particularmente sensível ao dano induzido pelos radicais livres, nós observamos nesse trabalho, o declínio das defesas antioxidantes não enzimáticas cerebrais (GSH) provavelmente refletindo o rápido consumo de

espécies reativas. Por outro lado, a inibição do transportador mitocondrial de dicarboxilatos causado pelo EMA, proposto por Amaral e colaboradores, (Amaral et al, 2012), também pode estar envolvido na inibição do transporte de GSH para a mitocôndria cerebral, promovendo um desbalanço redox.

Demonstramos também que o pré-tratamento dos animais com o agente antioxidante N-acetilcisteína foi capaz de prevenir a redução dos níveis estriatais de GSH causada pela injeção de EMA. Visto que a enzima NaK é vulnerável ao dano oxidativo, particularmente via oxidação de grupamentos sulfidrilas essenciais (Abeywardena et al, 1983; Carfagna e Muhoberac, 1993), e que nossos dados demonstram que o pré-tratamento com o NAC, um agente protetor de grupamentos sulfidrilas, não foi capaz de prevenir a redução de sua atividade, sugere-se que tal efeito inibitório não é devido à oxidação desses grupamentos sulfidrilas. É possível, no entanto, que a redução da atividade da NaK causada pelo EMA possa ser devida à oxidação de lipídios de membrana onde esta enzima está inserida.

Concluimos que nossos achados demonstram, pela primeira vez, que a injeção intraestriatal de EMA causa uma alteração na homeostase energética cerebral sugerindo um possível mecanismo fisiopatológico envolvido nos vários distúrbios em que o EMA se acumula.

III.2 Conclusões:

- O EMA inibiu a produção de CO₂ a partir de glicose (2 e 24 hr), sugerindo um prejuízo da atividade do ciclo do ácido cítrico;
- O EMA diminuiu significativamente a atividade do complexo II e II-III (24hr), sem alterar a atividade do complexo IV, o que indica que esse metabólito pode estar comprometendo o fluxo de elétrons pela CTE, levando a uma possível diminuição de ATP;
- O EMA não alterou a atividade da enzima CK, sugerindo que esse metabólito não está envolvido no comprometimento da transferência intracelular de energia;
- O EMA diminuiu a atividade da enzima NaK (2 e 24 hr), indicando que esse metabólito pode alterar o potencial de membrana necessário para a manutenção da excitabilidade neuronal e a neurotransmissão. O EMA diminuiu os níveis de GSH e o pré tratamento com NAC, um agente protetor de grupamentos sulfidrilas, preveniu a redução dos níveis estriatais de GSH causada pela injeção de EMA mas não foi capaz de prevenir a redução da atividade da enzima NaK, sugerindo que tal efeito inibitório não é devido a oxidação desses grupamentos sulfidrilas.

III.3 Perspectivas:

- Estudar o potencial neuroprotetor de outros agentes, tais como creatina e L-carnitina, sobre os efeitos deletérios causados pela injeção intraestriatal de EMA.
- Avaliar o efeito da administração intraestriatal de EMA sobre outros parâmetros de estresse oxidativo.
- Avaliar morfologia, viabilidade e morte celular em estriado de ratos por imunistoquímicas após a administração de EMA.

Referências Bibliográficas:

Abeywardena MY, Allen TM, Charnock JS (1983) Lipid-protein interactions of reconstituted membrane-associated adenosine triphosphatases. *Biochim Biophys Acta* 729:62–74

Amaral, A.U., Cecatto, C., Busanello, E.N.B., Ribeiro, C.A.J., Melo, D.R., Leipnitz, G., Castilho, R.F., Wajner, M. (2012): Ethylmalonic acid impairs brain mitochondrial succinate and malate transport. *Mol Gen and Metab* 105: 84-90.

Aperia, A. (2007): New roles for an old enzyme: Na, K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med.*, 261(1):44-52.

Barschak, A.G., Ferreira, G.C., André, K.R et al (2006): Inhibition of the electron transport chain and creatine kinase activity by ethylmalonic acid in human skeletal muscle. *Metab Brain Dis* 21: 11-19.

Bennet, M.J., Weinberger, M.J., Kobory, J.A., Rinaldo, P., Burlina, A.B., (1996): Mitochondrial short-chain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: A new defect of fatty acid oxidation. *Pediatr Res* 39:185-188.

Bhala A, Willi, S.M., Rinaldo, P et al (1995): Clinical and biochemical characterization of short acylcoenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Pediatr* 126:910-915.

Bickel, H. (1987): Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme*, 38, n.1-4, 14-26.

Burton, B.K. (1987): Inborn Errors of Metabolism: the clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics*, 79:359.

Carfagna MA, Muhoberac BB (1993) Interactions of tricyclic drug analogs with synaptic plasma membranes: structure mechanism relationships in inhibition of neuronal Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Mol Pharmacol* 44:129–141

Chalmers, R.A, Lawson, A.M. Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias, 1st ed., London, Chapman and Hall, 1982.

Dawson, D.B., Waber, I., Hale, D.E., Bennet. M.J., (1995): Transient organic aciduria and persistent lactic acidemia in a patient with short-chain acyl-Coenzyme: A dehydrogenase deficiency. *J Pediatr* 126:69-71.

Dickinson, C.J. (1996): Cerebral oxidative metabolism in hypertension. *Clinical Science*, 91:539-550.

Drousiotou, A.; Dimeo, I.; Mineri, R.; Georgiou, T.; Stylianidou, G.; Tiranti, V. Ethylmalonic encephalopathy: application of improved biochemical and molecular diagnostic approaches. *Clin Genet*, v. 79, n. 4, p. 385-90, Apr 2011.

Dweikat, I., Naser, E., Damsah, N., Libdeh, B.A., Bakri I. (2012): Ethylmalonic encephalopathy associated with crescentic glomerulonephritis 27:613-616.

Erecinska, M. and Silver, I.A. (1994): Íons and energy in mammalian brain. *Progress in Neurobiology*, 43:37-71.

Ersser, R.S And Smith, I. Aminoacids and Related Compounds In: Smith, I. and Seakins, I.W.T. *Chromatographic and Eletrophoretic Techniques*. 4st ed London, William Heinemann Medical Books Ltd, 1976.

Ferreira, G.C., Andre, K.R., Schuck, P.F., Viegas, C.M., Tonin, A.M., Coelho, D.M., Wyse, A.T.S., Wannamacher, C.D., Vargas, C.R., Wajner, M.(2006): Effect of in vivo administration of ethylmalonic acid on energy metabolism in rat tissues. *Metab Brain Dis*, 21, 29-39.

Gibson, G., Sheu, K.F., Blass, J.P., Baker, A., Carison, K.C., Harding, B., Perrino. (1988): Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, 45, n.8, 836-840.

Giordano, C., Viscomi, C., Orlandi, M., Papoff, P., Spalice, A., Burlina, A., DiMeo, I., Tiranti, V., Leuzzi, V., D'Amanti, G., Zeviani, M. (2012) Morphologic evidence of diffuse vascular damage in human and in the experimental model of ethylmalonic encephalopathy. *J Inher Metab Dis* 35(3):451-458.

Gregersen, N, Winter, V.S., Corydon, M.J., et al (1998): Identification of four new mutations in the short chain acyl-CoA dehydrogenase gene in two patients : one of the variant alleles, 511>T is present at an unexpectedly high frequency in the general population, as was the case for 625G>A, together conferring susceptibility to ethylmalonic aciduria. *Hum Mol Gen* 7:619-627.

Grisar, T. (1984): Glial and neuronal Na, K pump in epilepsy. *Ann Neurol*, 16, s128-s134.

Grosso, S., Mostardini, R., Farnetani, M.A., Molinelli, M., Berardi, R., Dionisi-Vici, C., Rizzo, C., Morgese, G., Balestri, P. (2002): Ethylmalonic encephalopathy- Further clinical and neuroradiological characterization. *J Neurol*, 249, 1446-1450.

Janetzky, B., Hauck, S., Youdim, M.B., Rieder, P., Jellinger, K., Pantucek, F., Zöchling, R., Bolss, K.W., Reichmann, H. (1994): Unaltered aconitase activity but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 169, m.1-1, 126-128.

Jiang, M., Liu, L., Peng, M., Liang, C., Sheng, H., Cai, Y. (2012): First case report of short acyl-CoA dehydrogenase deficiency in China. *J Pediatr Endocr Met* 25(7-8): 795-797.

Joseph, M.H And Marsden, C.A. Amino Acids and Small Peptides In: Lim, C.K. HPLC of Small Molecules. 1st ed, Oxford, IRL Press, 1986.P13-28.

Leipnitz, G., Schuck, P.F., Ribeiro, C.A., Dalcin, K.B., Assis, D.R., Barschak, A.G., Pulrolnik, V., Wannamacher, C.M., Wyse, A.T., Wajner, M. (2003): Ethylmalonic acid inhibits mitochondrial creatine kinase activity from cerebral cortex of young rats in vitro. *Neurochem Res* 28:771-777.

Leipnitz, G., Seminotti, B., Fernandes, G.C., Amaral, A.U., Beskow, A.P. da Silva, L de B., Zanatta, A., Ribeiro, C.A., Vargas, C.R., Wajner, M. (2009): Striatum is more vulnerable to oxidative damage induced by the metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency as compared to liver. *Int J Dev Neurosci*, 27, 4, 351-356.

Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L., Afzelius, B. (1962): A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest*, 41, 1776-1804.

Malfatti, C.R.M., Royes, L.F.F., Francescato, L., Sanabria, E.R.G., Rubin, M.A., Cavalheiro, E.A., Mello, C.F. (2003): Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na⁺, K⁺-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. *Epilepsia*, 44, 6, 761-767.

Maurer, I., Zierz, S., Möller, H.J. (2000): A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging*, 21, n.3, 455-462.

Marks, D.B., Marks, A.D., Smith, C.M. Basic Medical Biochemistry: a clinical approach (1996).

Mastragiacomio, F., Bergeron, C., Kish, S.J.(1993): Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 61, n.6, 2007-2014.

Mitchell, G.A., Fukao, T.J.C.(2001): Inborn Errors of Ketone Body Metabolism. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., editors. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill p.2340-2342.

Mizuno, Y., Suzuki, K., Ohta, S. (1990): Postmortem changes in mitochondrial respiratory enzymes in brain and preliminary observation in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 96, n.1, 49-57. Nagan, N., Kruckeberg, K.E., Tauscher, A.L., et al (2003): The frequency of short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene variants in the US population and correlation with the C4-acylcarnitine concentration in newborn blood spots. *Mol Genet Metab* 78: 239-246.

Oldendorf, W.H. (1973): Carrier mediated blood-brain transport of short-chain monocarboxylic organic acids. *Am J Physiol*, 224(6), 1450-1453.

Parker, W.J., Boyson, S.J., Luder, A.S., Parks, J.K.(1990): Evidence for a defect in NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Huntington's disease. *Neurology*, 40, n.8, 1231-1234.

Pedersen, C.B., Zolkipli, Z., Vang, S., Palmfeldt, M., Kjeldsen, J., Stenbroen, V., Schmidt, S.P., Wanders, J.P., Ruiter, F., Wibrand, I., Tein, I., Gregersen, N.(2010): Antioxidant dysfunction: potential risk for neurotoxicity in ethylmalonic aciduria. *J.Inherit. Metab.Dis*, 33:211-222.

Perry, E., Perry, R.H., Tominson, B.E., Blessed, G., Gibson, P.H. (1980): Coenzyme A-acetylating enzymes in Alzheimer's disease: possible cholinergic "compartment" of pyruvate dehydrogenase. *Neurosci Lett*, 18, n.1, 105-110.

Roe, R.E, Coates, P.M. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders, In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.) The metabolic and molecular bases of inherited diseases, 7th ed., New York, McGraw-Hill, Inc., 1995.

Roe, C.R., Ding, J., (2001): Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: Scriver C.R, Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D.(Eds). The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th edn. McGraw-Hill, New York, 2297-2326.

Rinaldo, P., Rayond, K., Al-Odaib, A, Bennett, M.J. (1998): Clinical and biochemical features of fatty acid oxidation disorders. *Current Opinion in Pediatrics*, 10: 615-621.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds.) The molecular bases of inherited disease, 8th ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.

Shapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D. et al. (1990): Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 54:823-827.

Schuck, P.F., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A., Dalcin, K.B., Assis, D.R., Barschak, A.G., Pulrolnik, V., Wannamacher, C.M., Wyse, A.T., Wajner, M. (2002): Inhibition of creatine kinase activity in vitro by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. *Neurochem Res* 27: 1633-1639.

Schuck, P.F., Ferreira, G.C., Moura, A.P, et al. (2009): Medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency elicit lipid and protein oxidative damage and decrease non-enzymatic antioxidant defenses in rat brain. *Neurochem Int* 54:519-525.

Schuck, P.F., Busanello, EN., Moura, A.P., Tonin, A.M., Grings, M., Ritter, L., Vargas, C.R., Ferreira, G.C., Wajner, M. (2010): Promotion of lipid and protein damage in rat brain by ethylmalonic acid. *Neurochem Res* 35:298-305.

Schuck, P.F., De Assis, D.R., Viegas, C.M., Pereira, T.C.B., Machado, J.L., Furlanetto, C.B., Bogo, M.R., Streck, E.L., Ferreira, G.C. (2013): Ethylmalonic acid Modulates Na⁺K⁺-ATPase activity and mRNA Levels in Rat Cerebral Cortex. *Synapse*, 67, 111-117.

Swerdlow, R., Parks, J., Cassarino, D., Trimmer, P., Miller, S., Maguire, D., Sheehan, J., Maguire, R., Pattee, G., Juel, V., Phillips, L., Turtle, J., Bennet, J.J., Davis, R., Parker, W.J. (1998): Mitochondria in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*, 153, n.1, 135-142.

Tein, I., Haslam, R.H.A., Rhead, W.J., Bennet, M.J., Becker, L.E., Vockley, J., (1999): Short chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: A cause of ophthalmoplegia and multicore myopathy. *Neurology* 52:366-372.

Tiranti, V.; D'adamo, P.; Briem, E.; Ferrari, G.; Mineri, R.; Lamantea, E.; Mandel, H.; Balestri, P.; Garcia-Silva, M. T.; Vollmer, B.; Rinaldo, P.; Hahn, S. H.; Leonard, J.; Rahman, S.; Dionisi-Vici, C.; Garavaglia, B.; Gasparini, P.; Zeviani, M. Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in ETHE1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein. *Am J Hum Genet*, v. 74, n. 2, p. 239-52, Feb 2004.

Tiranti, V.; Briem, E.; Lamantea, E.; Mineri, R.; Papaleo, E.; De Gioia, L.; Forlani, F.; Rinaldo, P.; Dickson, P.; Abu-Libdeh, B.; Cindro-Heberle, L.; Owaidha, M.; Jack, R. M.; Christensen, E.; Burlina, A.; Zeviani, M. ETHE1 mutations are specific to ethylmalonic encephalopathy. *J Med Genet*, v. 43, n. 4, p. 340-6, Apr 2006.

Wyse, A.T., Streck, E.L., Worm, P., Wajner, M., Ritter, F., Netto, C.A. (2000). Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res*, 25, n.7, 971-975.

Zafeiriou, D. I.; Augoustides-Savvopoulou, P.; Haas, D.; Smet, J.; Triantafyllou, P.; Vargiami, E.; Tamiolaki, M.; Gombakis, N.; Van Coster, R.; Sewell, A. C.; Vianey-Saban, C.; Gregersen, N. Ethylmalonic encephalopathy: clinical and biochemical observations. *Neuropediatrics*, v. 38, n. 2, p. 78-82, Apr 2007.

Zolkipli, Z., Pedersen, C.B., Lamhonwah, A.M., Gregersen, N., Tein, I. (2011): Vulnerability to Oxidative Stress In Vitro in Pathophysiology of Mitochondrial

Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Response to Antioxidants.
Plos one, Vol 6 (4), e17534.

Yu, S.P.(2003): Na(+)-K(+)-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem Pharmacol*, 66, n.8, 1601-1609.

Lista de Figuras:

Figura 1. Formação de metabólitos na deficiência da SCAD.....20