

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA**

**β -NADH DIMINUI A SENSIBILIDADE DA SUCINATO
DESIDROGENASE A INIBIÇÃO POR ÁCIDO
METILMALÔNICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aledson Rosa Torres

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**β -NADH DIMINUI A SENSIBILIDADE DA SUCINATO
DESIDROGENASE A INIBIÇÃO POR ÁCIDO
METILMALÔNICO**

por

Aledson Rosa Torres

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria,
como requisito parcial para a obtenção de grau de

Mestre em Bioquímica Toxicológica

Orientador: Carlos Fernando de Mello

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA**

**A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**β -NADH DIMINUI A SENSIBILIDADE DA SUCINATO
DESIDROGENASE A INIBIÇÃO POR ÁCIDO METILMALÔNICO**

elaborada por

Aledson Rosa Torres

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Carlos Fernando de Mello
(Orientador)

Maria Ester Pereira
(Examinadora)

Adriana Coitinho
(Examinadora)

Santa Maria, 04 de Maio de 2007

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus por tudo que me destes, grato pela vida e família que me concedeste. Pela Sua infinita sabedoria, e pelas oportunidades que me proporcionou.

A minha esposa Cris e ao Mateus, meu filho amado, que pacientemente suportaram minha ausência. Pela sua compreensão, pelo exemplo de luta e dignidade, pelo amor, companheirismo, atenção, dedicação e paciência em todos estes anos. Obrigado por estar sempre ao meu lado e suportar as viagens semanais do trecho Tapejara – Santa Maria.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlos Mello, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação, oferecendo uma oportunidade única, e também por sua ajuda, dedicação e principalmente pela sua amizade e experiência.

Ao Nando, parceiro de longa data, e a Michele, pela disponibilidade que demonstraram em me auxiliar sempre que precisei.

À Ana Flávia, Mauro, e a Natasha, pela amizade, pelos momentos de descontração, mas principalmente um especial agradecimento pelo fato de manterem as condições de funcionalidade deste laboratório na ausência do Carlos.

Ao grupo da pirexia: Ju, Ana, Vivi e André, que “moram” neste laboratório, e nos finais de semanas e horários mais improváveis que escolhia para desenvolver meu trabalho, sempre me faziam companhia.

Ao André, IC emprestado, que auxiliou no desenvolvimento da parte prática deste trabalho, por compartilhar as alegrias e as tristezas, sem nunca desistir, obrigado pelo seu empenho.

À Flávia e a Lia, as primeiras criaturas que encontrei quando vim prestar a prova de seleção, pelo carinho, amizade e companheirismo.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade e a CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

β -NADH DIMINUI A SENSIBILIDADE DA SUCINATO DESIDROGENASE A INIBIÇÃO POR ÁCIDO METILMALÔNICO

Autor: Aledson Rosa Torres
Orientador: Carlos Fernando de Mello
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 04 de maio 2007.

A acidemia metilmalônica, uma das mais frequentes acidemias orgânicas, é causada pela deficiência da enzima metilmalonil-CoA mutase, ocasionando acumulação tecidual de ácido L-metilmalônico (MMA). Os indivíduos afetados apresentam letargia, coma, vômito, hipotonia muscular, episódios recorrentes de acidose metabólica e encefalopatia progressiva. Em decorrência do acúmulo de MMA ocorre inibição da succinato desidrogenase (SDH), E.C.5.5.99.2, diminuição da produção de ATP, aumento dos níveis de lactato e dano excitotóxico. No presente estudo confirmamos que o MMA inibe a SDH competitivamente e investigamos se a presença de uma agente redutor no meio enzimático alteraria a atividade da SDH, ou sua inibição por MMA. A atividade da SDH em córtex cerebral de ratos foi determinada usando o 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazólio (INT), como aceptor de elétrons. A pré-incubação com β -NADH (160 μ M) preveniu a inibição da SDH causada por 5 mM de MMA [$F(1,5)=9,31$; $p=0,028$]. Posteriormente, foi determinado os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) da SDH pré-incubada na presença e ausência de β -NADH. O K_m da SDH pré-incubada com β -NADH ($K_m=0,216$ nmol INT) é menor que o K_m da SDH pré-incubada na ausência de β -NADH ($K_m=0,272$ nmol INT), [$T(2)=10,375$; $p=0,009$]. Por outro lado a pré-incubação da enzima com β -NADH não alterou a V_{max} ($4,72 \pm 0,28 \cdot 10^{-8}$ mol INT/mg proteína/min) [$T(2)=-1,0$; $p=0,423$]. A constante de inibição (K_i) do MMA para a SDH pré-incubada com β -NADH ($K_i=20,05$ mM) foi maior que o K_i do MMA para a SDH pré-incubada sem β -NADH ($K_i=11,60$ mM) [$T(2)=18,806$; $p=0,003$]. Os dados mostram que a presença de β -NADH diminui a sensibilidade da succinato desidrogenase a inibição por ácido metilmalônico.

ABSTRACT

Msc. Program in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

β -NADH REDUCES SUCCINATE DEHYDROGENASE SENSITIVITY TO THE COMPETITIVE INHIBITOR METHYLMALONIC ACID IN CEREBRAL CORTEX OF RATS

Author: Aledson Rosa Torres
Advisor: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello
Place and date: Santa Maria, May 04th, 2007.

Methylmalonic acidemia, one of the most frequent organic acidemias, is caused by deficiency of the methylmalonyl CoA mutase, leading to tissue accumulation of L-methylmalolonic acid (MMA). Affects individuals present lethargy, coma, vomiting, muscular hypotonia, recurrent episodes of metabolic acidosis and progressive encephalopathy. In this context, it has been proposed that MMA inhibits succinate dehydrogenase (SDH) and leads to ATP depletion, lactate accumulation and excitotoxic damage. In the present study we confirmed that MMA competitively inhibits of SDH, and later were investigated the enzymatic medium reduction alters the activity of SDH or its inhibition by MMA. SDH activity was determined in cerebral cortex homogenates, using 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (INT), as the electorn acceptor. The reduction enzymatic medium was promoted by preincubation with β -NADH (160 μ M). The preincubation of β -NADH prevented the inhibition of the activity of SDH induzed by 5mM of the MMA [F(1,5)=9.31; $p=0.028$]. In addition, was determined of the kinetic parameters (K_m and V_{max}) and inihition constant (K_i) of SDH preincubated in the presence and absence of β -NADH. The K_m of SDH preincubated with β -NADH ($K_m=0.216$ nmol INT) was different of the K_m of SDH preincubated in the absence of the β -NADH ($K_m=0.272$ nmol INT) [T(2)=10.375; $p=0.009$]. The presence of β -NADH in the incubation medium did not alter $V_{max}= 4.72 \pm 0.28 \cdot 10^{-8}$ mol INT/mg protein/min) [T(2)=-1.0; $p=0.423$]. The K_i of the MMA by SDH activity in presence of the β -NADH ($K_i =20.05$ mM) is increased that of K_i of the MMA by SDH activity in absence of the β -NADH ($K_i =11.60$ mM), [T(2)=18.806; $p=0.003$]. In conclusion, we showed that, in the presence of β -NADH, SDH is less sensitive to the inhibition by MMA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Participação dos ácidos orgânicos no metabolismo intermediário.....	18
Figura 2 – Metabolismo do metilmalonil-COA.....	19
Figura 3 – Alterações induzidas pela presença de MMA - Falência energética .	22
Figura 4 – Estrutura da SDH de <i>E. coli</i> ..	27
Figura 5 – Interconversão de succinato à fumarato..	28
Figura 6 – Efeito do MMA sobre a atividade da SDH.....	44
Figura 7 – Determinação da concentração de β -NADH sem efeito per se.....	45
Figura 8 – Efeito da pré-incubação do meio enzimático com β -NADH sobre a atividade da SDH e sua inibição por MMA.....	46
Figura 9 – Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para SDH pré-incubada na presença e ausência de β -NADH.....	48
Figura 10 – Determinação do K_i do MMA para SDH pré-incubada na presença e ausência de β -NADH – Método gráfico: $K_{m\text{ap}}$ vs [MMA].....	50
Figura 11 – (A) Determinação do K_i do MMA para SDH pré-incubada com β -NADH – Método gráfico de Dixon.....	51
(B) Determinação do K_i do MMA para SDH pré-incubada sem β -NADH – Método gráfico de Dixon.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados clínicos que, na ausência de uma causa definida, sugerem EIM.....	17
Tabela 2 – Potencial de redução dos centros redox da SQR da <i>E. coli</i>	28
Tabela 3 – Valores de K_i obtido através de diferentes gráficos.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

3-NPA – Ácido 3-nitropropiónico

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

CR – Cadeia respiratória

DCIP – Diclorofenol-indofenol

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

GSH – Glutathiona reduzida

GSH-Px – Glutathiona peroxidase

INT – Cloreto de 2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazólio

mg – miligrama

mM – milimolar

MMA – Ácido metilmalônico

NaCl – Cloreto de sódio

NAD⁺ – Nicotinamina adenina dinucleotídeo oxidada

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NMDA – N-metil-D-aspartato

O₂ – Oxigênio molecular

OAA – Oxalacetato

PO₄ – Tampão fosfato

RLs – Radicais livres

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SDH – Succinato desidrogenase

SNC – Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
	2.1 Erros inatos do metabolismo.....	16
	2.2 Acidemia Metilmalônica.....	19
	2.2.1 Tratamento da Acidemia Metilmalônica.....	25
	2.3 Succinato desidrogenase.....	26
	2.3.1 Estrutura da succinato desidrogenase.....	26
	2.3.2 Atividade da succinato desidrogenase.....	30
3	OBJETIVOS.....	33
	3.1 Objetivo Geral.....	34
	3.2 Objetivos Específicos.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
	4.1 Reagentes.....	36
	4.2 Equipamentos.....	37
	4.3 Preparo das soluções.....	38
	4.3.1 Solução de Homogeneização.....	38
	4.3.2 Solução salina-sacarose.....	38
	4.3.3 Tampão fosfato de potássio.....	38
	4.3.4 Solução azida sódica.....	38
	4.3.5 Solução cianeto de potássio.....	39
	4.3.6 Solução de INT.....	39
	4.3.7 Solução de ácido metilmalônico.....	39

4.3.8	Solução de succinato sódico.....	39
4.3.9	Solução de β -NADH.....	39
4.3.10	Reagente de Coomassie.....	40
4.4	Animais.....	40
4.5	Preparação da fração enriquecida em mitocôndrias.....	40
4.6	Determinação da atividade da SDH.....	41
4.7	Influência do meio reacional sobre a SDH e sua inibição por MMA..	42
4.8	Análise estatística.....	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Determinação do efeito do MMA sobre atividade da SDH.....	44
5.2	Determinação da concentração da β-NADH sem efeito <i>per se</i>.....	45
5.3	Efeito de pré-incubação com β-NADH sobre inibição da SDH por MMA.....	46
5.4	Estudo dos parâmetros cinéticos.....	47
5.4.1	Determinação do K_m e V_{max} da SDH pré-incubada na ausência e presença de β -NADH.....	47
5.4.2	Determinação do K_i do MMA para a SDH pré-incubada na ausência e presença de β -NADH.....	49
6	DISCUSSÃO.....	52
7	CONCLUSÕES.....	58
8	REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios hereditários, resultado de deficiências em atividades enzimáticas, o que ocasiona um bloqueio de diversas rotas metabólicas. Esse bloqueio, além de induzir um acúmulo de substâncias tóxicas e/ou a falta de substâncias essenciais, gera distúrbios no desenvolvimento físico e mental (Oberholzer et al., 1967). Atualmente, o termo EIM se aplica a um grupo de doenças geneticamente determinadas, decorrente de deficiência em alguma via metabólica que está envolvida na síntese (anabolismo), degradação (catabolismo), transporte ou armazenamento de uma substância (Benson e Fenson, 1985).

Apesar de serem eventos raros, os EIM representam importante problema de saúde e seu diagnóstico, freqüentemente, se constitui em um desafio para o clínico, uma vez que, a maioria dos sinais e sintomas que acompanham os EIM são comuns a outras doenças mais freqüentes. Em algumas populações e grupos étnicos isolados, certos erros do metabolismo, bastante raros na população geral, podem ser extremamente freqüentes. Como exemplos, temos as doenças de Tay-Sachs e Gaucher entre os judeus originários do Leste europeu, conhecidos como Ashquenazim, e a tirosinemia tipo I nos canadenses de ascendência francesa (Fenton et al., 2001).

Tem sido observado, entre os EIM, uma prevalência maior de acidemias orgânicas do que aminoacipatias. De fato, em função dos progressos feitos no campo do diagnóstico dos erros inatos do metabolismo, evidenciou-se que as acidemias orgânicas são, realmente, os erros inatos mais freqüentes na população brasileira (Wajner et al., 2002).

A acidemia metilmalônica, um erro inato do metabolismo autossômico recessivo, é causado por inibição ou pouca atividade da enzima L-metilmalonil-CoA mutase (EC.5.5.99.2), resultando em acúmulo de ácido metilmalônico e de outros metabólitos secundários (Fenton et al., 2001).

Os sinais e sintomas da doença variam em gravidade, de acordo com a idade que se instala o distúrbio metabólico. Quando o quadro se instala precocemente (até 21 dias) o paciente geralmente vai a óbito (Fernandes et al., 1990).

Os pacientes que sobrevivem (menos de 15 %) apresentam convulsões, retardo mental e psicomotor, além de alterações comportamentais e neuropsiquiátricas, tais como déficit de atenção, quadros de agressividade e comportamento autista (Hoffmann et al., 1993).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Erros inatos do metabolismo

O termo “erro inato do metabolismo” foi sugerido por Garrod, em 1908, para caracterizar quatro situações clínicas que estudava (alcaptonúria, albinismo, pentosúria e cistinúria). Garrod achava que essas doenças eram devidas a um bloqueio metabólico. Reunindo suas observações com o fato de os casos ocorrerem mais freqüentemente em irmãos, filhos de pais consangüíneos, estabeleceu uma relação com as recém redescobertas leis de Mendel (Giugliani, 1988).

Conceitualmente, erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios hereditários transmitidos, em sua maioria, de maneira autossômica recessiva e resultam da deficiência de atividades enzimáticas, o que ocasiona um bloqueio de diversas rotas metabólicas. Esse bloqueio, além de induzir um acúmulo de substâncias tóxicas e/ou falta de substâncias essenciais, pode gerar distúrbios no desenvolvimento físico e mental (Fenton e Rosemberg, 1995).

Os EIM compreendem mais de 500 distúrbios (Scriver, 2001), a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Benson e Fensom, 1985).

Embora individualmente raros, os EIM são relativamente freqüentes em seu conjunto, estimando-se que possam ocorrer em até 1 em cada 1000 recém nascidos vivos (Giugliani et al., 1988). Estudos realizados em grupos considerados de alto risco indicam uma freqüência de EIM mais de 100 vezes maior nesses indivíduos, em relação à população em geral (Wannmacher et al., 1982).

Em estudo realizado nas unidades pediátricas de tratamento intensivo em Porto Alegre (Brasil), a freqüência dos EIM encontrada em pacientes selecionados

através de sintomas e sinais sugestivos foi de 1:15 (Wajner et al., 2002). Coelho et al (1997) realizaram estudos no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brasil) com 10.000 pacientes que apresentavam sinais e sintomas sugestivos de EIM, no período entre 1982 a 1995, que revelaram 647 casos de EIM (6,5%), valor similar ao registrado por Wannmacher et al. (1982).

A maioria dos sinais e sintomas que acompanham os EIM são comuns a outras doenças mais freqüentes, fazendo com que o diagnóstico correto possa ser retardado ou até mesmo ignorado. Uma relação de sinais e sintomas apresentados pelos pacientes com EIM nos primeiros meses de vida (Tabela 1) ilustra como estes podem ser facilmente confundidos com situações mais comuns na prática clínica (Giugliani, 1988).

Tabela 1. Dados clínicos que, na ausência de uma causa definida, sugerem EIM.

Coma, hipotonia, irritabilidade, convulsões, acidose, distúrbio hidro-eletrolítico, hipoglicemia, sepsis, icterícia, vômitos ou diarreia em recém-nascidos.

Retardo no desenvolvimento neuromotor e/ou deficiência mental

Regressão neurológica, com perda de habilidades anteriormente adquiridas.

Hepato e/ou esplenomegalia, icterícia colestástica e diarreia crônica.

Deficiência de crescimento e/ou alterações ósteo-articulares

Episódios recorrentes de hipoglicemia, acidose metabólica, desequilíbrio hidroeletrólítico.

Relato de irmão falecido precocemente sem diagnóstico definido

Consangüinidade entre os pais

Fonte: Giugliani, R., **Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica**. Pediatría Moderna, vol. 23(01) – 1988.

Em 1980, Chalmers e colaboradores observaram uma prevalência maior de acidemias orgânicas do que aminoacidopatias. De fato, em função dos progressivos avanços no diagnóstico dos EIM, evidenciou-se que as acidúrias orgânicas são os EIM mais freqüentes na população (Goodman e Frermmam, 2001).

As acidemias ou acidúrias orgânicas são caracterizadas bioquimicamente pelo acúmulo de um ou mais ácidos orgânicos nos tecidos dos pacientes afetados e são causados pela grave deficiência ou ausência na atividade de uma enzima (Chalmers et al., 1980). Os ácidos orgânicos compreendem metabólitos de, virtualmente, todas as vias do metabolismo intermediário (Figura 1), assim como de compostos exógenos (Hoffmann, 1996).

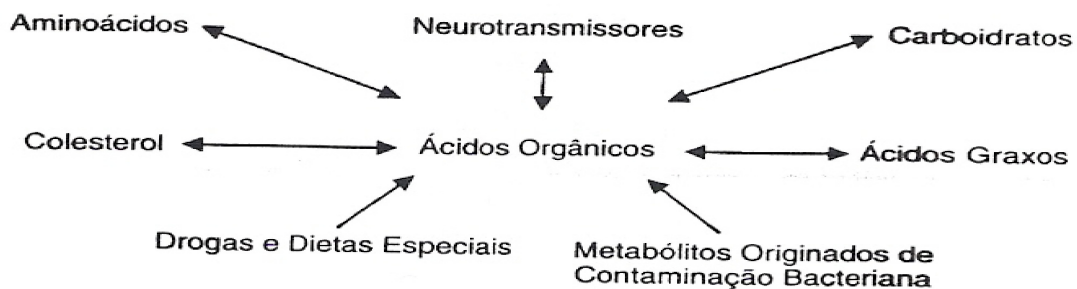


Figura 1. Participação dos ácidos orgânicos no metabolismo intermediário.

O diagnóstico das acidemias orgânicas é realizado através da identificação de ácidos orgânicos na urina. Uma vez que a maioria das acidemias orgânicas apresentam, nesse material, um padrão anormal e característico de excreção de ácidos orgânicos. Entretanto, é importante a análise de ácidos orgânicos no plasma para a investigação de algumas doenças, como os distúrbios da oxidação dos ácidos graxos, ou no liquor, para as acidemias orgânicas cerebrais, como por exemplo, a acidemia láctica cerebral e a deficiência da glutaril CoA desidrogenase (Buchanan e Thoene, 1991).

2.2. Acidemia Metilmalônica

A acidemia metilmalônica é um erro inato do metabolismo autossômico recessivo, causado por inibição ou pouca atividade da enzima L-metilmalonil-CoA mutase (EC.5.5.99.2), uma enzima dependente de vitamina B₁₂, responsável pela conversão de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA (Figura 2), resultando em acúmulo de ácido metilmalônico (MMA), e de outros metabólitos secundários como propionato, metilcitrato, β-OH-propionato e cetonas de cadeia longas (Fenton et al., 2001).

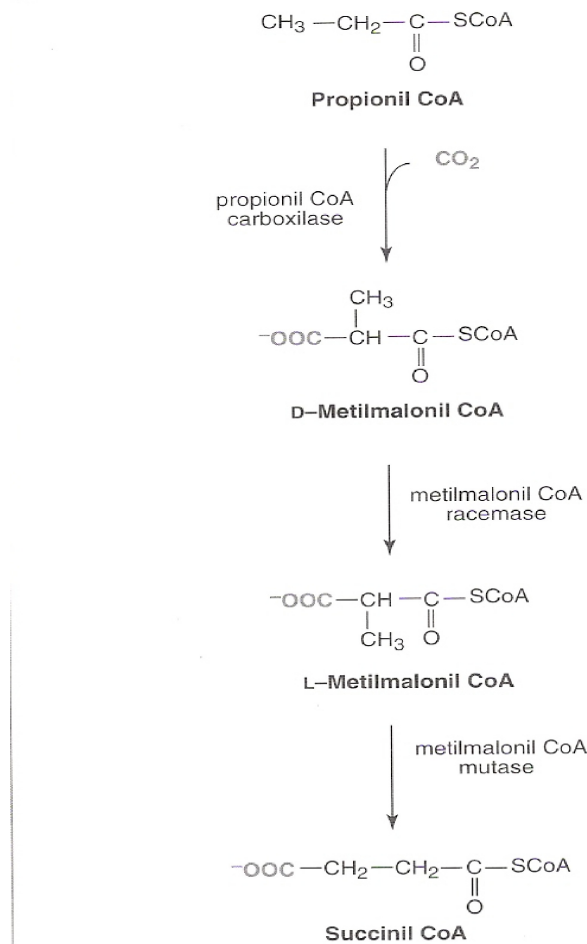


Figura 2. Metabolismo do metilmalonil-CoA. Adaptado de Devlin, 1998.

Os sinais e sintomas da doença variam em gravidade, de acordo com a idade que se instala o distúrbio metabólico. Quando o quadro se instala precocemente (até 21 dias) o paciente geralmente vai a óbito (Fernandes et al., 1990).

O diagnóstico laboratorial da acidemia metilmalônica é realizado através do teste da p-nitroanilina, um resultado positivo indica a possibilidade de acidemia metilmalônica, sendo que o resultado final deve ser confirmado através da cromatografia gasosa preferivelmente acoplada à espectrometria de massa (Carakushanski, 1998).

O quadro laboratorial é caracterizado principalmente por acidose metabólica, hipercetonemia, hiperamonemia, hipoglicemia, hiperglicinemia, neutropenia e trombocitopenia (Fenton & Rosemberg, 1995). Os pacientes que sobrevivem (menos de 15 %) apresentam convulsões, retardo mental e psicomotor, além de alterações comportamentais e neuropsiquiátricas, tais como déficit de atenção, quadros de agressividade e comportamento autista (Hoffmann et al., 1993). O tônus muscular apresenta-se geralmente comprometido, e a hipotonia se acentua após crises de descompensação metabólica (Fernandes et al., 1990).

Os pacientes podem apresentar alterações morfológicas no sistema nervoso central como edema da substância branca nas primeiras semanas, podendo evoluir para um aumento no volume ventricular, desmielização e degeneração dos núcleos da base (Brismar & Ozand, 1994).

Em crianças e adultos normais a excreção diária de MMA é menor que 0,04 mmol, enquanto que crianças com acidemia metilmalônica podem excretar 2,1 a 49 mmol deste metabólito em um período de 24 horas. As concentrações plasmáticas de MMA, que são quase indetectáveis em indivíduos normais, podem estar entre 0,22 a 2,9 mmol em pacientes (Fenton et al., 2001). O nível de MMA no sangue e no

flúido cerebrospinal pode atingir 2,5 a 5 mM durante as crises de descompensação metabólica, e estes níveis podem aumentar ainda mais nas células neuronais (Hoffmann et al., 1993).

Tem-se demonstrado que o acúmulo de MMA inibe competitivamente a SDH e a β -OH-butirato desidrogenase cerebral *in vitro* (Dutra et al., 1993). Wajner et al., em 1992, observaram que este ácido reduz a produção de CO₂ e aumenta a produção de lactato pelo cérebro. O aumento de lactato pode contribuir para o dano cerebral, uma vez que, o acúmulo de ácido láctico e o aumento na pCO₂ tecidual podem provocar acidose grave, levando o pH para valores próximos a 6,0 (Siesjö et al., 1981). A diminuição do pH intracelular é capaz de inibir a recaptação de glutamato pela glia, mesmo havendo níveis normais de ATP e, com isso, contribuir para o dano neuronal excitotóxico (Swanson et al., 1995).

Pacientes com acidemia metilmalônica ou propiônica, em acidose, apresentam uma redução de até 70% da atividade da enzima citocromo oxidase (Hayasaka et al., 1982). Em função destes dados tem sido postulado que o MMA possa causar interferência no metabolismo aeróbico celular, levando provavelmente a uma diminuição na produção de ATP.

A inibição da SDH e conseqüente redução de ATP levam a despolarização parcial por falência de ATPases (Figura 3) que mantém o gradiente de íons através das membranas celulares, principalmente da Na⁺, K⁺-ATPase (Nathanson et al., 1995). A despolarização da membrana leva à saída do Mg⁺², que bloqueia o canal do receptor glutamatérgico subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) de maneira voltagem dependente, e permite a entrada de íons, particularmente Na⁺ e Ca⁺⁺ para meio intracelular (Macdonald & Schoepp, 1993).

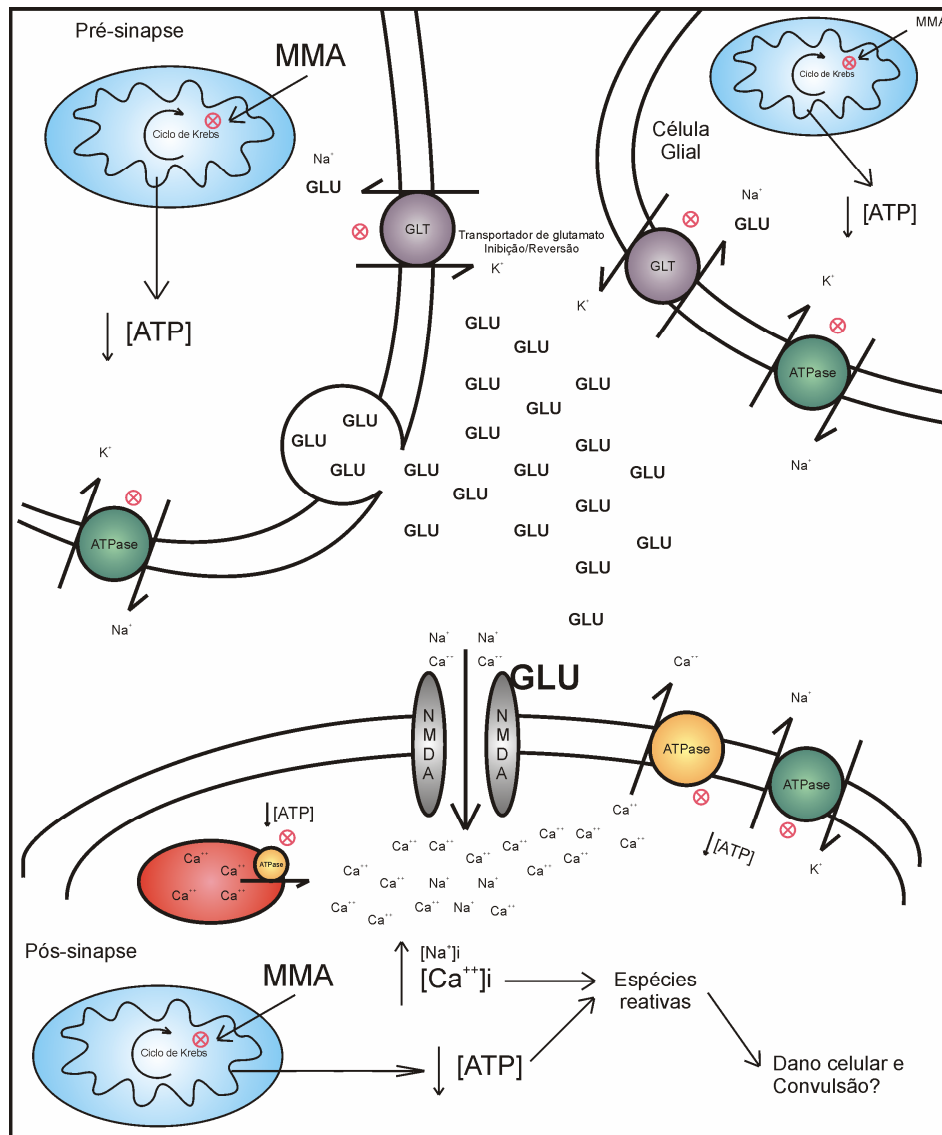


Figura 3 - Prováveis alterações induzidas pela presença de MMA: inibição da SDH neuronal e glial ocasionando diminuição na produção de ATP e conseqüente falência das ATPases, causando despolarização neuronal e alterações nos gradientes iônicos. A despolarização provoca liberação de glutamato armazenado em vesículas sinápticas, e o desaparecimento do gradiente iônico leva a inibição e reversão dos transportadores responsáveis pela recaptção do glutamato a nível neuronal e glial aumentando a concentração de glutamato no compartimento extracelular, que liga-se ao receptor NMDA. A falência energética atinge também a pós-sinapse, causando despolarização e saída do Mg²⁺ que impedia o fluxo de Ca²⁺ e Na⁺ através do canal NMDA, além de inibição da Ca²⁺-ATPases do retículo endoplasmático, levando a um aumento na concentração intracelular de Ca²⁺, que ativa proteases, fosfolipases, endonucleases, proteínas quinases e formação de radicais livres, provavelmente envolvidos na propagação do foco de despolarização, na gênese da convulsão e talvez no dano celular.

O aumento na concentração celular de Ca^{++} leva à ativação de enzimas dependentes deste íon envolvidas no fenômeno de neurotoxicidade, incluindo calpaína (Brorson et al., 1995), fosfolipase C (Umemura et al., 1992), proteína quinase C (Rothman, 1992; Pavlakovic et al., 1995), calcineurina (Armstrong, 1989; Snyder & Sabatini, 1995) e a óxido nítrico sintetase, que produz NO^* (Snyder e Bredt, 1992). O NO^* parece interagir com radicais superóxido e formar peroxinitrito, que pode difundir-se para o meio intra ou extracelular e então promover a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Beckman et al., 1990; Almeida et al., 1998).

Além destes mecanismos de lesão celular envolvendo a despolarização da membrana pós-sináptica, a diminuição dos níveis de ATP leva ao aumento na liberação de glutamato através de mecanismos dependente de cálcio e pela inibição e/ou reversão de mecanismos de recaptção deste aminoácido excitatório na pré-sinápse (Madl & Burgesser, 1993). Ativando assim, os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA e AMPA/Kainato.

Vários inibidores metabólicos são capazes de induzir lesão celular por mecanismos glutamatérgico, particularmente via ativação do receptor subtipo NMDA. Entre eles pode-se citar a rotenona, cianeto, oxiaminoacetato, 3-nitropropionato e malonato; estes últimos inibidores da SDH, como o MMA (McDonald & Shoepf, 1993; Brouillet et al., 1994; Zeevalk et al., 1995; Behrens et al., 1995; Pavlakovic et al., 1995).

Na acidemia metilmalônica pode-se destacar a ação do ácido metilmalônico na inibição da atividade da creatina quinase total e mitocondrial em córtex cerebral de ratos com 30 dias de idade e a prevenção deste efeito pela glutathione reduzida (Schuck et al., 2004). A glutathione também preveni totalmente a ação inibitória do MMA sobre a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em membrana plasmáticas sinápticas de

córtex cerebral de ratos tratados aguda e cronicamente, o que permite a conclusão de que grupos tiol ou outra demanda oxidativa pode ser responsável pelos efeitos desencadeados pelo MMA (Wyse et al., 2000).

A administração de MMA intraestriatal causa convulsões e rotações contralaterais em ratos adultos, que são inibidas por MK-801 e atenuadas por succinato, sugerindo o envolvimento de receptores NMDA, e provavelmente da inibição da SDH nas convulsões induzidas por MMA (Mello et al., 1996). Estas convulsões são atenuadas pela administração de antioxidantes como a vitamina C e a vitamina E (Fighera et al., 1999, 2003). Também foi demonstrado que o MMA induz a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico *in vitro* e reduz a capacidade antioxidante total do sistema nervoso, confirmando que a presença de MMA induz a formação de radicais livres (Fontella et al., 2000), além de alterar a atividade da Na⁺, K⁺-ATPases em estriado e córtex cerebral de ratos (Mafaliti et al., 2000).

O dano celular oxidativo, que ocorre pela formação de radicais livres, parece estar relacionado à patogênese de diferentes doenças neurodegenerativas, incluindo esclerose lateral amiotrófica (Plaitakis & Constantakakis, 1993), mal de Parkinson (Jenner, 1994; McNaught et al., 1995), doença de Alzheimer (Jenner, 1994; Harris et al., 1995), Coreia de Huntington (Jenner, 1994; Lipton & Rosemberg, 1994; Ludolph et al., 1993; Burns, 1995), bem como em um considerável número de EIM, incluindo as acidemias orgânicas glutárica, propiônica e metilmalônica (Fighera et al., 1999, Wajner et al., 2004, Cechini et al., 2003).

Entre as evidências que mostram o envolvimento de espécies reativas em doenças neurodegenerativas estão o aumento dos parâmetros do estresse oxidativo no cérebro, incluindo níveis aumentados de ácido malondialdeído (MDA), 4-

hidroxinonenal (HME) e a oxidação protéica de grupos carbonil e 3-nitrotirosina, assim como concentrações reduzidas de antioxidantes não enzimáticos GSH e ascorbato, e das enzimas antioxidantes CAT e Glutathione peroxidase (GSH-PX) (Jenner e Olanow, 1996; Perry et al., 1982).

2.2.1. Tratamento da acidemia metilmalônica

O tratamento dos pacientes portadores de acidemia metilmalônica inclui medidas terapêuticas como: a) remoção de toxinas através de transfusões de sangue ou hemodiálises; b) restrição protéica (dieta isenta de aminoácidos valina, isoleucina, leucina, metionina e treonina); c) terapia com vitamina B₁₂, nas acidemias metilmalônicas por deficiência de cofator (Orgier de Baurny e Saudubray, 2002); d) administração de L-carnitina, propiciando a excreção urinária de propionil-carnitina, e redução da toxicidade do propionato (Burns et al. 1996); e) administração de metronidazol para reduzir os níveis de propionato (Leonard et al., 2001); f) administração de ascorbato para diminuir os efeitos da deficiência de glutathione (Treacy et al., 1996).

Recentemente, estudos utilizando células neuronais em cultura, demonstraram que o uso de drogas que ativam os canais de K⁺, como o diazóxido, é capaz de proteger tecidos isquêmicos, prevenir lesões celulares e teciduais provocadas por ácido metilmalônico (Kowaltowsk et al., 2006).

2.3. Succinato Desidrogenase

2.3.1. Estrutura

A succinato desidrogenase (SDH) está localizada na membrana mitocondrial interna, e sua estrutura é composta por quatro sub-unidades SDH A, B, C e D (Figura 4), sendo as sub-unidades A e B, hidrofílicas enquanto que as sub-unidades C e D são hidrofóbicas. A sub-unidade A, uma proteína de 70 kDa e 621 aminoácidos, é onde a flavoproteína (FAD) esta ancorada e onde se localiza o sítio de ligação do substrato, o succinato. Também é o local de ligação do oxalacetato, um importante inibidor e regulador da atividade da SDH (Yankovskaya et al., 2003; Cechini et al., 2003). A sub-unidade B, tem 27 Kda e 280 aminoácidos, contém três “clusters” de ferro-enxofre: [2Fe-2S], [4Fe-4S], e [3Fe-4S]. Já as sub-unidades C e D são proteínas ancoradas na membrana com 15 e 13 Kda, respectivamente, e contém uma porção proteica heme b que se liga a ubiquinona (Yankovskaya et al., 2003; Cechini et al., 2003; Brièri et al, 2005).

Estudos têm mostrado que o potencial redox do FAD/FADH₂ está significativamente aumentado quando o FAD/FADH₂ liga-se a flavoproteína, sugerindo que o alto potencial redox do FAD/FADH₂ é um pré-requisito importante para oxidação do succinato (Efimov et al., 2001).

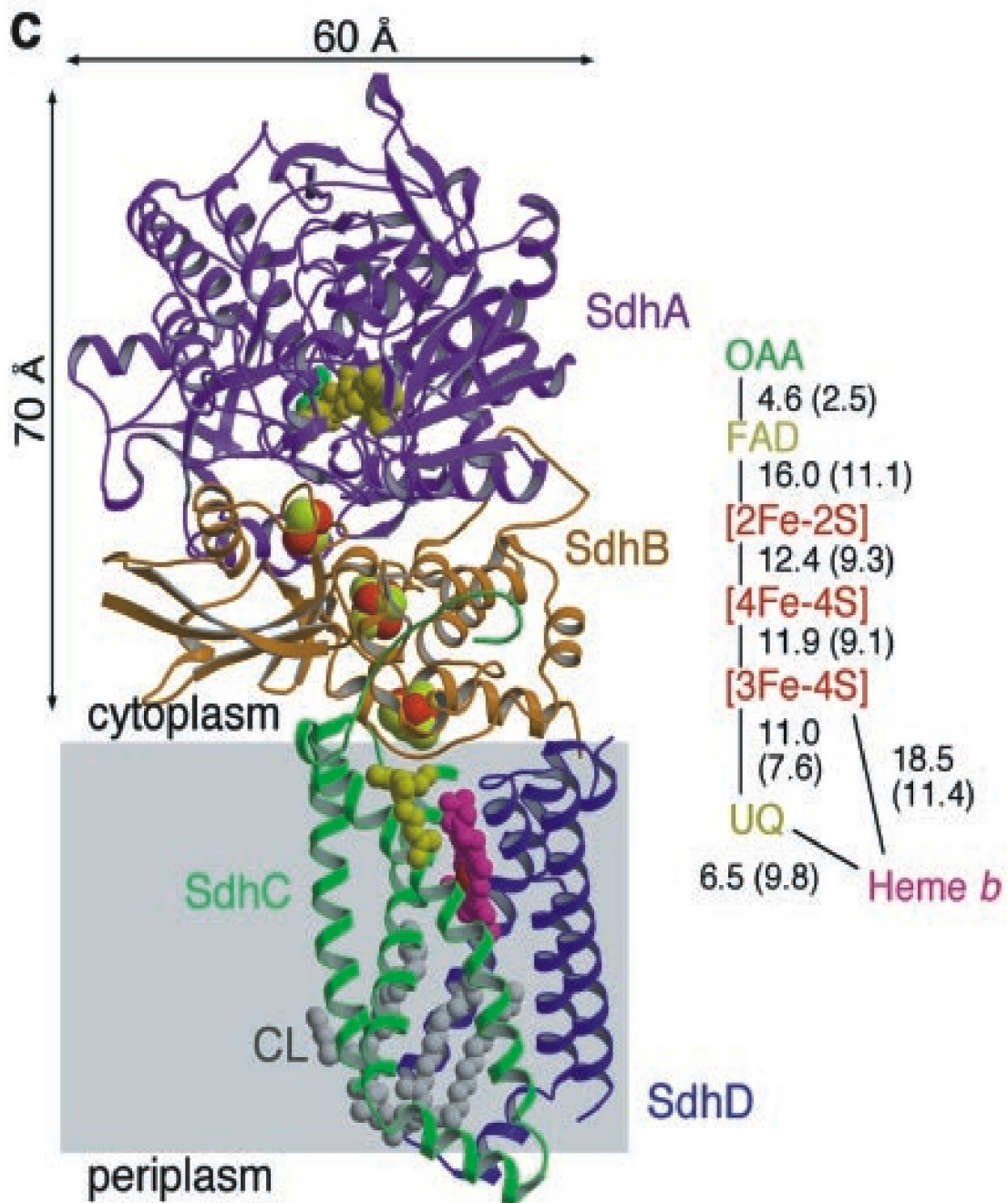


Figura 4. Estrutura da SDH de *E. coli*, sub-unidades SDH A, B, C e D, são mostradas em cor púrpura, laranja, verde e azul, respectivamente. O FAD é mostrado em ouro e o OAA em verde. Heme *b* em magenta e a ubiquinona em amarelo. Os átomos de Fe e S, pertencente aos “clusters” de Fe-S, em vermelho e amarelo, respectivamente. Ao lado, em parênteses as distâncias entre os centros redox.

Fonte: Yankovskaya et al. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, v. 299, p. 700-704, 2003.

Uma vez que ocorre a oxidação do succinato e a transferência de elétrons para a sub-unidade A, estes passam seqüencialmente pelos “clusters” de ferro-enxofre, e têm-se sugerido, que para que ocorra a redução até a ubiquinona é necessário que o “cluster” [3Fe-4S] encontre-se intacto. Os elétrons podem passar para a porção protéica heme b, e então, serem entregues a ubiquinona, ou ainda, passarem diretamente dos “clusters” de ferro-enxofre para a ubiquinona. Esta possui potencial redox mais alto do que o heme b (Tabela 2), e tem a preferência pelos elétrons. Portanto, o heme b não é essencial para redução da ubiquinona, sendo sua importância fisiológica discutível (Cechini et al., 2003).

Tabela 2. Potencial de redução dos centros redox da SQR da *E. coli*

Centro redox	Potencial redox (mV)
FAD	- 79
[2Fe-2S]	+ 10
[4Fe-4S]	- 175
[3Fe-4S]	+ 65
Heme b	+ 36
Ubiquinona	+ 90

Fonte: Cecchini G. **Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain.** Ann. Rev. Biochem, 72:77-109, 2003.

As mutações dos genes da SDH podem se manifestar numa variedade de fenótipos clínicos, entre eles atrofia óptica, formação de tumores, miopatia e encefalopatia (Rustin e Rötig, 2002). Mutações da SDH A tem sido associados à síndrome de Leigh (Bourgeron et al., 1995). Mutação causada pela substituição da porção ARG544 por um resíduo de triptofano, implica em uma baixa atividade da SDH. Mutações nas sub-unidades SDH B, SDH C e SDH D causam um fenótipo clínico diferente que as mutações da SDH A (Baysal et al., 2001). Mutações na proteína ferro-enxofre e no citocromo b estão associados à síndrome do

paraganglioma familiar e ao feocromocitoma (Baysal et al., 2001; Rustin e Rötig, 2002). O feocromocitoma é causado pela mutação na sub-unidade SDH B, onde ocorre a substituição da porção PRO197 por arginina (Astuti et al., 2001). Mutações na sub-unidade SDH C, leva ao paraganglioma, uma condição hereditária autossômica dominante. Tendo sido sugerido também que mutações na sub-unidade SDH C causam hipersensibilidade para o oxigênio e desenvolvem envelhecimento celular prematuro, tendo sido sugerido que essa desordem pode ser a causa do estresse oxidativo produzido pela inibição do complexo II (Senoo-Matsuda et al., 2001; Ishii et al., 1998).

Mutações da SDH D estão relacionadas com um grande número de doenças do complexo II. Por exemplo, as mutações na porção His102Leu que contribuem para o paraganglioma hereditário, baixando o potencial redox do heme b para 100 mV, deixando a enzima menos estável. Outros exemplos são as mutações nas porções Arg70, Pro81, Asp92, Leu95, na segunda hélice transmembrana, que rompem o heme, afetando o potencial redox do heme b e a estabilidade do complexo enzimático (Maklashima et al., 2001).

2.3.2. Atividade da SDH

A SDH, EC. 1.3.99.1, é uma enzima participante do ciclo do ácido cítrico e desempenha importante função nos mecanismos de transporte de elétrons e produção de energia. Nas células aeróbicas a SDH catalisa a oxidação do succinato a fumarato (Figura 5) transferindo elétrons para ubiquinona (complexo II).

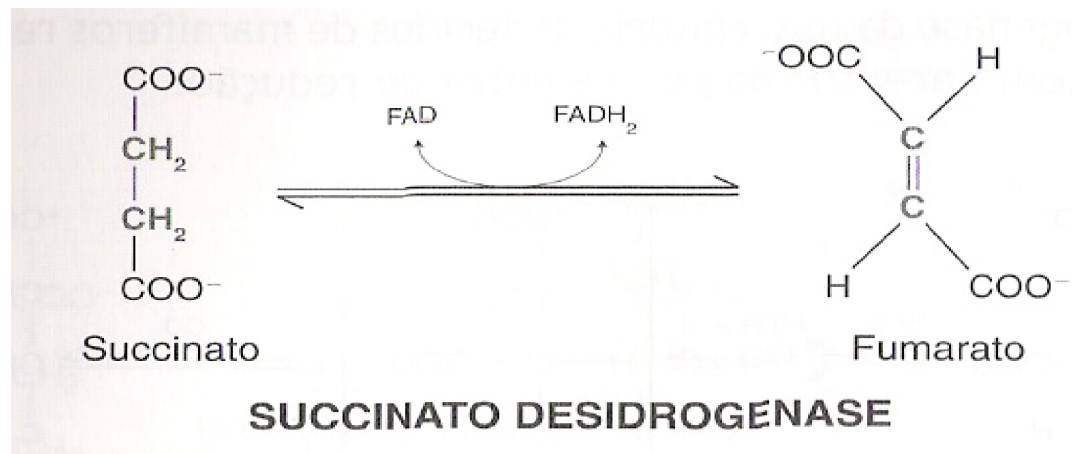


Figura 5. Interconversão de succinato à fumarato

A atividade e inibição da SDH têm sido objeto de estudo de muitos autores há vários anos. Gutman e Silman (1975) demonstraram que a atividade da SDH depende de um equilíbrio entre quatro formas estáveis da enzima: forma ligada ao Oxalacetato (OAA), oxidada ou reduzida, ambas não ativas; e forma livre de OAA, oxidada ou reduzida, estas ativas. A concentração da forma ativa da enzima depende do balanço do potencial redox e da concentração da forma livre de OAA, que atua como um regulador da atividade da SDH.

Várias outras moléculas interferem na atividade do complexo II da cadeia respiratória. Entre as moléculas ativadoras da SDH podemos destacar: a) o succinato, substrato da SDH; b) componentes fisiológicos ligados a CoQH₂, ATP e ITP; c) certos ânions, como o Br⁻ (Kearney et al., 1974). Entre os inibidores competitivos citamos: D- e L-malato (Gutman et al., 1975; Kearney et al., 1974);

malonato (Fleck et al., 2004) e metilmalonato (Brusque et al., 2002), e o inibidor irreversível 3-NPA.

Além das condições do ensaio, a técnica usada contribui ou não para demonstrar a atividade da SDH, ou inibição, por determinados componentes. Uma técnica muito usada é a da redução do diclorofenol-indofenol (DCIP), em que na maioria das vezes contém no meio de incubação fenazina metassulfato (PMS), que tem como papel facilitar a captação dos elétrons pelo DCIP, e conseqüentemente sua redução. Outra técnica é a que utiliza sais de tetrazólio, 2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazólio (INT), como aceptor final de elétrons, que uma vez reduzido produz cor (Green e Narahara, 1980). Esta técnica, por ter a vantagem de não usar intermediários como a PMS foi a técnica de escolha para este estudo.

Em recente estudo, usando tecidos de ratos jovens, Petenuzzo e colaboradores (2006) demonstraram que a atividade da SDH e sua inibição por MMA sofrem variações em função do tecido estudado, bem como da concentração de substrato (succinato) no meio. A SDH apresentou maior atividade no rim e no coração quando comparado ao estriado, hipocampo e fígado. A inibição da SDH por MMA na concentração de 2,5 mM, ocorreu apenas no estriado e no hipocampo, e somente em baixas concentrações de succinato (0,5 – 1,0 mM). Tal perfil de inibição é característico de um mecanismo inibitório competitivo. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que também mostraram que o MMA inibe significativamente o complexo II em estruturas cerebrais (Marisco et al., 2003; Fleck et al., 2004; Brusque et al., 2002; McLaughlin et al., 1998; Wajner et al., 1992; Toyoshima et al., 1995; Dutra et al., 1993). Desta forma, sugere-se que o efeito inibitório do MMA sobre o complexo II é seletivo para as estruturas cerebrais.

Em seus estudos, Kolker e colaboradores (2003), mostram que em partículas submitocondriais de coração bovino e fibroblastos de camundongo, o complexo II não é inibido pelo MMA, o que está parcialmente de acordo com dados de Petenuzzo et al (2006), que também não encontrou inibição da SDH em coração de os. Porém Kolker e colaboradores (2003) equivocaram-se ao concluir, baseados em seus estudos, que o MMA não exerce efeito neurotóxico.

Recentemente, tem sido mostrada a influência do estresse oxidativo e a presença conseqüente de ROS em diversas doenças neurológicas, inclusive na acidemia metilmalônica (Wajer et al., 2004). De fato, há evidências de que espécies reativas alteram a atividade de diversas enzimas, principalmente as possuidoras de grupos ferro-enxofre, como a SDH (Liochev, 1996).

Em 1967, Willianson preconizou que durante o processo de fracionamento e isolamento das frações mitocondriais ocorria a alteração na razão $NAD^+/NADH$, alterando o estado redox do meio tecidual. A alteração da razão $NAD^+/NADH$, modifica a proporção de substratos oxidantes e redutores, e conseqüentemente a atividade de diversas enzimas.

Tem sido relatado que crianças com acidemia metilmalônica, não raramente, apresentam episódios de febre, infecção e muitas vezes um quadro septicêmico antes de desenvolver uma crise metabólica. Estes episódios desencadeiam a formação de substâncias reativas, sugerindo que o estresse oxidativo pré-dispõe a crise metabólica. A crise metabólica, por sua vez, gera a formação de mais substâncias reativas, tornando-se um episódio cíclico de agressão celular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Investigar a influência da redução do meio reacional sobre a atividade da SDH.

3.2 Objetivos Específicos

- Comprovar a inibição de SDH por MMA, em córtex cerebral de ratos;
- Verificar se a atividade da SDH é influenciada por adição de agente redutor (160 μM $\beta\text{-NADH}$) ao meio reacional;
- Verificar se a inibição da SDH por MMA é alterada pela presença de 160 μM $\beta\text{-NADH}$;
- Verificar se os parâmetros cinéticos da atividade da SDH sofrem alterações na presença de $\beta\text{-NADH}$ no meio reacional, através da determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$;
- Verificar a influência da presença de $\beta\text{-NADH}$ no meio reacional sobre a inibição da SDH por MMA, através da determinação do K_i ;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Para a realização do presente estudo foram utilizados os seguintes reagentes:

Ácido clorídrico – Vetec

Ácido etilenodiamino tetracético – sal de potássio – Reagen

Ácido fosfórico – Synth

Ácido succínico – Sigma

Ácido sulfúrico – Synth

Albumina bovina – Sigma

Azida sódica – Merck

Azul de Coomassie - Sigma

β -NAD⁺ – Sigma

β -NADH – Sigma

Cianeto de potássio – Merck

Cloreto de magnésio – Reagen

Cloreto de sódio – Ecibra

Etanol – Synth

Fosfato de potássio dibásico – Synth

Fosfato de potássio monobásico – Synth

Glicose – Merck

Hidróxido de potássio – Merck

Hidróxido de sódio – Merck

Sacarose – Vetec

Trizma base – Sigma

Violeta de p-iodonitrotetrazolio – Sigma

4.2. Equipamentos

Agitador de tubos – marca Phoenix AP56

Agitador magnético – marca IKR – Combimag – RCT

Balança analítica – marca Gilbertini

Banho-maria – marca

Centrífuga BE 5100 – marca Bio Eng

Centrífuga refrigerada – marca Eppendorf

Cronômetros – marca Casio

Espectrofotômetro – marca Hitachi U-2001

Fita indicadora de pH – marca Merck

Freezer a – 20 °C – marca Cònsul

Geladeira a 4 °C – marca Cònsul

Guilhotina

Material cirúrgico (tesoura, bisturi, espátula)

pHmetro – marca Quimis

Pipetas automáticas marca Labsystems de volume variável

Purificador de água

4.3. Preparo das soluções

4.3.1 Tampão de Homogeneização

O tampão de homogeneização, contendo Trizma-HCl (10 mM), Sacarose (320 mM) e EDTA-K⁺ (0,5 mM), foi preparado em água ultrafiltrada tipo 1. O pH 7,4 foi alcançado com o uso de HCl.

4.3.2 Tampão Salina-Sacarose

O tampão de salina-sacarose: glicose (20 mM), sacarose (270 mM), cloreto de magnésio (5 mM) e cloreto de sódio (0,9%), foi solubilizado em solução tampão fosfato de potássio (270 mM), pH final 7,2. Para seu preparo foi utilizado água tipo I.

4.3.3 Tampão Fosfato de Potássio

O meio reacional foi estabilizado com tampão fosfato de potássio (50 mM), pH 7,4. Sendo o sal solubilizado em água tipo I.

4.3.4 Solução Azida Sódica

A azida sódica (10 mM) foi solubilizada em água do tipo I.

4.3.5 Solução de Cianeto de Potássio

O Cianeto de potássio (1 mM) foi solubilizado em água do tipo I.

4.3.6. Solução *p*-iodonitrotetrazólio

O *p*-iodonitrotetrazólio (0,8 mM) foi solubilizado em água ultrapurificada do tipo 1.

4.3.7 Solução MMA

O MMA (2,5 - 10 mM) foi solubilizado em água tipo I, sendo o pH 7,4 alcançado com adição de solução de KOH.

4.3.8 Solução Succinato

O succinato de sódio (1,0 mM) foi solubilizado em água tipo I.

4.3.9 Solução β -NADH

O β -NADH (160-800 mM) foi solubilizado em tampão fosfato de potássio (0,1 M), pH 7,4.

4.3.10. Reagente de Coomassie

O reagente de Coomassie contém: 25 mg azul de Coomassie, 12,5 ml de etanol, 25 ml de ácido fosfórico (85%) e água q.s.p. 250 ml.

4.4. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 270-300 g fornecidos pelo Biotério Central da UFSM, mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro entre 7 e 19h), em temperatura de 22°C, com alimento e água “*ad libitum*”.

4.5. Preparação da fração enriquecida em mitocôndrias

Os animais foram mortos por decapitação e o cérebro rapidamente dissecado em uma placa de Petri invertida sobre gelo. O córtex foi cuidadosamente retirado e o restante do cérebro descartado. O córtex foi homogeneizado em 10 volumes (p/v) de tampão de homogeneização. O homogeneizado foi centrifugado a temperatura de 4 °C, a 3.000 rpm (1.000 x *g*) por 10 minutos e o sobrenadante obtido centrifugado a 10.000 rpm (12.000 x *g*) por 20 minutos. O precipitado resultante foi ressuspendido em solução salina-sacarose, na proporção de 60% do seu volume e congelado por 24 horas para promover a liberação do conteúdo enzimático. O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford (1976) e ajustado para 1 mg/mL com

solução salina-sacarose. Esta preparação foi utilizada para a determinação da atividade da SDH.

4.6 Determinação da atividade da succinato desidrogenase

A atividade enzimática da succinato desidrogenase foi determinada pelo método de Green e Narahara (1980) modificado, utilizando o cloreto de 2-[4-iodofenil]-3-[4nitrofenil]-5-feniltetrazólio (INT) como acceptor de elétrons em um meio de incubação contendo tampão fosfato 50 mM (pH 7,4), azida sódica (10 mM), solução de INT 0,8 mM, succinato de sódio 1,0 mM (pH 7,2) e ácido metilmalônico (0 - 10 mM) pH 7,4.

A reação foi iniciada com a adição de 25 µl da suspensão do enriquecido de mitocôndrias. Após 15 minutos de incubação a 37°C, a reação foi parada pela adição de 1,5 mL de álcool etílico. Os tubos foram agitados e colocados em banho de gelo por 10 minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 800 g a temperatura ambiente. A absorbância de 1 mL do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 458 nm, que corresponde à redução do INT.

Para a determinação da atividade da SDH, foi realizado a padronização da técnica, sendo os parâmetros concentração de enzima (proteína), concentração de substrato, tempo de ensaio e demais procedimentos utilizados, considerados ideais.

4.7. Influência do estado redox sobre a atividade da SDH e a inibição por MMA.

A influência do estado redox foi avaliada incubando o preparado mitocondrial com diferentes concentrações de β -NADH (0, 160, 320, 480, 800 μ M), por 20 minutos a 37 °C. Imediatamente após a incubação, alíquotas do preparado mitocondrial pré-incubada com β -NADH foram adicionadas no meio reacional, contendo o MMA, na proporção de 1 mM de succinato/5 mM de MMA, iniciando a reação.

A concentração de β -NADH foi escolhida a partir de uma curva de concentração, onde foi determinado que a concentração de 160 μ M de β -NADH não apresentava efeito *per se*.

4.8. Análise estatística

Os dados foram avaliados por análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), dependendo do desenho experimental utilizado. O teste de comparação múltipla utilizado foi o teste de Tukey.

5. RESULTADOS

5.1 Determinação do efeito do MMA sobre a atividade da SDH

A atividade da SDH em enriquecido mitocondrial de córtex de ratos foi determinada na presença de MMA (0; 2,5; 5,0 e 10 mM), e 1,0 mM de succinato. A análise estatística mostrou que o MMA inibiu a atividade da SDH [$F(3,12)=12.06$, $p=0.001$], de maneira dose-dependente ($r=0.98$). As diferenças entre as médias dos vários grupos foram analisadas por ANOVA seguida pelo teste Tukey (Figura 6).

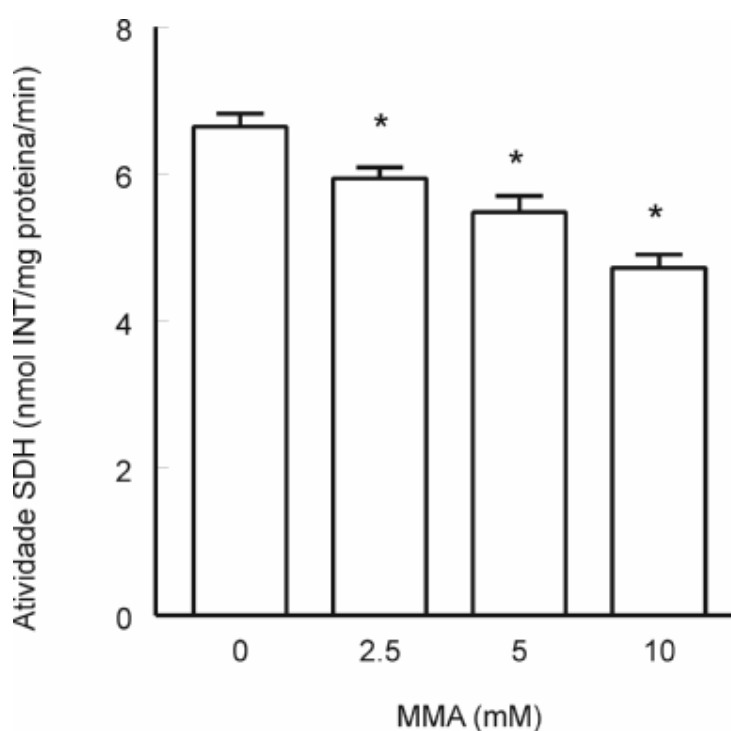


Fig. 6. Efeito do ácido metilmalônico sobre a atividade da succinato desidrogenase em córtex cerebral de ratos. Valores representam a média \pm E.P. de $n=4$ experimentos realizados em triplicata. A atividade da SDH foi medida na presença e ausência de MMA. *Indica diferença significativa em relação ao grupo controle, $P = <0.05$, "pos-hoc" teste de Tukey.

5.2 Determinação da concentração de β -NADH sem efeito sobre o meio reacional

Na Figura 7 pode-se observar o efeito da pré-incubação com β -NADH (160-800 μ M), sobre a atividade da SDH. A concentração escolhida, a qual não apresentou efeito *per se*, foi de 160 μ M de β -NADH [F(4,13)=5,319, $p=0,009$]. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram analisadas por ANOVA seguidas pelo teste Tukey.

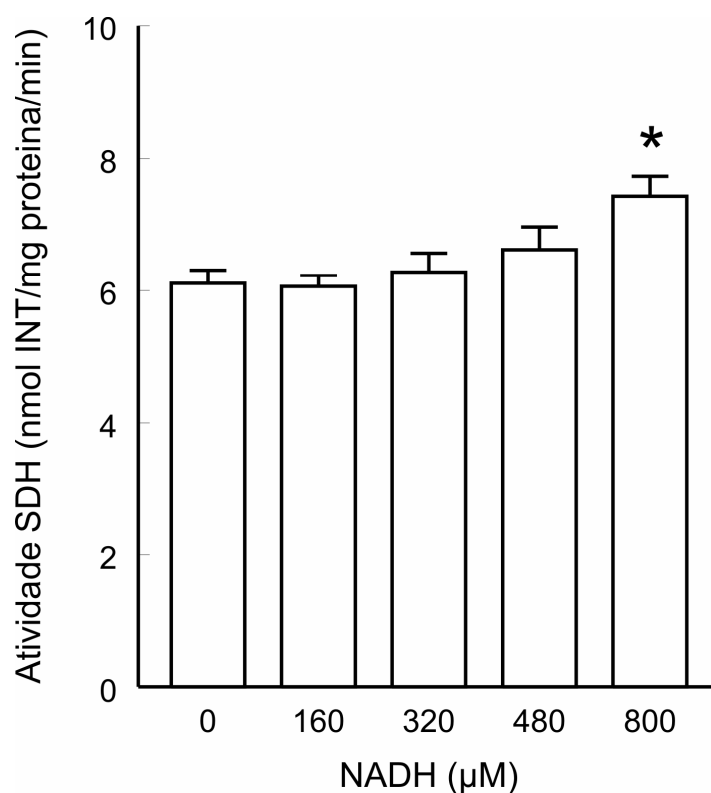


Fig. 7. Efeito da pré-incubação do β -NADH sobre a atividade da SDH em córtex cerebral de ratos. Dados representam a média \pm E.P. de $n=4$ experimentos (animais) realizados em triplicata. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle incubado sem β -NADH, post-hoc teste de Tukey.

5.3 Efeito da pré-incubação de β -NADH sobre a inibição da SDH por MMA

Após a escolha da concentração de β -NADH sem efeito *per se*, verificou-se o efeito da pré-incubação com (160 μ M de β -NADH) sobre a inibição da SDH por MMA. A análise estatística (ANOVA com medidas repetidas) mostrou que a pré-incubação de 160 μ M de β -NADH protegeu a SDH da inibição por 5,0 mM de MMA [interação significativa: pré-incubação (ausência ou presença de 160 μ M β -NADH) x inibidor (ausência ou presença de 5 mM de MMA) $F(3,20)=9,42, p=0,028$] (Figura 8).

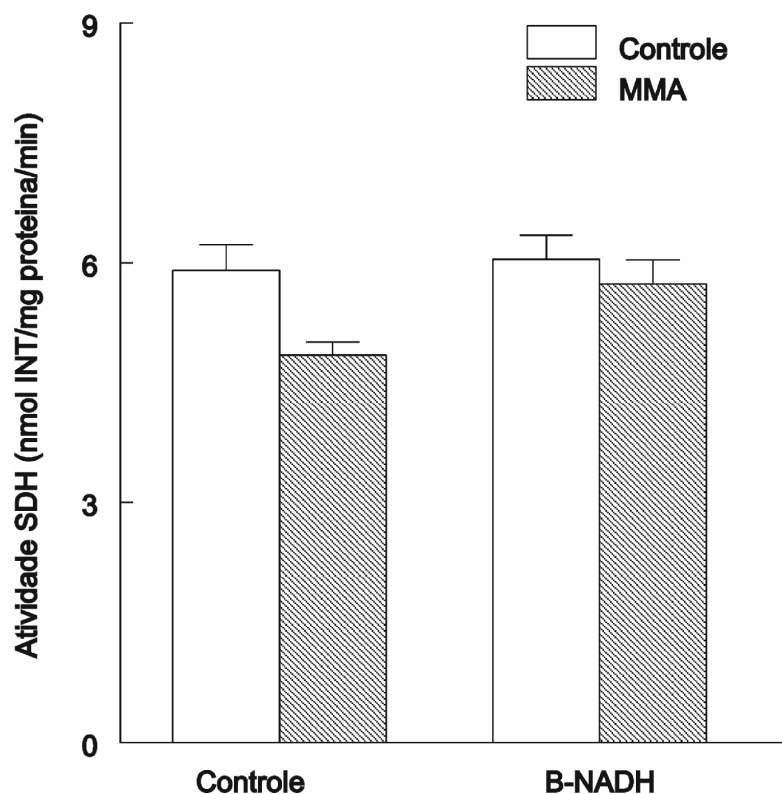


Fig. 8. Efeito da pré-incubação com 160 μ M de β -NADH sobre a atividade da SDH e sua inibição por 5 mM de MMA. Os dados representam a média \pm E.P. de $n = 6$, experimentos realizados em triplicata * $P < 0,05$ comparando o grupo controle com os outros grupos (Controle- β -NADH e β -NADH-MMA), ANOVA (para medidas repetidas).

5.4. Estudo dos parâmetros cinéticos da reação entre SDH e MMA na ausência e presença de β -NADH

5.4.1. Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da SDH pré incubada ou não com β -NADH

Tendo sido observado que a pré incubação de enzima com 160 μ M de β -NADH protege a enzima da inibição pelo MMA, determinamos os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) da enzima pré-incubada com e sem β -NADH.

Na determinação do K_m foram utilizadas as seguintes concentrações de succinato: 0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 e 2,0 mM. Os resultados foram obtidos com a média de três diferentes ensaios, todos em triplicata.

O gráfico do duplo recíproco, Lineweaver-Burke (Figura 9), foi utilizado para estimar o K_m e a $V_{m\acute{a}x}$ da reação. Sendo que a K_m para SDH do córtex de ratos, incubada com 160 μ M de β -NADH foi de 0,216 nmol INT, diferente da K_m da enzima incubada sem β -NADH, $K_m = 0,272$ INT, [T(2)=10,375; $p=0,009$]. A $V_{m\acute{a}x} = 4,72 \pm 0,28 \times 10^{-8}$ mol INT/ mg proteína/minuto, foi igual em ambos os tratamentos [T(2)=-1,0; $p=0,423$].

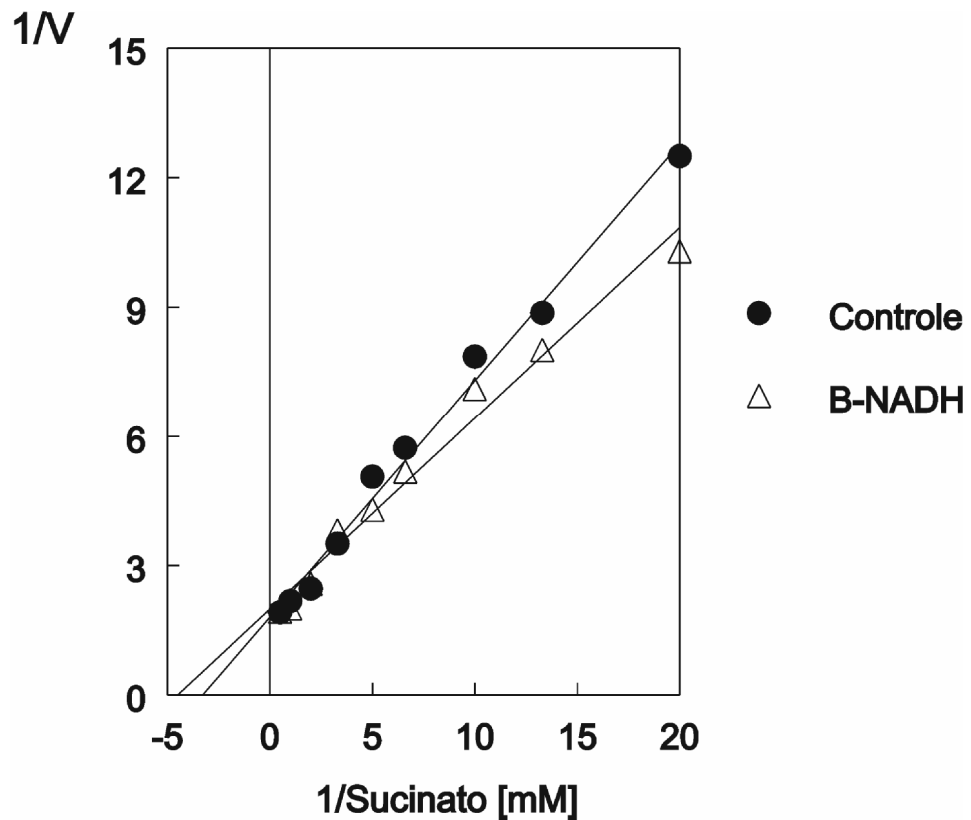


Fig. 9. Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da SDH de córtex cerebral de ratos, pré-incubada na ausência e presença de $160 \mu\text{M}$ de $\beta\text{-NADH}$. Representação gráfica de Lineweaver-Burk. Grupo controle (ausência de $\beta\text{-NADH}$): $K_m = 0,272 \text{ nmol INT}$, grupo pré-incubado com $\beta\text{-NADH}$, $K_m = 0,216 \text{ nmol INT}$. $V_{m\acute{a}x} = 4,72 \pm 0,28 \times 10^{-8} \text{ INT/mg/min}$. Figura gráfica representativa de um experimento isolado.

5.4.2. Determinação da constante de inibição (K_i) do MMA para a SDH pré-incubada com ou sem β -NADH

Para esclarecer ausência de inibição da SDH pré-incubada com β -NADH, determinamos o K_i do MMA para a SDH em ambas as situações, pré-incubada na ausência e/ou presença de 160 μ M de β -NADH. Para isso, foi realizada uma curva de substrato (0,05; 0,075; 0,1; 0,133; 0,2 e 1 mM) na presença das seguintes concentrações do ácido: 0, 1, 3, 6 e 10 mM. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Conforme a representação gráfica $K_{m,ap}$ vs [MMA], para a enzima pré-incubada com β -NADH o K_i foi calculado como sendo 20,05 mM, diferentemente da enzima pré-incubada sem β -NADH, que apresentou um $K_i=11,60$ mM; [T(2)=20,05; $p=0,003$] (Figura 10). Valores semelhantes aos valores de K_i obtidos através do cálculo pelo método gráfico de Dixon (Dixon e Webb, 1964), (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de k_i obtidos através de diferentes gráficos

Gráfico	K_i (enzima sem NADH)	K_i (enzima com NADH)
1/V vs [MMA] - Dixon	12,20 mM	23,88 mM
$K_{m,ap}$ vs [MMA]	11,60 mM	20,05 mM

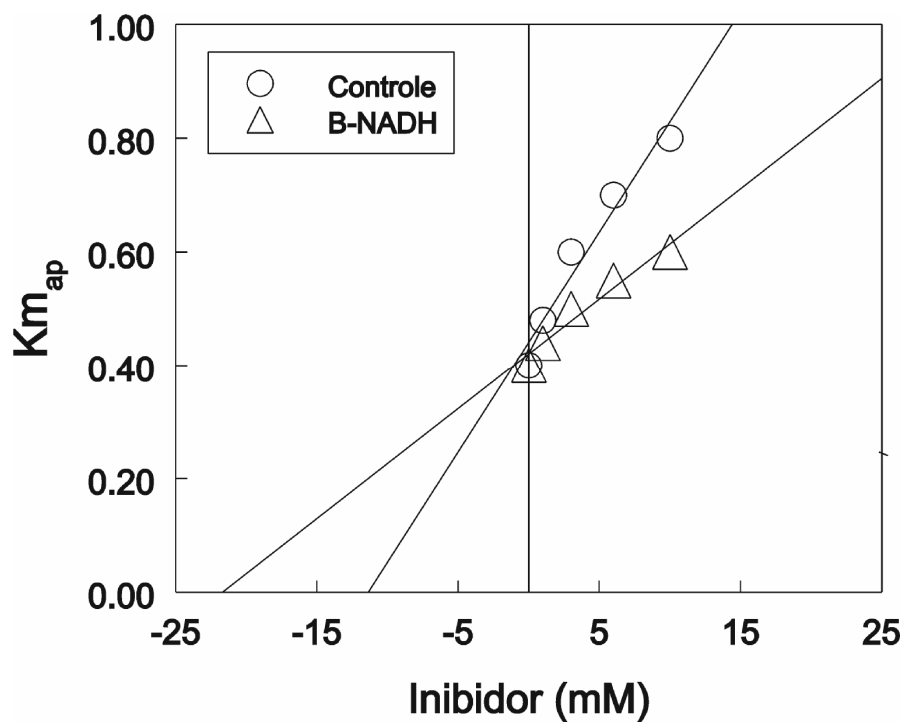


Fig. 10. Determinação do K_i : análise do plot $K_{m_{ap}}$ vs [MMA], o intercepto do eixo do x representa $-K_i$. Para o grupo controle, enzima pré-incubada sem β -NADH, $K_i = 11,60$ mM, enquanto que para a enzima pré-incubada com β -NADH, $K_i = 20,05$ mM. Figura gráfica representativa de um experimento isolado.

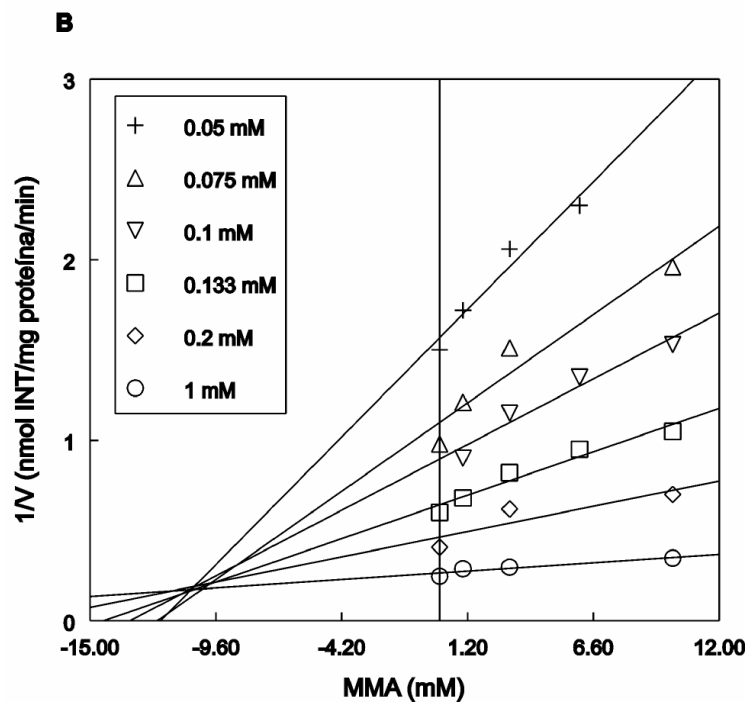
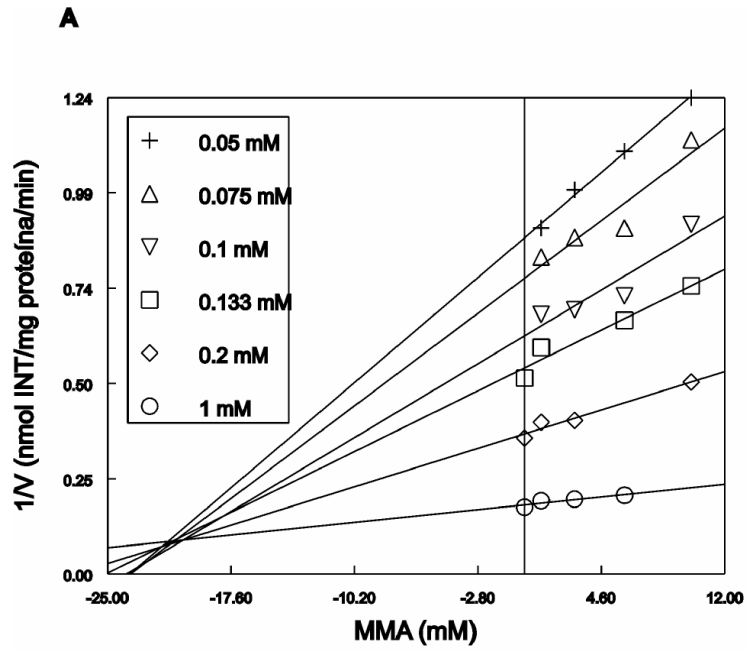


Fig. 11– Determinação do K_i do MMA para SDH pré incubado na presença de β -NADH (A) e na ausência de β -NADH (B) – Segundo método gráfico de Dixon. Figuras representativas de um experimento isolado.

6. DISCUSSÃO

O efeito de análogos do succinato, como o malonato e o metilmalonato, sobre a atividade da SDH vem sendo investigado por muitos autores há vários anos. Tem sido mostrado que o MMA inibe competitivamente a SDH de várias estruturas cerebrais como: hipocampo, estriado e córtex cerebral. Contudo, um grupo, de forma isolada, descreveu que o MMA não inibe diretamente a SDH em frações submitocondriais de coração (Kolker et al., 2003). Os mesmos autores, neste mesmo estudo, sugeriram que o MMA não inibia a succinato desidrogenase de fibroblastos de camundongo, em um experimento com um “n” reduzido, que beirou a significância estatística. A principal conclusão do estudo de Kolker et al (2003) é que o MMA não inibe a SDH de coração bovino e, por esta razão, não seria neurotóxico.

Os dados apresentados no presente estudo reforçam os estudos prévios que mostraram que o MMA inibe a SDH competitivamente em enriquecido mitocondrial de córtex de ratos (Figura 6), confirmando os resultados descritos por Marisco et al., (2003); Fleck et al., (2004); Brusque et al., (2002); McLaughlin et al., (1998); Wajner et al., (1992); Toyoshima et al., (1995); Dutra et al., (1993); Petenuzzo et al., (2006).

Contudo, dada a importância do veículo no qual os dados de Kolker e colaboradores foram publicados, e a recente publicação do grupo do Dr. Moacir Wajner (Petenuzzo et al., 2006), segundo a qual a SDH de coração é insensível ao MMA, cabe uma discussão um pouco mais detalhada sobre a divergência de nossos dados com os dados do grupo alemão. A partir de uma análise crítica e detalhada dos estudos publicados por Kolker e colaboradores citamos como causa provável de tal divergência os seguintes fatores: a) origem do tecido estudado: os resultados

obtidos nos ensaios com coração bovino e homogeneizado de músculo de rato não podem ser aplicados a outros tecidos, e muito menos podem servir de evidência de mecanismo neurotóxico do MMA. De fato, Pettenuzzo et al. (2006) mostraram que a atividade da SDH, bem como sua inibição por MMA, são característicos aos diferentes tecidos estudados (Pettenuzzo et al., 2006); b) A concentração de substrato utilizada foi inadequada. Tratando-se de um mecanismo de inibição competitiva, a concentração alta de succinato (> 10 mM) prejudicou a observação da inibição da SDH por MMA. Conforme Dutra et al (1993), concentrações baixas de substrato (1 mM) são requeridas para mostrar que o MMA (2,5 mM) inibe a atividade da SDH em cérebros e fígado de ratos, e esta inibição é reversível por adição de 5 a 16 mM de substrato (Brusque et al., 2002), respectivamente; c) A concentração de inibidor foi inadequada. Para mostrar que o MMA não inibe SDH, em homogeneizado de músculo esquelético de ratos, Kolker e colaboradores usaram uma concentração baixa de MMA (1 mM); d) Os métodos estatísticos utilizados foram inadequados (teste T para amostras não-pareadas). Uma vez que o mesmo homogeneizado de músculo esquelético de ratos foi incubado na presença e ausência de inibidor, a medida da atividade enzimática nestas condições é dependente entre os grupos. Portanto, deveria ter sido utilizado o teste T para amostras pareadas. O tratamento de variáveis dependentes como independentes diminui o poder de prova do teste estatístico, aumentando a probabilidade de ocorrer um erro tipo II (não encontrar uma diferença estatística onde ela de fato existe).

Esses fatores foram decisivos para que o grupo alemão chegasse à conclusão equivocada de que o MMA não inibe a SDH em fibroblastos e não exerce efeito neurotóxico direto. Na verdade, a partir dos dados publicados por Kolker, só se

pode afirmar que em partículas submitocondriais de coração bovino o MMA não inibe o complexo II.

Contudo, havia um dado de nosso grupo que sugeria que a inibição da SDH por MMA em enriquecido mitocondrial de estriado de ratos era dependente da presença de fenazina no meio de incubação (Marisco et al., 2003). De fato, na ausência de fenazina o malonato inibia claramente a SDH, mas o MMA, em nenhuma das concentrações testadas, foi capaz de inibir a redução do DCPIP. Este dado (reproduzido, de certa forma pelo grupo alemão) foi interpretado como um “artefato” de medida da atividade enzimática. Nós, por outro lado, o interpretamos como uma suscetibilidade diferencial conferida pela fenazina ao complexo II ao MMA, de maneira análoga aos estudos pioneiros de Gutman na década de 70, que mostraram que a inibição da SDH por oxalacetato dependia do estado de oxidação do grupo prostético da SDH (Gutman, 1975). De acordo com Gutman, a oxidação do FAD deixava a enzima mais suscetível à inibição (competitiva) por oxalacetato. Assim, nós resolvemos investigar se a modificação do estado redox da SDH poderia modificar a sensibilidade da SDH ao inibidor competitivo metilmalonato.

Para mostrar o efeito do MMA sobre a SDH, utilizamos a técnica da redução do 2-[4-iodofenil]-3-[4nitrofenil]-5-feniltetrazólio (INT) como acceptor final de elétrons. Esta técnica que apresenta a vantagem de não usar intermediários como a PMS, sendo os elétrons entregues diretamente ao reagente de cor, e se pode parar a reação quando desejado.

Tem sido descrito que o processo de fracionamento e isolamento das frações mitocondriais altera a razão $NAD^+/NADH$, e conseqüentemente, o estado redox do meio tecidual, modificando, assim, a proporção de substratos oxidantes e redutores

disponíveis as reações enzimáticas (Willianson 1967). Para determinar se a disponibilidade maior de um agente redutor modificaria a atividade da SDH e/ou sua inibição por MMA, reduzimos o meio enzimático pela adição de β -NADH. Desta forma, estaríamos induzindo a redução do FAD antes da incubação com o substrato, e poderíamos avaliar se a pré-incubação com o agente redutor modificaria a suscetibilidade da SDH ao MMA. Contudo, havia relatos na literatura que indicavam que o β -NADH poderia reduzir o reagente de cor (INT) diretamente (Smith and McFeters, 1997; Uppu, 1995; Whitaker, 1968). Para afastar essa possibilidade, realizamos uma curva de concentração de β -NADH sobre a atividade da SDH. A concentração de 160 μ M de β -NADH foi escolhida por ser a menor sem efeito *per se* (figura 7), ou seja, que fosse incapaz de modificar a atividade da SDH.

Ainda, para nos certificar de que não haveria qualquer tipo de interação entre β -NADH e o INT realizamos a determinação da V_{max} e do K_m (Lineweaver-Burk) para a enzima pré-incubada na presença e na ausência de 160 μ M de β -NADH (figura 9). A enzima pré-incubada com β -NADH apresentou menor valor de $K_m=0,216$ nmol/L INT do que a enzima pré-incubada sem β -NADH, $K_m=0,272$ nmol /L INT, enquanto que a $V_{m\acute{a}x}$ foi igual para ambas as condições de pré-incubação..

A redução do valor de K_m para a enzima pré-incubada com β -NADH, sugere que o nucleotídeo reduzido aumenta a afinidade entre a enzima e o substrato. Por outro lado, a determinação de valores idênticos de V_{max} para as duas condições comprova que o β -NADH, nesta concentração, não é capaz de promover a redução direta do INT. Esses resultados cinéticos nos asseguram que usamos uma concentração de β -NADH sem efeito “*per se*” no ensaio.

A seguir, testamos a influência do β -NADH sobre a inibição da SDH por 5 mM de MMA. Neste ensaio verificamos que pré-incubação com β -NADH não alterou a atividade da SDH, mas preveniu a inibição induzida por MMA (figura 8).

Para esclarecer o mecanismo envolvido na diminuição da sensibilidade da SDH à inibição por MMA na presença do nucleotídeo, determinamos a constante de inibição (K_i) do MMA para a SDH, na presença e ausência de β -NADH. O valor de K_i para MMA da enzima pré-incubada com β -NADH ($K_i= 20,05$ nmol) foi maior do que o determinado no grupo controle ($K_i=11,60$ nmol) (figuras 10, 11A e B). O aumento do valor determinado de K_i mostra que a pré-incubação com β -NADH diminui sensibilidade da SDH à inibição por MMA.

Em suma, nossos resultados sugerem que a pré-incubação com um agente redutor (β -NADH) aumenta a afinidade entre a SDH e o substrato, e diminui a sensibilidade da enzima a inibição por MMA, provavelmente por alterar a conformação da enzima. Estes dados também sugerem que a inibição da SDH por MMA pode ser precipitada por situações de estresse metabólico (e oxidativo), nos quais há uma diminuição na proporção de equivalentes reduzidos em relação aos oxidados. Estes dados, de certa forma, podem explicar a maior suscetibilidade dos pacientes metilmalônicacidêmicos a desenvolver crises de acidose metabólica quando lhes é infringido um estresse metabólico, como uma infecção viral, por exemplo. Nestes casos a SDH se tornaria mais suscetível à inibição por MMA, que já se encontra geralmente aumentado nestes pacientes, propiciando uma inibição metabólica (ao nível do Ciclo de Krebs) e as conseqüências neurológicas que a inibição do complexo II acarreta, como morte celular e convulsões.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- ❖ A atividade da SDH , em córtex de ratos, é inibida de maneira dose-dependente por ácido metilmalônico.
- ❖ A Atividade da SDH não é alterada pela presença de 160 μM de $\beta\text{-NADH}$.
- ❖ A redução do meio reacional, e conseqüentemente da enzima, promove a proteção da SDH à inibição por MMA.
- ❖ A pré-incubação da enzima com $\beta\text{-NADH}$ aumenta a afinidade (K_m) da enzima pelo substrato, e não altera o valor da V_{max} .
- ❖ A pré-incubação da enzima com $\beta\text{-NADH}$, aumenta o valor de K_i do MMA para a SDH.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.; HEALES, S. J. R.; BOLAÑOS, J. P. et al. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. **Brain Research**, v.790, p. 209-216, 1998.
- ARMSTRONG, D. L. Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca²⁺-activated phosphatase in mammalian brain. **Trends in Neurosciences**, v.12, p.117-122, 1989.
- ASTUTI, D.; LATIF, F.; DALLOL, A. et al. **American Journal of Human Genetic**, v. 69, p. 49-54, 2001
- BAYSAL, B. E., RUBINSTEIN, W. S.; TASCHNER, P. E.M. phenotype dichotomy in mitochondrial complex II genetic disorders. **Journal Molecular Medicine**, v. 79, p. 495-503, 2001.
- BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J. et al. Apparent radical hydroxy radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide on superoxide. **Proceedings of The National Academy of Sciences USA**, v. 87, p. 1621-1624, 1990.
- BEHRENS, M. I.; KOH, J.; CANZIONERO, L. M. T. et al. 3-Nitropropionic acid induces apoptosis in cultured striatal and cortical neurons. **NeuroReport**, v. 6, p. 545-548, 1995.
- BENSON, P. F. & FENSON, S. H. Genetic biochemical disorders. **Oxford University Press**, Oxford, 1985.
- BOURGERON, T.; RUSTIN, P.; CHRETIEN, D. et al. Mutation of nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. **Nature Genetic**, v. 11, p. 144-149, 1995

- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1977.
- BRIÈRE, J. J.; RUSTIN, P.; FAVIER, J. et al. Succinate dehydrogenase deficiency in human. **Cellular and molecular Life Sciences**, v. 62, p. 2317-2324, 2005.
- BRISMAR, J. & OZAND, P. T. CT and MR of the brain in the diagnosis of organic acidurias. Experience from 107 patients. **Brain and Development**, v. 16, p. 104-124, 1994.
- BRORSON, J. R.; MARCUCCILLI, C. J.; MILLER, R. J. Delayed antagonism of calpain reduces excitotoxicity in cultured neurons. **Stroke**, v. 26, p. 1259-1267, 1995.
- BROUILLET, E.; HENSHAW, D. R.; SCHULZ, J. B. et al. Aminooxyacetic acid striatal lesions attenuated by 1,3-butanediol and coenzyme-Q10. **Neuroscience Letters**, v. 177, p. 58-62, 1994.
- BRUSQUE, A.M.; BORBA ROSA, R.; SCHUCK, P. F.; et al. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. **Neurochemistry International**, v. 40, p. 593-601, 2002.
- BUCHAMAN, D. N.; THOENE, H.J.G. Volatile organic acid profiling in physiological fluids using gas chromatography/mass spectrometry In: Hommes F., **Techniques in diagnostic human biochemical genetics**, 1^o ed. New York, Wiley-Liss Inc., 1991.
- BURNS, L. H. Selective putaminal excitotoxic lesions in non-human primates model the movement disorder of Huntington disease. **Neuroscience**, v. 64, p. 1007-1017, 1995.

- BURNS, S.P.; ILES, R.A.; SAUDUBRAY, J.M.; CHALMERS, R.A. Propionylcarnitine excretion is not affect by metronidazole administration to patients with disorders os propionate metabolism. **European Journal of Pediatric**, v. 155, p. 31-35, 1996
- CARAKUSHANSKI, G. Investigação Laboratorial de Erros Inatos do Metabolismo, em: **Doenças Genéticas em Pediatria**. Ed Univ. Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- COELHO, J. C.; WAJNER, M.; BURIN, M. G. et al. Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism, **European Journal of Pediatric**, v. 156980, p. 650-654, 1997
- CHALMERS, R. A.; PURKISS, P.; WATTAS, R. W. et al. Screening for organic acidúrias and aminoacidopathies in newborns and children. **Journal Inherited Metabolic Disease**, v. 3, p. 27-43, 1980.
- CHECCHINI, G. Function and structure of Complex II of Respiratory Chain. **Annual Review Biochemistry**, v. 72, p. 77-109, 2003.
- DUTRA, J. C.; DUTRA-FILHO, C.; CARDOSO, S. E. C. et al. Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydriogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. **Journal Inherited Metabolic Disease**, v. 16, p. 147-153, 1993.
- EFIMOV, I.; CRONIN, C. N.; McINTIRE, W.S. Effects of noncovalent and covalent FAD binding on the redox and catalytic properties of p-cresol methylhydroxylase
- FENTON, W.A., GRAVEL, R.A., ROSENBLATT, D.S., 2001. **Disorders of propionate and methylmalonate metabolism**. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, pp 2165-2193

- FENTON, W.A.; ROSEMBERG, L.E. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism, in: **The Metabolic Bases of Inherited Disease**, 7^a ed, MacGraw-Hill, New York, 1995.
- FERNADES, J.; SAUDUBRAY, J. M.; TADA, K. eds. Organic acidemias. In: **Inborn Metabolic Diseases**, 1^o ed., Berlin, Springer-Verlag, 1990, p. 271-299.
- FIGHERA, M. R.; BONINI, J. S.; OLIVEIRA, T. G. et al, GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by intrastriatal injection of methylmalonic acid. **International Journal Biochemistry Cellular Biological**, v. 35, p. 465-473, 2003.
- FIGHERA, M. R.; QUEIROZ, C. M.; STRACKE, M. P. et al. Ascorbic acid and α -tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. **NeuroReport**, v. 10, p. 2039-2043, 1999.
- FLECK, J.; RIBEIRO, M.C.P.; SCHNEIDER, M.C. et. al. Intrastriatal malonate administration induces convulsive behavior in rats. **Journal Inherited Metabolic Disease**, v. 27, p. 211-219, 2004.
- FONTELA, F.U.; PULROLNIK, V.; GASSEN, E., et. al. Propionic acid and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. **NeuroReport**, v. 11, p. 541-544, 2000.
- GIUGLIANI, R. Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. **Pediatria Moderna**, v. 23 (01), p. 29-40, 1988.
- GOODMAN, S. I.; & FRERMAN, F. E. Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2-ketoadipic acidemia and glutaric acidemia. In: Scriver C. R.; Beaudet, A. L.; Valle, D. eds; Childs, B.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. assoc. eds. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 8th edn. New York: McGraw-Hill, 2195-2204, 2001.

- GREEN, J. D.; NARAHARA, H. T.; Assay of succinate dehydrogenase activity by tetrazolium method: evaluation of an improved technique in skeletal muscle fractions. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 28, p. 408-412, 1980.
- GUTMAN, M.; SILMAN, N.; The steady state activity of succinate dehydrogenase in the presence of opposing effectors. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 7, p. 51-58, 1975.
- HARRIS, M. E.; CARNEY, J. M.; COLE, P. S. et al. β -amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimers disease. **NeuroReport**, v. 6, p. 1875-1879, 1995.
- HAYASAKA, K.; METOKI, K.; SATOH, T.; NARISAWA, K.; TADA, K.; KAWAKAMI, T.; MATSUO, N.; AOKI, T. Comparison of cytosolic and mitochondrial enzyme alterations in the liver of propionic or methylmalonic acidemia: a reduction of cytochrome oxidase activity. **Tokoku Journal of Experimental Medicine**, v. 137, p. 329-34, 1982.
- HOFFMANN, G. Organic Acid Analys´s. In: Blau N.; Duran M.; Blaskovics, m. E. **Physician´s Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Disease**, 1^o ed. London, Chapman and Hall. 1996.
- HOFFMANN, G.F.; MEIER-AUGENSTEIN, W.; STOCKER, S.; SURTEES, R.; RATING, D.; NYHAN, W.L. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluids. **Journal Inherited Metabolic Disease**, v. 16, p. 648-666, 1993.
- ISHII, N.; FUJII, M.; HARTMAN, P.S. et al. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrom b causes oxidative stress and ageing in nematodes. **Nature**, v. 394, p. 694-97, 1998.

- JENNER, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. **Lancet**, v. 344, p. 796-798, 1994.
- JENNER, P.; OLANOW, C. W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease, **Neurology**, v. 47, p. 161-170, 1996.
- KEARNEY, E. B.; ACKREEL, B. A. C.; MAYR, M. Et al. Activation of succinate dehydrogenase by anions and pH. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249 (7), p. 2016-2020, 1974.
- KOLKER, S.; SCHWAB, M.; HORSTER, F.; et al. Methylmalonic acid, a biochemistry hallmark of methylmalonic acidurias but no inhibitor of mitochondrial respiratory chain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 47388-47393, 2003.
- KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; MACIEL, E. N. et al. Diazoxide protects against methylmalonate-induced neuronal toxicity. **Experimental Neurology**, v. 201, p.165-171, 2006.
- LEONARD, J. V.; WALTER, J. H.; McKIERNAN, P. J. The management of organic acidemias: The role of transplantation. **Journal Inherited Metabolic Disease**, v. 25, p. 309-311, 2001.
- LIOCHEV, S.L. The role of iron-sulfur clusters in *in vitro* hydroxyl radical production. **Free Radicals Research**, v. 25, p. 369-384, 1996
- LIPTON, S. A. & ROSEMBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 330, p. 613-622, 1994.
- LUDOLPH, A. C.; RIEPE, M.; ULLRICH, K. Excitotoxicity energy metabolism and neurodegeneration. **Journal Inherited Metabolic Disease**, v.16, p. 716-723, 1993.

- MAKLASHIMA, E.; ROTHERY, R. A.; WEINER, J. H. et al. Retention of heme in axial ligand mutants of succinate ubiquinone oxidoreductase (complex II) *E. coli* **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 18968-76, 2001.
- MALD, J. E. & BURGESSER, K. Adenosine triphosphate depletion reverse sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. **The Journal of Neuroscience**, v. 13, p. 4429-4444, 1993.
- MALFATTI, C.R.M.; ROYES, L.F.F.; FRANCESCATO, L., et al. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na⁺, K⁺-ATPase activity in the rate striatum and cerebral cortex. **Epilepsy Research**, v. 44, p. 761-767, 2000.
- MARISCO, P. C.; RIBEIRO, M. C. P.; BONINI, J. S. et al. Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. **Experimental Neurologic**, v. 182, p. 455-460, 2003.
- McDONALD, J. W. & SCHOEPP, D. D. Aminooxyacetic acid produces excitotoxic brain injury in neonatal rats. **Brain Research**, v. 624, p. 239-244, 1993.
- McLAUGHLING, B. A.; NELSON, D.; SILVER, I. et al. Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. **Neuroscience**, v. 86, p. 279-290, 1998.
- McNAUGHT, K. S. P.; ALTOMARE, C.; CELLAMARES, S. et al. Inhibition of α -Ketoglutarate dehydrogenase by isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **NeuroReport**, v. 6, p. 1105-1108, 1995.
- MELLO, C. F.; BEGNINI, J.; JIMENEZ-BERNAL et al.; Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. **Brain Research**, v. 721, p. 120-125, 1996.

- NATHANSON, J. A.; SCAVONE, C.; SCANZON, C. et al. The cellular sodium pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. **Neuron**, v. 14, p. 781-794, 1995.
- OBERHOLZER, V.C.; LEVIN, B; BURGESS, E.A; YOUNG, W.F. Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 42, p. 492-504, 1967
- OGIER, H. & SAUDUBRAY, J.M.; Branched-chain organic acidurias. **Seminars in Neonatology**. v. 7, p. 65-74, 2002.
- PAVLAKOVIC, G.; EYER, C. L.; ISON, G. E. Neuroprotective effects of PKC inhibition against chemical hypoxia. **Brain Research**, v. 676, p. 205-211, 1995.
- PERRY, T. L.; GODIN, D. V. HANSEN, Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? **Neuroscience Letters**, v. 33 (3), p. 305-310, 1982.
- PETTENUZZO, L. F.; FERREIRA, G. C.; SCHIMIDT, A. L.; DUTRA-FILHO, C. S.; WYSE, A. T.S.; WAJNER, M. Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complex activities in rats tissues. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 24, p. 45-52, 2006.
- PLAITAKIS, A. & CONSTANTAKAKIS, E. Altered metabolism of excitatory amino acids, N-acetyl-aspartate and N-acetyl-glutamate in amyotrophic lateral sclerosis. **Brain Research**, v. 30, p. 301-306, 1993
- ROTHMAN, S. M. Excitotoxins: possible mechanism of action. **Annals of the New York Academy of sciences**, v. 648, p.132-139, 1992.
- ROYES, L.F.F., FIGHERA, M.R., FURIAN, A.F. et al. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience**, v. 118, p. 1079-1090, 2003.

- ROYES, L.F.F., FIGHERA, M.R., FURIAN, A.F., et al. Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience Letters**, v. 376 (2), p. 116-120, 2005.
- RUSTIN, P.; ROTIG, A. Inborn errors of complex II usual human mitochondrial disease. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1553, p. 117-122, 2002
- SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D. (eds). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 8th Ed., McGraw- Hill, New York. 2001.
- SCHUCK, P.F., ROSA, R.B., PETTENUZZO, L.F., SITTA, A, WANNMACHER, C.M., WYSE, A.T., WAJNER, M. Inhibition of mitochondrial creatine kinase activity from rat cerebral cortex by methylmalonic acid. **Neurochemistry International**, v. 45 (5), p. 661-667, 2004.
- SENNO-MATSUDA, N.; YASUDA, K.; TSUDA, M. et al. A defect in the cytochrome b large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 41553-58, 2001.
- SIESJO, B. K., Cell damage in the brain: a speculative synthesis. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 1(2), p. 155-177, 1981.
- SMITH, J. J.; MCFETERS, G. A., Effects of substrates and phosphate on INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride) and CTC (5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli*. **Journal Applied Bacteriology**, v. 80, p. 209-215, 1996.
- SNYDER, S. H. & BREDT, D. S. Biological roles of nitric oxide. **Scientific American**, p. 28-35, 1992.

- SWANSON, R.A.; FARREL, K.; SIMON R.P. Acidose causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 15, p. 417-424, 1995.
- TOYOSHIMA, S.; WATANABE, F.; SAIDO, H. et al. Methylmalonic acids inhibits respiration in rat liver mitochondria. **Journal Nutrition**, v. 125, p. 2846-2850, 1995
- TREACY, E; ARBOUR, L; CHESSEX, P.; GRAHAN, G.; KASPRZAK, L.; CASEY, K.; BELL, L.; MANER, O.; SCRIVER, C. R. glutathione deficiency as a complication of methylmalonic acidemia: Response to high doses of ascorbato. **The Journal of Pediatrics**, v. 129 (3), p. 445-447, 1996.
- UMEMURA, A.; MABE, H.; NAGAI, H. A phospholipase C inhibitor ameliorates postischemic neuronal damage in rats. **Stroke**, v.23, p. 1163-1166, 1992.
- UPPU, R. M. Novel kinetics in biomimetic redox reaction involving NADH and tetrazolium salts in aqueous micellar solutions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 58, p. 193-207, 1995.
- WAJNER, M.; LATINI, A.; WYSE, A.T.S.; DUTRA-FILHO, C.S. The role of oxidaditive damage in the neuropathology of organic acidurias: Insights from animal studies. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 27, p. 427-448, 2004.
- WAJNER, M.; DUTRA, J. C.; CARDOSO, S. E. et al. Effect of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 15, p. 92-96, 1992.
- WAJNER, M.; RAYMOND, K.; BARSCHAK, A. et al. Detection of organic acidemias in Brazil, **Archives of Medical Research**,v. 33(6), p. 581-585, 2002

- WANNMACHER, C. M. D.; WAJNER, M.; GIUGLIANI, R. et al. Detection of metabolic disorders among high risk patients. **Revista Brasileira de Genética**, v.5, p.187-194, 1982.
- WHITAKER, J. F. A general colorimetric procedure for the estimation of enzymes which are linked to the NADH/NAD⁺ system. **Clinical Chemistry Acta**, v. 25, p. 23-37, 1968.
- WILLIAMSON, D.H.; LUND, P.; KREBS, H. A. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. **Biochemistry Journal**, v. 103, p. 514-527. 1967
- WYSE, A.T.S.; STRECK, E.L.; BRUSQUE, A.M. et al. Methylmalonic administration decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. **NeuroReport**, v. 11, p. 2331-2334, 2000.
- YANKOVSKAYA, V., HORSEFIELD, R., TORNROTH, S., LUNA-CHAVEZ, C., MIYOSHI, H., LEGER, C., BYRNE, B., CECCHINI, G., AND IWATA, S. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation, **Science**, v. 299, p. 700–70, 2003
- ZEEVALK, G. D.; DERR-YELLIN, E.; NICKLAS, W. J. et al. NMDA receptor involvement in toxicity to dopamine neurons in vitro caused by the succinate dehydrogenase inhibitor 3-nitropropionic acid. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, p. 455-458, 1995.