

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**EFEITOS DO ÁCIDO ETILMALÔNICO SOBRE A HOMEOSTASE
ENERGÉTICA EM MITOCÔNDRIAS DE RATOS JOVENS NA PRESENÇA DE
CÁLCIO**

Cristiane Cecatto

Porto Alegre, junho de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**EFEITOS DO ÁCIDO ETILMALÔNICO SOBRE A HOMEOSTASE
ENERGÉTICA EM MITOCÔNDRIAS DE RATOS JOVENS NA PRESENÇA DE
CÁLCIO**

Cristiane Cecatto

Orientador: Prof. Dr. Moacir Wajner

Co-orientador: MSc. Alexandre Umpierrez Amaral

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

Porto Alegre, junho de 2013

*Aos meus pais, Olivo e Lori, que sempre
me ensinaram que o conhecimento é a
única chave que abre muitas portas.*

SUMÁRIO

RESUMO	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. Erros Inatos do Metabolismo	6
1.2. Deficiência da Desidrogenase das Acilas-CoA de Cadeia Curta (SCADD) e Encefalopatia Etilmalônica (EE).....	6
1.3. Homeostase mitocondrial: fosforilação oxidativa e cadeia transportadora de elétrons	8
1.4. Papel da Mitocôndria na Homeostase Celular do Ca²⁺	9
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Animais e Reagentes.....	13
3.2. Isolamento da Fração Mitocondrial.....	13
3.3. Medida do Potencial de Membrana Mitocondrial	14
3.4. Medida do Conteúdo de NAD(P)H Mitocondrial.....	14
3.5. Medida do Inchamento Mitocondrial.....	15
3.6. Medida da Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) Mitocondrial	15
3.7. Determinação da Concentração Proteica	15
4. RESULTADOS	15
4.1. Efeito in vitro do ácido etilmalônico (EMA) sobre o potencial de membrana em preparações mitocondriais de cérebro de ratos em presença de Ca²⁺	15
4.2. Efeito in vitro do ácido etilmalônico (EMA) sobre o inchamento em preparações mitocondriais de cérebro de ratos em presença de Ca²⁺	16
4.3. Efeito in vitro do ácido etilmalônico (EMA) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais de cérebro de ratos em presença de Ca²⁺	17
4.4. Efeito in vitro do ácido etilmalônico (EMA) sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos em presença de Ca²⁺	18
5. DISCUSSÃO	19
6. PERSPECTIVAS	22
7. FONTE DE FINANCIAMENTO	22
REFERÊNCIAS.....	23

RESUMO

Acúmulo tecidual e alta excreção urinária do ácido etilmalônico (EMA) são características bioquímicas da encefalopatia etilmalônica (EE) e da deficiência da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta (SCADD). Embora essas doenças hereditárias sejam clinicamente caracterizadas por anormalidades neurológicas, os mecanismos responsáveis pelo dano cerebral são pouco conhecidos. Considerando que a disfunção mitocondrial e o metabolismo do Ca^{2+} têm sido relacionados com a patogênese de doenças neurodegenerativas, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do EMA sobre vários parâmetros de bioenergética em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens na presença de Ca^{2+} , tais como o potencial de membrana, o conteúdo de NAD(P)H, o inchamento e a produção de H_2O_2 . Verificamos que o EMA foi capaz de diminuir o potencial de membrana e o conteúdo de NAD(P)H, além de induzir o inchamento em preparações mitocondriais na presença de Ca^{2+} , utilizando succinato como substrato. No entanto, não foram detectadas alterações na produção de peróxido de hidrogênio nas mesmas condições experimentais. Observamos também que os inibidores da abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) mitocondrial, ADP e ciclosporina, assim como o agente redutor DTT e o inibidor da captação mitocondrial de Ca^{2+} RR, foram capazes de prevenir ou atenuar esses efeitos. Analisando os resultados em conjunto, concluímos que o EMA é capaz de induzir a abertura do PTP na presença de Ca^{2+} , levando a fortes alterações na bioenergética mitocondrial. Presumimos, portanto, que tais efeitos deletérios podem comprometer o funcionamento do sistema nervoso central e contribuir, ao menos em parte, para explicar as alterações neurológicas apresentadas pelos pacientes acometidos por doenças em que o EMA se acumula.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

BSA – albumina bovina

CoA – coenzima A

CsA – ciclosporina A

Cyp D – ciclofilina D

DTT – Ditionitrito

EE – encefalopatia etilmalônica

EIM – erros inatos do metabolismo

EMA – ácido etilmalônico

GSH – glutathione

MCU – sistema uniporte de Ca^{2+}

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio

PTP – poro mitocondrial de transição de permeabilidade

mNCX – trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

mHCX – trocador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$

NADH – nicotidamina dinucleotídeo reduzido

NADPH – nicotidamina dinucleotídeo reduzido fosfato

RR – Ruthenium Red

SCADD – deficiência da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta

VDAC - canais iônicos dependentes de voltagem

1. INTRODUÇÃO

1.1. Erros Inatos do Metabolismo

Em 1908, Sir Archibald E. Garrod usou o termo erros inatos do metabolismo (EIM) para designar doenças como a alcaptonúria, em que os indivíduos afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. Garrod observou uma maior frequência desta doença em indivíduos de uma mesma família e maior consanguinidade entre os pais dos pacientes. Baseando-se nas leis de Mendel e no fato de que os pais dos indivíduos afetados não apresentavam a doença, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio. Através da observação de que o ácido homogentísico presente em excesso na urina dos pacientes era um metabólito normal da degradação protéica, ele relacionou este acúmulo a um bloqueio na rota de catabolismo da tirosina. Com o surgimento de novos distúrbios relacionados a alterações genéticas e que envolviam o acúmulo de outras substâncias nos líquidos biológicos dos pacientes, postulou-se que estas doenças resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, enzimática ou não, pertencente ao metabolismo (Scriver, 2001). Presumiu-se, então, que em consequência deste bloqueio metabólico pode ocorrer o acúmulo de precursores da reação catalisada pela enzima envolvida, com a formação de rotas metabólicas alternativas e a deficiência de produtos essenciais ao organismo (Bickel, 1987).

Até o momento foram descritos mais de 500 EIM, a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Scriver, 2001). Embora individualmente raras, essas doenças em seu conjunto afetam aproximadamente 1 a cada 500 a 2.000 recém nascidos vivos (Baric et al, 2001).

1.2. Deficiência da Desidrogenase das Acilas-CoA de Cadeia Curta (SCADD) e Encefalopatia Etilmalônica (EE)

O ácido etilmalônico (EMA) se acumula nas doenças autossômicas recessivas deficiência da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta (SCADD) e encefalopatia etilmalônica (EE). Além do EMA, ácido metilsuccínico, butirilcarnitina e butirilglicina também se acumulam nos tecidos dos pacientes acometidos pela SCADD (Amendt et al., 1987; Corydon et al., 1996). A deficiência da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta (SCADD) é um defeito no primeiro passo da oxidação dos ácidos graxos de cadeia curta, de herança autossômica recessiva, com uma

prevalência estimada em alguns países de 1:50.000 nascidos vivos (van Maldegem et al., 2006), podendo acometer desde crianças de menos de um ano de idade até adultos (Bhala et al., 1995; Corydon et al., 2001). O acúmulo de EMA na SCADD ocorre principalmente através do metabolismo alternativo do butiril-CoA, que se transforma primeiramente em etilmalonil-CoA numa reação catalisada pela propionil-CoA carboxilase e posteriormente em EMA pela ação acil-CoA hidrolase (Jethva et al., 2008). A SCADD pode ser classificada em duas formas: a SCADD primária, causada por alterações no gene que codificada a enzima, e a SCADD 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). As manifestações clínicas são bastante variadas, incluindo atraso no desenvolvimento, alterações comportamentais, convulsões, coma e sintomas neuromusculares, tais como miopatia e hipotonia (Jethva et al., 2008). O diagnóstico é realizado em neonatos através da identificação dos metabólitos acumulados na urina por espectrometria de massa ou no sangue por espectrometria de massa em tandem (Wilcken et al., 2003, Waisbren et al., 2008).

A EE é clinicamente caracterizada por atraso psicomotor e hipotonia generalizada, evoluindo para tetraparesia espástica, distonia e dano neurológico global devido à severa neurodegeneração (Burlina et al., 1991). A evolução do quadro é progressiva e geralmente leva a morte dentro da primeira década de vida (García-Silva et al., 1997). 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). Os pacientes afetados pela EE apresentam uma mutação no gene *ETHE1* (Tiranti et al., 2004; Tiranti et al., 2006), o qual codifica uma dioxigenase mitocondrial envolvida na detoxificação de enxofre. A deficiência dessa enzima leva ao acúmulo de sulfidreto (H_2S) que em elevadas concentrações inibe a SCAD, resultando na formação de EMA (Pedersen et al., 2003). Os mecanismos da disfunção neurológica nessas doenças não estão bem esclarecidos, podendo ser atribuídos principalmente ao acúmulo de EMA. Neste sentido, estudos *in vitro* publicados na literatura 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., 2010a) 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). Embora esses resultados indiquem que o EMA, o qual se acumula nas doenças SCADD e EE, possua efeitos neurotóxicos, a relação dos mesmos com a fisiopatologia dessas doenças ainda precisa ser melhor esclarecida.

1.3. Homeostase mitocondrial: fosforilação oxidativa e cadeia transportadora de elétrons

A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual o O_2 é reduzido a H_2O , por elétrons doados pelo NADH e $FADH_2$, que fluem por vários pares de redução-oxidação (cadeia respiratória), ocorrendo concomitantemente a produção de ATP a partir de ADP e Pi (Nelson e Cox, 2000). Em eucariotos, a fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias, mais precisamente na cadeia respiratória, e é responsável pela maior parte da energia liberada pela célula. As mitocôndrias são corpúsculos envoltos por uma membrana externa, facilmente permeável a pequenas moléculas e íons, e por uma membrana interna, impermeável à maioria das moléculas e íons, incluindo prótons (Nelson e Cox, 2000). A membrana interna contém transportadores específicos para a passagem de substâncias como o piruvato, glicerolfosfato, malato, ácidos graxos e outras moléculas essenciais às funções mitocondriais (Abeles et al., 1992). O fluxo de elétrons a partir de NADH e $FADH_2$ até o O_2 (ceptor final de elétrons) se dá através de complexos enzimáticos ancorados na membrana mitocondrial interna com centros redox com afinidade crescente por elétrons. Essa transferência de elétrons é impulsionada por um crescente potencial redox existente entre os equivalentes reduzidos (NADH e o $FADH_2$), os complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons e o O_2 , que é o ceptor final dessa cadeia de reações de oxidação.

O fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, através dos complexos I, III e IV, gerando um potencial de membrana. Assim, cria-se um gradiente eletroquímico transmembrana que pode ser utilizado por um quinto complexo proteico, a ATP

sintase, para a síntese de ATP. Dessa forma, a oxidação de substratos energéticos está acoplada ao processo de fosforilação do ADP, ou seja, quando o potencial de membrana é dissipado pelo fluxo de prótons a favor do gradiente eletroquímico, a energia liberada é utilizada pela ATP sintase, que atua como uma bomba de prótons ATP-dependente (Nelson e Cox, 2000).

Além da regeneração do ATP, que é a sua principal função, a mitocôndria desempenha outras funções importantes. Esta organela é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio e de defesas antioxidantes nas células (Cadenas & Davies, 2000), gerando ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$) no espaço intermembrana pelo vazamento de elétrons que se combinam com o oxigênio molecular em um processo que é dependente do potencial de membrana mitocondrial (Han et al., 2001). Além disso, a mitocôndria participa ativamente da homeostase celular de Ca^{2+} (Nicholls e Akerman, 1982) e está envolvida em diversos processos que levam à morte celular, incluindo liberação de citocromo c (Liu et al., 1996). É possível medir experimentalmente a respiração mitocondrial, o potencial de membrana, o inchamento, a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a capacidade de retenção de Ca^{2+} e o conteúdo de NAD(P)H mitocondrial. Acredita-se que todos esses processos estejam interligados e que um desequilíbrio nessas funções possa estar envolvido na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerose lateral amiotrófica (Beal, 2007; Sasaki et al., 2007; Gil & Rego, 2008; Reddy & Beal, 2008; Vila et al., 2008), e também em vários erros inatos do metabolismo (Schuck et al., 2002; Reis de Assis et al., 2004; Latini et al., 2005; Zugno et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Mirandola et al., 2008; Moshal et al., 2008; Ribeiro et al., 2008; Takamura et al., 2008; Viegas et al., 2008).

1.4. Papel da Mitocôndria na Homeostase Celular do Ca^{2+}

Disfunção mitocondrial em neurônios causa um aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} por prejudicar diretamente o sistema de remoção de Ca^{2+} ou devido à ativação dos receptores NMDA (Albin and Greenamyre 1992; Fiskum et al. 1999; Nicholls and Budd 2000). Durante uma sobrecarga citosólica de Ca^{2+} , enzimas líticas como fosfolipase A2, proteases e endonucleases são ativadas, resultando em degradação celular (Orrenius et al. 2003). Sob essas condições, a mitocôndria é a principal organela responsável pelo sequestro de Ca^{2+} , um passo requerido na neurotoxicidade induzida por NMDA (Budd and Nicholls 1996; Castilho et al. 1998; Stout et al. 1998). Na matriz mitocondrial, o Ca^{2+} é capaz de formar precipitados inativos

com o fosfato, o que faz com que essa organela seja capaz de acumular grandes concentrações de Ca^{2+} , podendo chegar a 300 μM dependendo do tecido (Starkov, 2010). A excessiva captação mitocondrial de Ca^{2+} e o estresse oxidativo podem levar a permeabilização mitocondrial não-seletiva, conhecida como transição de permeabilidade, resultado da abertura de um poro na membrana mitocondrial interna (Adam-Vizi e Starkov, 2010; Starkov, 2010; Zoratti and Szabo` 1995; Kowaltowski et al. 2001). O poro de transição de permeabilidade (PTP) mitocondrial é formado por proteínas presentes na matriz mitocondrial ou na membrana mitocondrial interna e possui 2-3 nm de diâmetro (Starkov, 2010). As proteínas que formam o PTP ainda não são conhecidas, mas devem apresentar três características principais: capacidade de se ligar a membrana interna, abrir um canal de 2-3 nm de diâmetro e ser completamente reversível (transitório) (Starkov, 2010). Por outro lado, evidências apontam que a ciclofilina D (Cyp D) é um componente chave para a abertura do poro (Bernardi e von Stockum, 2012; Rizzuto et al., 2012; Starkov, 2010) (Figura 1).

O Ca^{2+} necessita de transportadores para ser captado e liberado pela mitocôndria, num processo que consome energia. Para acessar o espaço intermembrana ou ser liberado de volta no citosol, o Ca^{2+} utiliza os canais iônicos dependentes de voltagem (VDAC) localizados na membrana mitocondrial externa. Uma vez no espaço intermembrana, o Ca^{2+} é captado pela mitocôndria por um sistema uniporte de Ca^{2+} (MCU), o qual é inibido pelo reagente *ruthenium red* (RR), e liberado da matriz pelos trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX) e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX) (Bernardi e von Stockum, 2012; Rizzuto et al., 2012) (Figura 1).

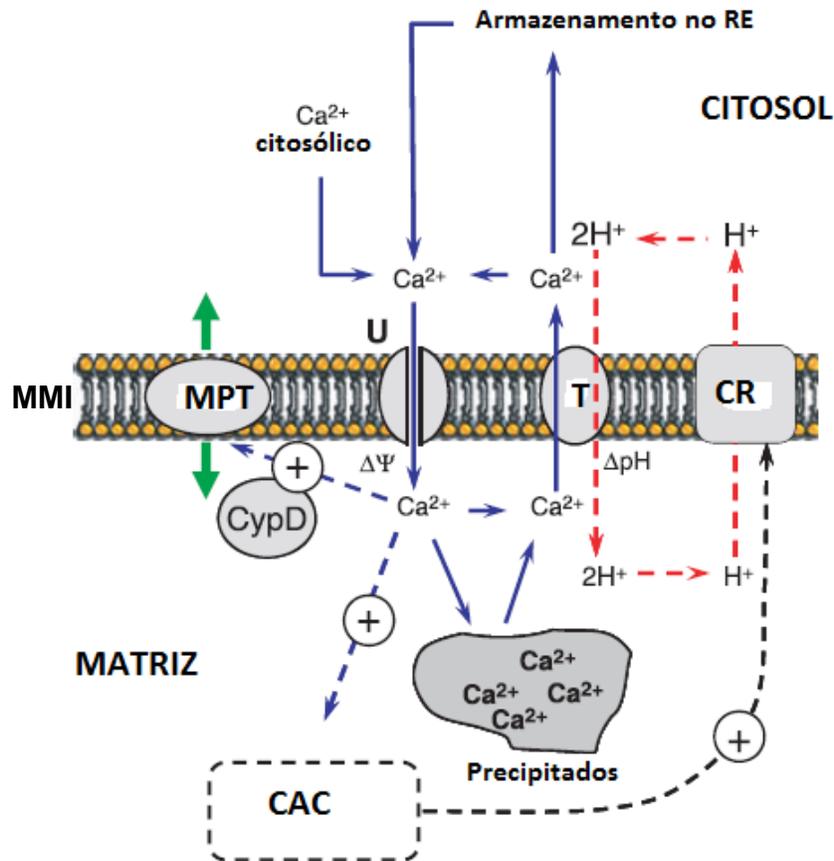


Figura 1. Modelo padrão da homeostase mitocondrial de Ca^{2+} . As mitocôndrias acumulam Ca^{2+} exógeno por meio do transportador eletrogênico (uniporte de Ca^{2+} , U) que facilita o transporte de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna para a matriz. O transporte é acoplado ao acúmulo simultâneo de fosfato inorgânico (não mostrado). Dentro da matriz, o Ca^{2+} e o fosfato acumulados são estocados na forma de precipitados inativos osmoticamente, e eventualmente liberados de volta no citosol através do trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (não mostrado) e/ou $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$, que também estão localizados na membrana mitocondrial interna. O processo de captação de Ca^{2+} é direcionado pelo potencial de membrana mitocondrial; o processo de liberação de Ca^{2+} é direcionado pelo gradiente de pH, no caso do trocador $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$. Elevadas concentrações de Ca^{2+} intramitocondrial podem estimular as atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico (CAC), desse modo impulsionando a produção de energia na mitocôndria. Quando o acúmulo de Ca^{2+} ultrapassa um certo limiar, desencadeia-se a abertura do PTP, a qual também é modulada pela proteína localizada na matriz ciclofilina D (Cyp D). T: trocador; CR: cadeia respiratória; MMI: Membrana Mitocondrial Interna; (Adaptado de Starkov, 2010).

A permanente abertura do PTP resulta na liberação de Ca^{2+} para o citosol, inchamento mitocondrial, liberação de fatores apoptogênicos intramitocondriais como o citocromo c (Liu et al. 1996), perda do potencial de membrana mitocondrial, perda de NADH, NADPH e GSH,

comprometimento da síntese de ATP e morte celular (apoptose e necrose) (Kim et al., 2003; Rasola e Bernardi, 2011; Bernardi e von Stockum, 2012; Rizzuto et al., 2012; Starkov, 2010).

O ataque oxidativo por espécies reativas de oxigênio (ERO) tem sido bastante relacionado como um mecanismo potencializador da abertura do PTP (Adam-Vizi e Starkov, 2010; Kowaltowski et al, 2001). Neste contexto, está descrito que altas concentrações de NADH previnem a abertura do PTP, por promover a redução do NADP^+ catalisada pela transidrogenase mitocondrial e consequentemente melhorar a capacidade redox da mitocôndria (Lehninger et al. 1978; Hoek and Rydstrom 1988; Zago et al. 2000; Kowaltowski et al. 2001).

O PTP é inibido por ciclosporina A (CsA), um composto que se liga e inibe a proteína Cyp D, onde já foi demonstrado um efeito protetor da CsA em modelos de isquemia (Nieminen et al. 1996; Schinder et al. 1996; Uchino et al. 1998; Petersen et al. 2000), sugerindo a importância do PTP na patogênese do dano isquêmico. No contexto de doenças neurodegenerativas, uma grande quantidade de trabalhos indica o envolvimento de disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e o metabolismo do Ca^{2+} na patogênese dessas doenças, incluindo a doença de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerose lateral amiotrófica e doenças desmielinizantes, podendo a associação desses fatores levar à abertura do PTP e às suas consequências (Calí et al., 2012; Lee e Wei, 2000; Chang et al., 2006; Forte et al., 2007; Weihofen et al., 2009; Mattson et al., 2008; Rintoul e Reynolds et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do EMA na presença de Ca^{2+} sobre importantes parâmetros da bioenergética em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens, visando uma melhor compreensão da fisiopatologia das doenças em que o EMA se acumula.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito *in vitro* do EMA (5 mM) sobre o potencial de membrana em preparações mitocondriais de cérebro de ratos em presença de Ca^{2+} ;

- Avaliar o efeito *in vitro* do EMA (5 mM) sobre o inchamento em preparações mitocondriais de cérebro de ratos em presença de Ca^{2+} ;
- Avaliar o efeito *in vitro* do EMA (5 mM) sobre o conteúdo de NADH e NADPH (equivalentes reduzidos) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos em presença de Ca^{2+} ;
- Avaliar o efeito *in vitro* do EMA (5 mM) sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos em presença de Ca^{2+} ;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e Reagentes

Foram utilizados ratos Wistar com 30 dias de vida criados e mantidos em padrão sanitário convencional controlado no biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS com ciclos de 12 h claro/escuro (07:00/19:00h) e temperatura controlada (21 °C). Os animais foram mantidos em gaiolas com dimensões 41 x 34 x 16 cm (máximo 5 animais/caixa) devidamente identificadas, em cama de maravalha de pinus selecionada e autoclavada e alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Nuvilab CR-1® - Nuvital) e água *ad libitum*.

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram adquiridos do SIGMA (St. Louis, MO, USA). O EMA foi preparado no dia do experimento no tampão da técnica, tendo seu pH ajustado para 7,4.

3.2. Isolamento da Fração Mitocondrial

O isolamento da fração mitocondrial foi realizado de acordo com Rosenthal e colaboradores (1987). Os animais foram sacrificados por decapitação com guilhotina e sem anestesia, tiveram sua caixa craniana aberta e o seu conteúdo retirado que, a partir de então, foi mantido sobre uma placa de vidro colocada sobre gelo. O bulbo olfatório e o tronco cerebral foram desprezados. O cérebro foi limpo, sendo retirado o excesso de sangue dos vasos externos e a substância branca das vias descendentes, e homogeneizado em um tampão contendo manitol 225 mM, sacarose 75 mM, EGTA 1 mM, albumina bovina 0,1%, HEPES 10 mM, pH 7,2. O homogeneizado foi centrifugado a 2000 x g por 3 minutos a 4° C. Após essa centrifugação, o

sobrenadante foi novamente centrifugado a 12000 x g por 8 minutos a 4° C. O sedimento foi ressuspensão em 12 mL de tampão de isolamento contendo 20 µL de digitonina 10% e centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4° C. O sedimento desta centrifugação foi ressuspensão em tampão de isolamento sem EGTA e centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4° C. O sedimento contendo mitocôndrias purificadas foi ressuspensão em tampão de isolamento sem EGTA em uma concentração proteica final de aproximadamente 20 mg . mL⁻¹.

3.3. Medida do Potencial de Membrana Mitocondrial

A medida do potencial de membrana mitocondrial foi realizada de acordo com o método de Akerman e Wikström (1976). A medida da fluorescência do corante catiônico safranina O 5 µM foi realizada em espectrofluorímetro operado em comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 nm e 586 nm, respectivamente, em um meio de incubação contendo 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,03 mM EGTA, 5mM HEPES, 5 mM KH₂PO₄, 0,01 % BSA e 1 µg . mL⁻¹ oligomicina A, pH 7,2 e utilizando-se como substratos succinato (5 mM) na presença de rotenona (4 µM). O EMA (5 mM) foi adicionado no início do ensaio e após 50 s adicionou-se 20 µM de Ca²⁺. A concentração proteica no meio foi ajustada para 0,5 mg . mL⁻¹. Em alguns ensaios foram utilizados RR (inibidor do transporte uniporte do Ca²⁺), DTT (agente redutor), além de ADP e CsA (inibidores do PTP).

3.4. Medida do Conteúdo de NAD(P)H Mitocondrial

O conteúdo de NAD(P)H na matriz mitocondrial foi determinado espectrofluorimetricamente em comprimentos de onda de excitação e emissão de 366 e 450 nm, respectivamente (Schuck et al., 2010b). O meio de incubação era constituído de 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,015 mM EGTA, 5mM HEPES, 5 mM KH₂PO₄, 0,01 % BSA e 1 µg . mL⁻¹ oligomicina A, pH 7,2, e succinato (5 mM) foi utilizado como substrato. O EMA (5 mM) foi adicionado no início do ensaio e após 50 s adicionou-se 20 µM de Ca²⁺. A concentração proteica no meio foi ajustada para 0,5 mg . mL⁻¹. Em alguns ensaios foram utilizados RR (inibidor do transporte uniporte do Ca²⁺), DTT (agente redutor), além de ADP e CsA (inibidores do PTP).

3.5. Medida do Inchamento Mitocondrial

O inchamento mitocondrial foi avaliado acompanhando-se o espalhamento de luz em um espectrofluorímetro, utilizando-se comprimentos de onda de excitação e emissão de 540 nm (Schuck et al., 2010b). O meio de incubação era constituído de 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,015 mM EGTA, 5mM HEPES, 5 mM KH₂PO₄, 0,01 % BSA e 1 µg . mL⁻¹ oligomicina A, pH 7,2 e utilizou-se como substrato succinato (5 mM). O EMA (5 mM) foi adicionado no início do ensaio e após 50 s adicionou-se 40 µM de Ca²⁺. A concentração de proteica no meio era 0,5 mg . mL⁻¹. Em alguns ensaios foram utilizados RR (inibidor do transporte uniporte do Ca²⁺), DTT (agente redutor), além de ADP e CsA (inibidores do PTP).

3.6. Medida da Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) Mitocondrial

A produção de H₂O₂ foi avaliada de acordo com o método de Mohanty e colaboradores (1997), através da medida da oxidação de Ampliflu Red 50 µM, na presença de 1.0 units. mL⁻¹ de peroxidase. O meio de incubação continha 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,030 mM EGTA, 5mM HEPES, 5 mM KH₂PO₄, 0,01 % BSA e 1 µg . mL⁻¹ oligomicina A, pH 7,2 e utilizou-se como substrato succinato (5 mM). O EMA (5 mM) foi adicionado no início do ensaio e após 50 s adicionou-se 20 µM de Ca²⁺. A concentração de proteína no meio foi ajustada para 0.5 mg.mL⁻¹. A oxidação do *ampliflu red* foi acompanhada espectrofluorimetricamente, em comprimentos de onda de excitação e emissão de 563 e 587 nm, respectivamente.

3.7. Determinação da Concentração Proteica

As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry (1951) utilizando-se albumina bovina como padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito in vitro do ácido etilmalônico (EMA) sobre o potencial de membrana em preparações mitocondriais de cérebro de ratos em presença de Ca²⁺

A figura 2 demonstra o efeito do EMA (5 mM) sobre o potencial de membrana em preparações mitocondriais utilizando succinato mais rotenona como substrato respiratório.

Observamos que a adição de 20 μM de Ca^{2+} induziu uma forte redução no potencial de membrana em preparações mitocondriais incubadas com EMA. Verificamos também que esse efeito foi prevenido por RR e ADP, além de atenuado CsA e DTT.

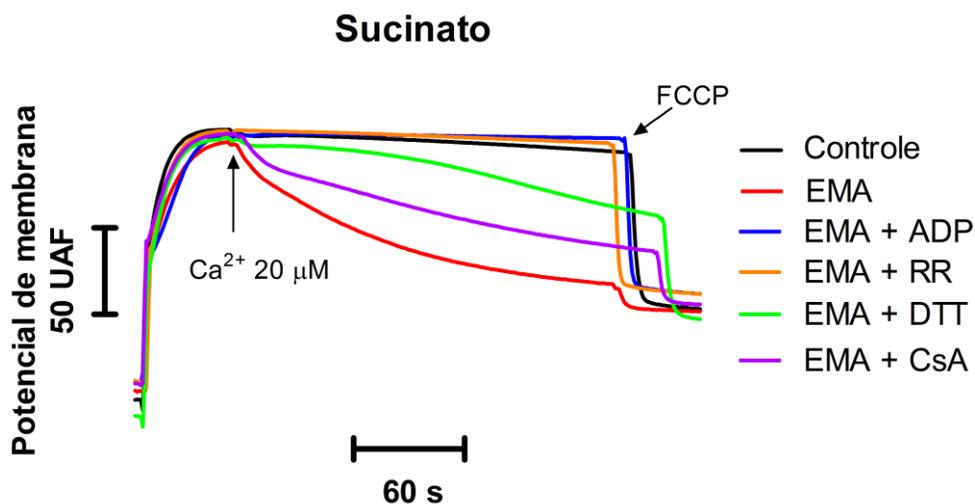


Figura 2. Efeito in vitro do ácido etilmalônico (EMA) sobre o potencial de membrana mitocondrial utilizando succinato mais rotenona como substrato respiratório. Após cinquenta segundos o Ca^{2+} foi adicionado na concentração de 20 μM ao meio de reação contendo a preparação mitocondrial (0,5 mg proteína \cdot mL⁻¹) e o EMA na concentração de 5 mM. FCCP (1 μM) foi adicionado no final das medições. Alguns experimentos foram conduzidos na presença de RR (1 μM) (inibidor do transporte uniporte do Ca^{2+}), DTT (3 mM) (agente redutor), além de ADP (300 μM) e CsA (1 μM) (inibidores do PTP), como indicado na figura. Os traços são representativos de quatro experimentos independentes e expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.).

4.2. Efeito in vitro do ácido etilmalônico (EMA) sobre o inchamento em preparações mitocondriais de cérebro de ratos em presença de Ca^{2+}

A figura 3 mostra o efeito do EMA (5 mM) sobre o inchamento em preparações mitocondriais utilizando succinato como substrato respiratório. Verificamos que a adição de 40 μM de Ca^{2+} induziu o inchamento em preparações mitocondriais incubadas com EMA. Esse efeito foi prevenido por RR, ADP e CsA.

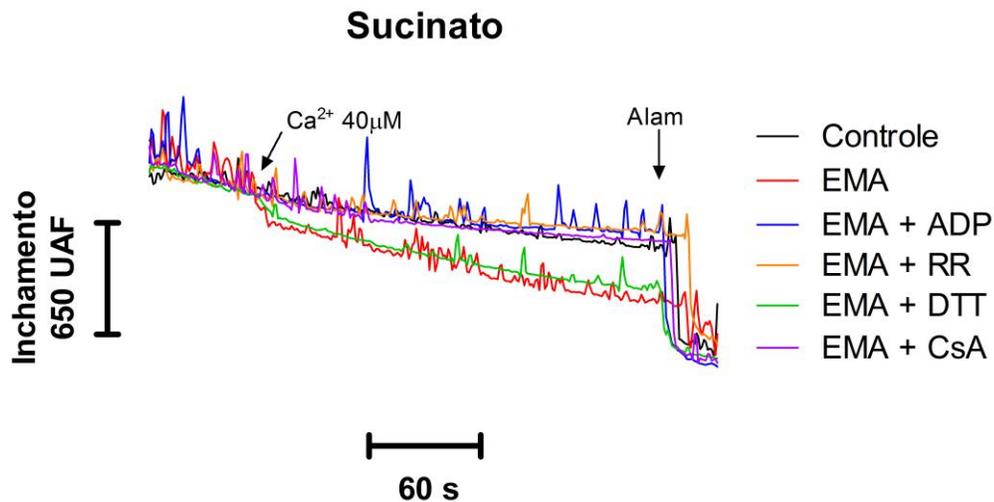


Figura 3. Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (EMA) sobre o inchamento mitocondrial utilizando succinato como substrato respiratório. Após cinquenta segundos o Ca^{2+} foi adicionado na concentração de $40 \mu\text{M}$ ao meio de reação contendo a preparação mitocondrial ($0,5 \text{ mg prote\u00edna} \cdot \text{mL}^{-1}$) e o EMA na concentração de 5 mM . Alameticina (Alam; $20 \mu\text{g/mL}$) foi adicionada no final das medições. Alguns experimentos foram conduzidos na presença de RR ($1 \mu\text{M}$) (inibidor do transporte uniporte do Ca^{2+}), DTT (3 mM) (agente redutor), além de ADP ($300 \mu\text{M}$) e CsA ($1 \mu\text{M}$) (inibidores do PTP), como indicado na figura. Os traços são representativos de quatro experimentos independentes e expressos como unidades arbitr\u00e1rias de fluoresc\u00eancia (U.A.F.).

4.3. Efeito *in vitro* do \u00e1cido etilmal\u00f4nico (EMA) sobre o conte\u00fado de NAD(P)H em prepara\u00e7\u00f5es mitocondriais de c\u00e9rebro de ratos em presen\u00e7a de Ca^{2+}

Pode ser observado na figura 4 o efeito do EMA (5 mM) sobre o conte\u00fado de NAD(P)H em prepara\u00e7\u00f5es mitocondriais utilizando succinato como substrato respirat\u00f3rio. Verificamos que a adi\u00e7\u00e3o de $20 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} diminuiu o conte\u00fado de NAD(P)H em prepara\u00e7\u00f5es mitocondriais incubadas com EMA. Esse efeito foi prevenido por RR, ADP, CsA e DTT.

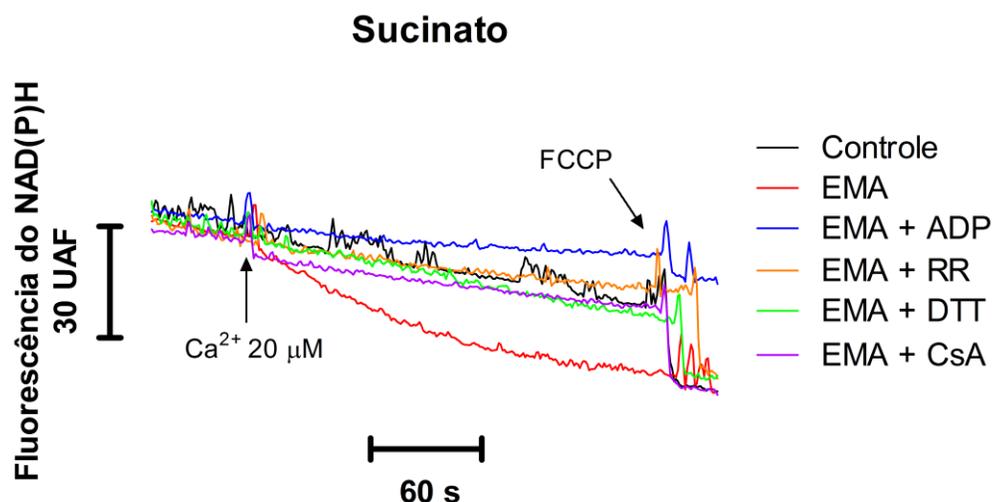


Figura 4. Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (EMA) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais utilizando succinato como substrato respiratório. Após cinquenta segundos o Ca^{2+} foi adicionado na concentração de $20 \mu\text{M}$ ao meio de reação contendo a preparação mitocondrial ($0,5 \text{ mg proteína} \cdot \text{mL}^{-1}$) e o EMA na concentração de 5 mM . FCCP ($1 \mu\text{M}$) foi adicionado no final das medições. Alguns experimentos foram conduzidos na presença de RR ($1 \mu\text{M}$) (inibidor do transporte uniporte do Ca^{2+}), DTT (3 mM) (agente redutor), além de ADP ($300 \mu\text{M}$) e CsA ($1 \mu\text{M}$) (inibidores do PTP), como indicado na figura. Os traços são representativos de quatro experimentos independentes e foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.).

4.4. Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (EMA) sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos em presença de Ca^{2+}

Finalmente, testamos o efeito do EMA (5 mM) sobre a produção de H_2O_2 em preparações mitocondriais utilizando succinato mais rotenona como substrato respiratório (figura 5). Não foram observadas importantes alterações nesse parâmetro após a adição de Ca^{2+} , comparando as preparações mitocondriais incubadas ou não com EMA.

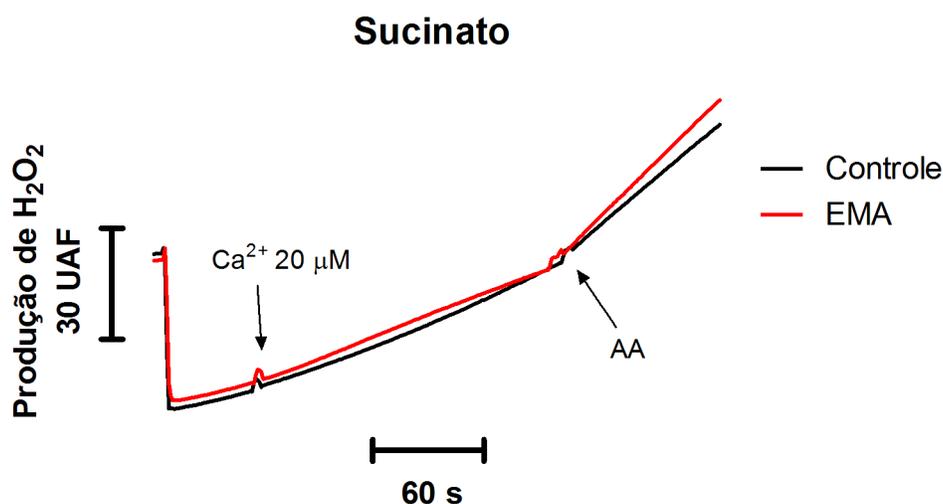


Figura 5. Efeito in vitro do ácido etilmalônico (EMA) sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em preparações mitocondriais utilizando succinato como substrato respiratório. Após cinquenta segundos o Ca²⁺ foi adicionado na concentração de 20 μM ao meio de reação contendo a preparação mitocondrial (0,5 mg proteína . mL⁻¹) e o EMA na concentração de 5 mM. Antimicina A (AA; 1 μM) foi adicionado no final das medições. Os traços são representativos de quatro experimentos independentes e foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.).

5. DISCUSSÃO

O EMA acumula-se em várias doenças metabólicas, mas com maior frequência na EE e SCADD. Apesar dos sintomas neurológicos serem severos nesses distúrbios, a patogênese do dano cerebral é pouco conhecida (Tein et al 2008; Corydon et al, 1998; Bok et al, 2003; Zafeiriou, 2007; Waisbren, 2008).

Considerando que já foi demonstrado que o EMA compromete a homeostase energética mitocondrial por diminuir o consumo de oxigênio e o potencial de membrana provavelmente por competir com o transporte de succinato e malato pelo translocador mitocondrial de dicarboxilatos (Amaral et al., 2012), podendo assim prejudicar o metabolismo mitocondrial do Ca²⁺, desencadeando um aumento nos níveis intracelulares desse cátion e induzindo a abertura do PTP (Albin and Greenamyre 1992; Fiskum et al. 1999; Nicholls e Budd 2000). Assim, avaliamos no presente estudo o efeito deste ácido sobre a bioenergética mitocondrial na presença de Ca²⁺.

Inicialmente, verificamos que o EMA foi capaz de diminuir o potencial de membrana e provocar inchamento em mitocôndrias na presença de Ca^{2+} . Além disso, foi observado que esses efeitos foram total ou parcialmente prevenidos por ADP e CsA, indicando o envolvimento da abertura do PTP nos mesmos. A CsA é um conhecido peptídeo inibidor do PTP por inativar a Cyp D, uma proteína da matriz mitocondrial envolvida na formação e abertura do PTP (Starkov, 2010), enquanto que o ADP atua na interação com o translocador de nucleotídeos (ANT), uma proteína também relacionada com a formação do PTP (Saito e Castilho, 2010; Rasola e Bernardi, 2011). Identificamos também que a adição de RR, um inibidor da captação de Ca^{2+} pela mitocôndria através do transportador uniporte (MCU), preveniu totalmente esses efeitos, indicando que os mesmos são dependentes da entrada de Ca^{2+} nessa organela, evento diretamente relacionado com a abertura do PTP. Esses resultados estão de acordo com achados anteriores que demonstraram que inibidores da oxidação do succinato, como os ácidos metilmalônico, malônico e 3-nitropropiónico, são capazes de induzir a abertura do PTP na presença de Ca^{2+} (Maciel et al., 2004; Ronchi et al., 2011). A despolarização e o inchamento mitocondrial causados pela indução do PTP pelo EMA podem levar ao aumento do volume na matriz, transporte de metabólitos pela membrana interna (por exemplo, Ca^{2+} , Mg^{2+} , glutatona e NADPH), comprometimento da fosforilação oxidativa, síntese reduzida de ATP e geração de espécies reativas, prejudicando desta forma a homeostase celular (Zoratti and Szabo, 1995; Bernardi et al., 1998; Norenberg e Rao, 2007).

Com relação ao mecanismo indutor da abertura do PTP, o ataque oxidativo por espécies reativas de oxigênio (ERO) tem sido proposto (Adam-Vizi e Starkov, 2010; Kowaltowski et al, 2001). Neste contexto, avaliamos a produção de H_2O_2 mitocondrial na presença de EMA e Ca^{2+} . Nossos resultados não evidenciaram um aumento de H_2O_2 , embora o agente redutor DTT atenuou a diminuição do potencial de membrana e a indução do inchamento mitocondrial provocados pelo EMA na presença do Ca^{2+} . No entanto, considerando que resultados anteriores *in vitro* demonstram que o EMA provoca dano oxidativo lipídico e proteico e diminui as defesas antioxidantes em homogeneizado de córtex cerebral de ratos (Schuck et al., 2010a), não podemos descartar a participação de outras espécies reativas, que não o H_2O_2 , envolvidas nos efeitos provocados pelo EMA.

Outros resultados do presente estudo reforçam a hipótese de que o EMA induz a abertura do PTP na presença de Ca^{2+} uma vez que este ácido provocou diminuição do conteúdo de

NAD(P)H e que esse efeito foi prevenido pela adição de ADP, CsA, RR ou DTT. Neste particular, a indução do PTP leva à diminuição dos equivalentes reduzidos por aumentar sua oxidação e perda através do PTP, tendo como consequência a redução da capacidade redox mitocondrial (Le-Quoc and Le-Quoc 1989; Kehrer and Lund 1994). Além disso, está descrito que altas concentrações de NADH previnem a abertura do PTP, promovendo a redução do NADP⁺ catalisada pela transidrogenase mitocondrial e consequentemente melhorando a capacidade redox da mitocôndria (Lehninger et al. 1978; Hoek and Rydstrom 1988; Zago et al. 2000; Kowaltowski et al. 2001).

É difícil determinar a relevância fisiopatológica dos nossos resultados, uma vez que para o nosso conhecimento as concentrações de EMA no cérebro de pacientes afetados por EE e SCADD ainda não estão estabelecidas. No entanto, considerando o importante papel fisiológico da mitocôndria na homeostase celular do Ca²⁺ (Budd and Nicholls 1996; Castilho et al. 1998; Stout et al. 1998), é possível que o comprometimento do metabolismo energético cerebral induzido por altas concentrações de EMA (Schuck et al., 2002; Leipnitz et al., 2003; Barschak et al., 2006; Amaral et al., 2012) esteja relacionado com um prejuízo no metabolismo mitocondrial do Ca²⁺, levando a abertura do PTP e, potencialmente, a um dano neurológico. Neste particular, a indução do PTP tem sido relacionada à morte celular por apoptose e necrose (Rasola e Bernardi, 2011), assim como com diversas doenças neurodegenerativas, tais como as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica (Calí et al., 2012; Lee e Wei, 2000; Chang et al., 2006; Forte et al., 2007; Weihofen et al., 2009; Mattson et al., 2008; Rintoul e Reynolds et al., 2010).

Concluindo, nossos presentes resultados demonstram pela primeira vez que o EMA na presença do Ca²⁺ é capaz de induzir a abertura do PTP em preparações mitocondriais de cérebro utilizando succinato como substrato. Considerando que esse processo compromete drasticamente funções mitocondriais como a síntese de ATP (Rasola e Bernardi, 2011), os efeitos provocados pelo EMA poderiam causar efeitos deletérios para a função neural, e explicar ao menos em parte as alterações neurológicas apresentadas pelos pacientes acometidos por doenças em que o EMA se acumula.

6. PERSPECTIVAS

- Verificar o efeito dose resposta do EMA sobre os mesmos parâmetros em preparações mitocondriais de cérebro de rato na presença de Ca^{2+} ;
- Verificar o efeito do EMA sobre a capacidade de retenção de Ca^{2+} em preparações mitocondriais de cérebro de rato;
- Verificar o efeito do EMA sobre a produção ATP em preparações mitocondriais de cérebro de rato na presença de Ca^{2+} ;

7. FONTE DE FINANCIAMENTO

CNPq, PROPESQ/UFRGS, FAPERGS, PRONEX, FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00, INCT-EM.

REFERÊNCIAS

ABELES R.H et al. *Biochemistry*. London: Jones and Bartlett, p. 603-632, 1992.

ADAM-VIZI, V.; STARKOV, A. A. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. **J Alzheimers Dis**, v. 20 Suppl 2, p. S413-26, 2010.

AKERMAN, K. E.; WIKSTROM, M. K. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett**, v. 68, n. 2, p. 191-7, Oct 1 1976.

ALBIN, R. L.; GREENAMYRE, J. T. Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology*, v. 42, n. 4, p. 733-8, Apr 1992.

AMARAL, A. U.; CECATTO, C.; BUSANELLO, E. N.; RIBEIRO, C. A.; MELO, D. R.; LEIPNITZ, G.; CASTILHO, R. F.; WAJNER, M. Ethylmalonic acid impairs brain mitochondrial succinate and malate transport. **Mol Genet Metab**, v. 105, n. 1, p. 84-90, Jan 2012.

AMENDT, B. A.; GREENE, C.; SWEETMAN, L.; CLOHERTY, J.; SHIH, V.; MOON, A.; TEEL, L.; RHEAD, W. J. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. Clinical and biochemical studies in two patients. **J Clin Invest**, v. 79, n. 5, p. 1303-9, May 1987.

BARIC, I.; FUMIC, K.; HOFFMANN, G. F. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. **Croat Med J**, v. 42, n. 4, p. 379-83, Aug 2001.

BARSHAK, A. G.; FERREIRA G DA, C.; ANDRE, K. R.; SCHUCK, P. F.; VIEGAS, C. M.; TONIN, A.; DUTRA FILHO, C. S.; WYSE, A. T.; WANNMACHER, C. M.; VARGAS, C. R.; WAJNER, M. Inhibition of the electron transport chain and creatine kinase activity by ethylmalonic acid in human skeletal muscle. **Metab Brain Dis**, v. 21, n. 1, p. 11-9, Mar 2006.

BEAL, M. F. Mitochondria and neurodegeneration. **Novartis Found Symp**, v. 287, p. 183-92; discussion 192-6, 2007.

BERNARDI, P.; COLONNA, R.; COSTANTINI, P.; ERIKSSON, O.; FONTAINE, E.; ICHAS, F.; MASSARI, S.; NICOLLI, A.; PETRONILLI, V.; SCORRANO, L. The mitochondrial permeability transition. **Biofactors**, p.273-81. 1998

BICKEL, H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. **Enzyme**, v. 38, n. 1-4, p. 14-26, 1987.

BHALA, A.; WILLI, S. M.; RINALDO, P.; BENNETT, M. J.; SCHMIDT-SOMMERFELD, E.; HALE, D. E. Clinical and biochemical characterization of short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. **J Pediatr**, v. 126, n. 6, p. 910-5, Jun 1995.

BOK, L. A.; VREKEN, P.; WIJBURG, F. A.; WANDERS, R. J.; GREGERSEN, N.; CORYDON, M. J.; WATERHAM, H. R.; DURAN, M. Short-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency: studies in a large family adding to the complexity of the disorder. **Pediatrics**, v. 112, n. 5, p. 1152-5, Nov 2003.

BUDD, S. L.; NICHOLLS, D. G. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **J Neurochem**, v. 67, n. 6, p. 2282-91, Dec 1996.

BURLINA, A.; ZACCHELLO, F.; DIONISI-VICI, C.; BERTINI, E.; SABETTA, G.; BENNETT, M. J.; HALE, D. E.; SCHMIDT-SOMMERFELD, E.; RINALDO, P. New clinical phenotype of branched-chain acyl-CoA oxidation defect. **Lancet**, v. 338, n. 8781, p. 1522-3, Dec 14 1991.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p. 222-30, Aug 2000.

CALI, T.; OTTOLINI, D.; BRINI, M. Mitochondrial Ca⁽²⁺⁾ and neurodegeneration. **Cell Calcium**, v. 52, n. 1, p. 73-85, Jul 2012.

CASTILHO, R. F.; HANSSON, O.; WARD, M. W.; BUDD, S. L.; NICHOLLS, D. G. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **J Neurosci**, v. 18, n. 24, p. 10277-86, Dec 15 1998.

CHANG, D. T.; RINTOUL, G. L.; PANDIPATI, S.; REYNOLDS, I. J. Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. **Neurobiol Dis**, v. 22, n. 2, p. 388-400, May 2006.

CORYDON, M. J.; GREGERSEN, N.; LEHNERT, W.; RIBES, A.; RINALDO, P.; KMOCH, S.; CHRISTENSEN, E.; KRISTENSEN, T. J.; ANDRESEN, B. S.; BROSS, P.; WINTER, V.; MARTINEZ, G.; NEVE, S.; JENSEN, T. G.; BOLUND, L.; KOLVRAA, S. Ethylmalonic

aciduria is associated with an amino acid variant of short chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. **Pediatr Res**, v. 39, n. 6, p. 1059-66, Jun 1996.

CORYDON, M. J.; VOCKLEY, J.; RINALDO, P.; RHEAD, W. J.; KJELDSSEN, M.; WINTER, V.; RIGGS, C.; BABOVIC-VUKSANOVIC, D.; SMEITINK, J.; DE JONG, J.; LEVY, H.; SEWELL, A. C.; ROE, C.; MATERN, D.; DASOUKI, M.; GREGERSEN, N. Role of common gene variations in the molecular pathogenesis of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Pediatr Res**, v. 49, n. 1, p. 18-23, Jan 2001.

CORYDON, T. J.; BROSS, P.; JENSEN, T. G.; CORYDON, M. J.; LUND, T. B.; JENSEN, U. B.; KIM, J. J.; GREGERSEN, N.; BOLUND, L. Rapid degradation of short-chain acyl-CoA dehydrogenase variants with temperature-sensitive folding defects occurs after import into mitochondria. **J Biol Chem**, v. 273, n. 21, p. 13065-71, May 22 1998.

DROUSIOTOU, A.; DIMEO, I.; MINERI, R.; GEORGIU, 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.

FERREIRA, G. C.; TONIN, A.; SCHUCK, P. F.; VIEGAS, C. M.; CEOLATO, P. C.; LATINI, A.; PERRY, M. L.; WYSE, A. T.; DUTRA-FILHO, C. S.; WANNMACHER, C. M.; VARGAS, C. R.; WAJNER, M. Evidence for a synergistic action of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids disturbing rat brain energy metabolism. **Int J Dev Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 391-8, Oct 2007.

FISKUM, G.; MURPHY, A. N.; BEAL, M. F. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 19, n. 4, p. 351-69, Apr 1999.

FORTE, M.; GOLD, B. G.; MARRACCI, G.; CHAUDHARY, P.; BASSO, E.; JOHNSEN, D.; YU, X.; FOWLKES, J.; RAHDER, M.; STEM, K.; BERNARDI, P.; BOURDETTE, D. Cyclophilin D inactivation protects axons in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 18, p. 7558-63, May 1 2007.

GARCIA-SILVA, M. T.; RIBES, A.; CAMPOS, Y.; GARAVAGLIA, B.; ARENAS, J. Syndrome of encephalopathy, petechiae, and ethylmalonic aciduria. **Pediatr Neurol**, v. 17, n. 2, p. 165-70, Sep 1997.

GIL, J. M.; REGO, A. C. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 11, p. 2803-20, Jun 2008.

GREGERSEN, N.; WINTER, V. S.; CORYDON, M. J.; CORYDON, T. J.; RINALDO, P.; RIBES, A.; MARTINEZ, G.; BENNETT, M. J.; VIANEY-SABAN, C.; BHALA, A.; HALE, D. E.; LEHNERT, W.; KMOCH, S.; ROIG, M.; RIUDOR, E.; EIBERG, H.; ANDRESEN, B. S.; BROSS, P.; BOLUND, L. A.; KOLVRAA, S. Identification of four new mutations in the short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) gene in two patients: one of the variant alleles, 511C-->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 Genet**, v. 7, n. 4, p. 619-27, Apr 1998.

HAN, D.; WILLIAMS, E.; CADENAS, E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. **Biochem J**, v. 353, n. Pt 2, p. 411-6, Jan 15 2001.

HOEK, J. B.; RYDSTROM, J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. **Biochem J**, v. 254, n. 1, p. 1-10, Aug 15 1988.

JETHVA, R.; BENNETT, M. J.; VOCKLEY, J. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. **Mol Genet Metab**, v. 95, n. 4, p. 195-200, Dec 2008.

KEHRER, J. P.; LUND, L. G. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 17, n. 1, p. 65-75, Jul 1994.

KIM, J. S.; HE, L.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 304, n. 3, p. 463-70, May 9 2003.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, v. 495, n. 1-2, p. 12-5, Apr 20 2001.

LEE, H. C.; WEI, Y. H. Mitochondrial role in life and death of the cell. **J Biomed Sci**, v. 7, n. 1, p. 2-15, Jan-Feb 2000.

LATINI, A.; DA SILVA, C. G.; FERREIRA, G. C.; SCHUCK, P. F.; SCUSSIATO, K.; SARKIS, J. J.; DUTRA FILHO, C. S.; WYSE, A. T.; WANNMACHER, C. M.; WAJNER, M.

Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. **Mol Genet Metab**, v. 86, n. 1-2, p. 188-99, Sep-Oct 2005.

LEHNINGER, A. L.; VERCESI, A.; BABABUNMI, E. A. Regulation of Ca²⁺ release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 4, p. 1690-4, Apr 1978.

LEIPNITZ, G.; SCHUCK, P. F.; RIBEIRO, C. A.; DALCIN, K. B.; ASSIS, D. R.; BARSCHAK, A. G.; PULROLNIK, V.; WANNMACHER, C. M.; WYSE, A. T.; WAJNER, M. Ethylmalonic acid inhibits mitochondrial creatine kinase activity from cerebral cortex of young rats in vitro. **Neurochem Res**, v. 28, n. 5, p. 771-7, May 2003.

LE-QUOC, D.; LE-QUOC, K. Relationships between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation, and inner membrane permeability in rat liver mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, v. 273, n. 2, p. 466-78, Sep 1989.

LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, n. 1, p. 147-57, Jul 12 1996.

MACIEL, E. N.; KOWALTOWSKI, A. J.; SCHWALM, F. D.; RODRIGUES, J. M.; SOUZA, D. O.; VERCESI, A. E.; WAJNER, M.; CASTILHO, R. F. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca²⁺ and respiratory chain complex II inhibition. **J Neurochem**, v. 90, n. 5, p. 1025-35, Sep 2004.

MATTSON, M. P.; GLEICHMANN, M.; CHENG, A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. **Neuron**, v. 60, n. 5, p. 748-66, Dec 10 2008.

MIRANDOLA, S. R.; MELO, D. R.; SCHUCK, P. F.; FERREIRA, G. C.; WAJNER, M.; CASTILHO, R. F. Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. **J Inherit Metab Dis**, v. 31, n. 1, p. 44-54, Feb 2008.

MOHANTY, J. G.; JAFFE, J. S.; SCHULMAN, E. S.; RAIBLE, D. G. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. **J Immunol Methods**, v. 202, n. 2, p. 133-41, Mar 28 1997.

MOSHAL, K. S.; METREVELI, N.; FRANK, I.; TYAGI, S. C. Mitochondrial MMP activation, dysfunction and arrhythmogenesis in hyperhomocysteinemia. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 6, n. 2, p. 84-92, Apr 2008.

NAGAN, N.; KRUCKEBERG, K. E.; TAUSCHER, A. L.; BAILEY, K. S.; RINALDO, P.; MATERN, D. The frequency of short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene variants in the US population and correlation with the C(4)-acylcarnitine concentration in newborn blood spots. **Mol Genet Metab**, v. 78, n. 4, p. 239-46, Apr 2003.

NELSON D.L.; COX M.M. Lehninger, *Principles of Biochemistry*. 3. ed. New York: Worth Publishers, 2000.

NICHOLLS, D.; AKERMAN, K. Mitochondrial calcium transport. **Biochim Biophys Acta**, v. 683, n. 1, p. 57-88, Sep 1 1982.

NICHOLLS, D. G.; BUDD, S. L. Mitochondria and neuronal survival. **Physiol Rev**, v. 80, n. 1, p. 315-60, Jan 2000.

NIEMINEN, A. L.; PETRIE, T. G.; LEMASTERS, J. J.; SELMAN, W. R. Cyclosporin A delays mitochondrial depolarization induced by N-methyl-D-aspartate in cortical neurons: evidence of the mitochondrial permeability transition. **Neuroscience**, v. 75, n. 4, p. 993-7, Dec 1996.

NORENBERG, M. D.; RAO, K. V. The mitochondrial permeability transition in neurologic disease. **Neurochem Int**, v. 50, n. 7-8, p. 983-97, Jun 2007.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 7, p. 552-65, Jul 2003.

PEDERSEN, C. B.; BROSS, P.; WINTER, V. S.; CORYDON, T. J.; BOLUND, L.; BARTLETT, K.; VOCKLEY, J.; GREGERSEN, N. Misfolding, degradation, and aggregation of variant proteins. The molecular pathogenesis of short chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency. **J Biol Chem**, v. 278, n. 48, p. 47449-58, Nov 28 2003.

PEDERSEN, C. B.; ZOLKIPLI, Z.; VANG, S.; PALMFELDT, J.; KJELDSSEN, M.; STENBROEN, V.; SCHMIDT, S. P.; WANDERS, R. J.; RUITER, J. P.; WIBRAND, F.; TEIN, I.; GREGERSEN, N. Antioxidant dysfunction: potential risk for neurotoxicity in ethylmalonic aciduria. **J Inherit Metab Dis**, v. 33, n. 3, p. 211-22, Jun 2010.

PETERSEN, A.; CASTILHO, R. F.; HANSSON, O.; WIELOCH, T.; BRUNDIN, P. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition and activation of caspases in calcium ionophore A23187-induced death of cultured striatal neurons. **Brain Res**, v. 857, n. 1-2, p. 20-9, Feb 28 2000.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. **Cell Calcium**, v. 50, n. 3, p. 222-33, Sep 2011.

REIS DE ASSIS, D.; MARIA RDE, C.; BORBA ROSA, R.; SCHUCK, P. F.; RIBEIRO, C. A.; DA COSTA FERREIRA, G.; DUTRA-FILHO, C. S.; TEREZINHA DE SOUZA WYSE, A.; DUVAL WANNMACHER, C. M.; SANTOS PERRY, M. L.; WAJNER, M. Inhibition of energy metabolism in cerebral cortex of young rats by the medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency. **Brain Res**, v. 1030, n. 1, p. 141-51, Dec 24 2004.

REDDY, P. H.; BEAL, M. F. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. **Trends Mol Med**, v. 14, n. 2, p. 45-53, Feb 2008.

RIBEIRO, C. A.; SGARAVATTI, A. M.; ROSA, R. B.; SCHUCK, P. F.; GRANDO, V.; SCHMIDT, A. L.; FERREIRA, G. C.; PERRY, M. L.; DUTRA-FILHO, C. S.; WAJNER, M. Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. **Neurochem Res**, v. 33, n. 1, p. 114-24, Jan 2008.

RINTOUL, G. L.; REYNOLDS, I. J. Mitochondrial trafficking and morphology in neuronal injury. **Biochim Biophys Acta**, v. 1802, n. 1, p. 143-50, Jan 2010.

RIZZUTO, R.; DE STEFANI, D.; RAFFAELLO, A.; MAMMUCARI, C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 9, p. 566-78, Sep 2012.

RONCHI, J. A.; VERCESI, A. E.; CASTILHO, R. F. Reactive oxygen species and permeability transition pore in rat liver and kidney mitoplasts. **J Bioenerg Biomembr**, v. 43, n. 6, p. 709-15, Dec 2011.

ROSENTHAL, R. E.; HAMUD, F.; FISKUM, G.; VARGHESE, P. J.; SHARPE, S. Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 7, n. 6, p. 752-8, Dec 1987.

SAITO, A.; CASTILHO, R. F. Inhibitory effects of adenine nucleotides on brain mitochondrial permeability transition. **Neurochem Res**, v. 35, n. 11, p. 1667-74, Nov 2010.

SASAKI, S.; HORIE, Y.; IWATA, M. Mitochondrial alterations in dorsal root ganglion cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Acta Neuropathol**, v. 114, n. 6, p. 633-9, Dec 2007.

SCHINDER, A. F.; OLSON, E. C.; SPITZER, N. C.; MONTAL, M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. **J Neurosci**, v. 16, n. 19, p. 6125-33, Oct 1 1996.

SCHUCK, P. F.; LEIPNITZ, G.; RIBEIRO, C. A.; DALCIN, K. B.; ASSIS, D. R.; BARSCHAK, A. G.; PULROLNIK, V.; WANNMACHER, C. M.; WYSE, A. T.; WAJNER, M. Inhibition of creatine kinase activity in vitro by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. **Neurochem Res**, v. 27, n. 12, p. 1633-9, Dec 2002.

SCHUCK, P. F.; FERREIRA GDA, C.; VIEGAS, C. M.; TONIN, A. M.; BUSANELLO, E. N.; PETTENUZZO, L. F.; NETTO, C. A.; WAJNER, M. Chronic early postnatal administration of ethylmalonic acid to rats causes behavioral deficit. **Behav Brain Res**, v. 197, n. 2, p. 364-70, Feb 11 2009.

SCHUCK, P. F.; BUSANELLO, E. N.; MOURA, A. P.; TONIN, A. M.; GRINGS, M.; RITTER, L.; VARGAS, C. R.; DA COSTA FERREIRA, G.; WAJNER, M. Promotion of lipid and protein oxidative damage in rat brain by ethylmalonic acid. **Neurochem Res**, v. 35, n. 2, p. 298-305, Feb 2010a.

SCHUCK, P. F.; FERREIRA GDA, C.; TAHARA, E. B.; KLAMT, F.; KOWALTOWSKI, A. J.; WAJNER, M. cis-4-decenoic acid provokes mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. **Life Sci**, v. 87, n. 5-6, p. 139-46, Jul 31 2010b.

SCRIVER C. R., BEAUDET A. L., SLY W. S., VALLE D., editores. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8 ed. New York: McGraw-Hill Inc, 2001. p. 3-45.

STARKOV, A. A. The molecular identity of the mitochondrial Ca²⁺ sequestration system. **FEBS J**, v. 277, n. 18, p. 3652-63, Sep 2010.

STOUT, A. K.; RAPHAEL, H. M.; KANTEREWICZ, B. I.; KLANN, E.; REYNOLDS, I. J. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. **Nat Neurosci**, v. 1, n. 5, p. 366-73, Sep 1998.

TAKAMURA, A.; HIGAKI, K.; KAJIMAKI, K.; OTSUKA, S.; NINOMIYA, H.; MATSUDA, J.; OHNO, K.; SUZUKI, Y.; NANBA, E. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 367, n. 3, p. 616-22, Mar 14 2008.

TEIN, I.; ELPELEG, O.; BEN-ZEEV, B.; KORMAN, S. H.; LOSSOS, A.; LEV, D.; LERMAN-SAGIE, T.; LESHINSKY-SILVER, E.; VOCKLEY, J.; BERRY, G. T.; LAMHONWAH, A. M.; MATERN, D.; ROE, C. R.; GREGERSEN, N. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene mutation (c.319C>T) presents with clinical heterogeneity and is candidate founder mutation in individuals of Ashkenazi Jewish origin. **Mol Genet Metab**, v. 93, n. 2, p. 179-89, Feb 2008.

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.; OWALDHA, 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.

UCHINO, H.; ELMER, E.; UCHINO, K.; LI, P. A.; HE, Q. P.; SMITH, M. L.; SIESJO, B. K. Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. **Brain Res**, v. 812, n. 1-2, p. 216-26, Nov 23 1998.

VAN MALDEGEM, B. T.; DURAN, M.; WANDERS, R. J.; NIEZEN-KONING, K. E.; HOGEVEEN, M.; IJLST, L.; WATERHAM, H. R.; WIJBURG, F. A. Clinical, biochemical, and genetic heterogeneity in short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. **JAMA**, v. 296, n. 8, p. 943-52, Aug 23 2006.

VIEGAS, C. M.; DA COSTA FERREIRA, G.; SCHUCK, P. F.; TONIN, A. M.; ZANATTA, A.; DE SOUZA WYSE, A. T.; DUTRA-FILHO, C. S.; WANNMACHER, C. M.; WAJNER, M. Evidence that 3-hydroxyisobutyric acid inhibits key enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of young rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 26, n. 3-4, p. 293-9, May-Jun 2008.

VILA, M.; RAMONET, D.; PERIER, C. Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues. **J Neurochem**, v. 107, n. 2, p. 317-28, Oct 2008.

WAISBREN, S. E.; LEVY, H. L.; NOBLE, M.; MATERN, D.; GREGERSEN, N.; PASLEY, K.; MARSDEN, D. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency: an examination of the medical and neurodevelopmental characteristics of 14 cases identified through newborn screening or clinical symptoms. **Mol Genet Metab**, v. 95, n. 1-2, p. 39-45, Sep-Oct 2008.

WEIHOFEN, A.; THOMAS, K. J.; OSTASZEWSKI, B. L.; COOKSON, M. R.; SELKOE, D. J. Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. **Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 2045-52, Mar 10 2009.

WILCKEN, B.; WILEY, V.; HAMMOND, J.; CARPENTER, K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. **N Engl J Med**, v. 348, n. 23, p. 2304-12, Jun 5 2003.

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.

ZAGO, E. B.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. The redox state of endogenous pyridine nucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the permeability transition pore. **FEBS Lett**, v. 478, n. 1-2, p. 29-33, Jul 28 2000.

ZOLKIPLI, Z.; PEDERSEN, C. B.; LAMHONWAH, A. M.; GREGERSEN, N.; TEIN, I. Vulnerability to oxidative stress in vitro in pathophysiology of mitochondrial short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: response to antioxidants. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e17534, 2011.

ZORATTI, M.; SZABO, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim Biophys Acta**, v. 1241, n. 2, p. 139-76, Jul 17 1995.

ZUGNO, A. I.; SCHERER, E. B.; SCHUCK, P. F.; OLIVEIRA, D. L.; WOFCHUK, S.; WANNMACHER, C. M.; WAJNER, M.; WYSE, A. T. Intrastratial administration of guanidinoacetate inhibits Na⁺, K⁺-ATPase and creatine kinase activities in rat striatum. **Metab Brain Dis**, v. 21, n. 1, p. 41-50, Mar 2006.