

## Introdução

O acúmulo do ácido metilcítico (2MC) em tecidos e líquidos biológicos é uma característica bioquímica das acidemias metilmalônica e propiônica. Embora os pacientes afetados por essas acidemias orgânicas apresentem dano cerebral progressivo e severo caracterizado principalmente por anormalidades em córtex cerebral e gânglios de base, pouco se tem investigado sobre o papel do 2MC na fisiopatologia dessas doenças.

## Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito *in vitro* do 2MC (0,1 mM – 1 mM) sobre parâmetros da bioenergética em mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos jovens.

## Material e métodos

Para a obtenção das preparações mitocondriais, o cérebro foi homogeneizado em tampão com EGTA e submetido a uma série de centrifugações, sendo que o sedimento final contendo a fração enriquecida em mitocôndrias foi ressuspenso em tampão sem EGTA em uma concentração proteica de 20 mg/mL, a qual foi utilizada nos ensaios. Foram analisados os parâmetros respiratórios estados 3 e 4 da respiração mitocondrial, a razão de controle respiratório (RCR) e o estado desacoplado (estimulado por CCCP) [1], além do conteúdo de ATP [2] e as atividades das enzimas glutamato desidrogenase (GDH) [3],  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase ( $\alpha$ KGDH) [4], succinato desidrogenase (SDH) [5] e malato desidrogenase (MDH) [6]. Os parâmetros respiratórios foram determinados através da medida do consumo de oxigênio utilizando glutamato/malato, piruvato/malato,  $\alpha$ -cetoglutarato ou succinato como substratos.

## Resultados

Foi observado que o 2MC diminuiu significativamente o estado 3, RCR e estado desacoplado utilizando glutamato/malato como substrato (figura 1), sem alterações significativas quando foram usados piruvato/malato (figura 2),  $\alpha$ -cetoglutarato (figura 3) ou succinato (figura 4). O 2MC também diminuiu o conteúdo de ATP (figura 5) quando as preparações mitocondriais foram estimuladas por glutamato/malato. Além disso, verificamos que o 2MC diminuiu a atividade da GDH (figura 6) sem alterar as atividades da  $\alpha$ KGDH (figura 7), SDH (figura 8) e MDH (figura 9).

### Glutamato/malato

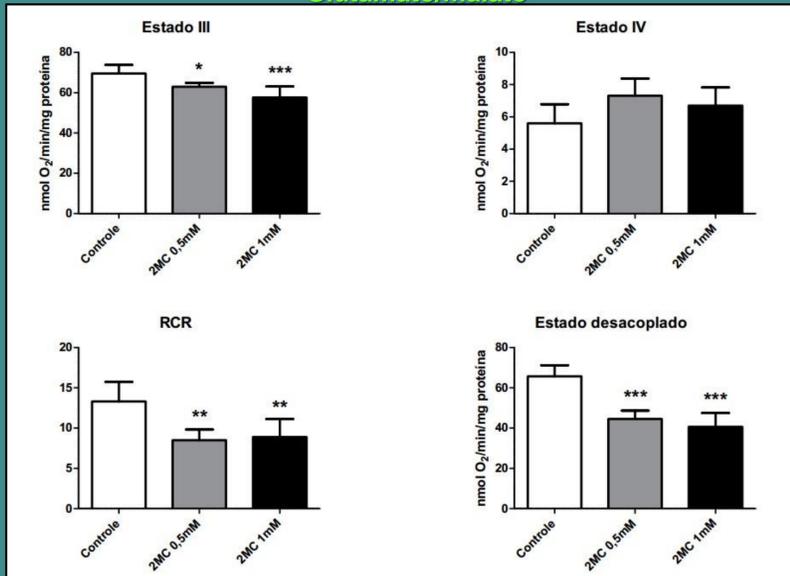


Figura 1. Efeito *in vitro* do ácido metilcítico (2MC) sobre o consumo de oxigênio no estado 4 (estimulado por oligomicina), estado 3 (estimulado por ADP), razão de controle respiratório (RCR) e estado desacoplado (estimulado por CCCP) utilizando-se glutamato/malato como substrato. 2MC (0,5 e 1 mM) foi adicionado ao meio de incubação contendo as preparações mitocondriais (0,75 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína). Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão para três experimentos independentes (animais). \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 comparado aos controles (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

### Piruvato/malato

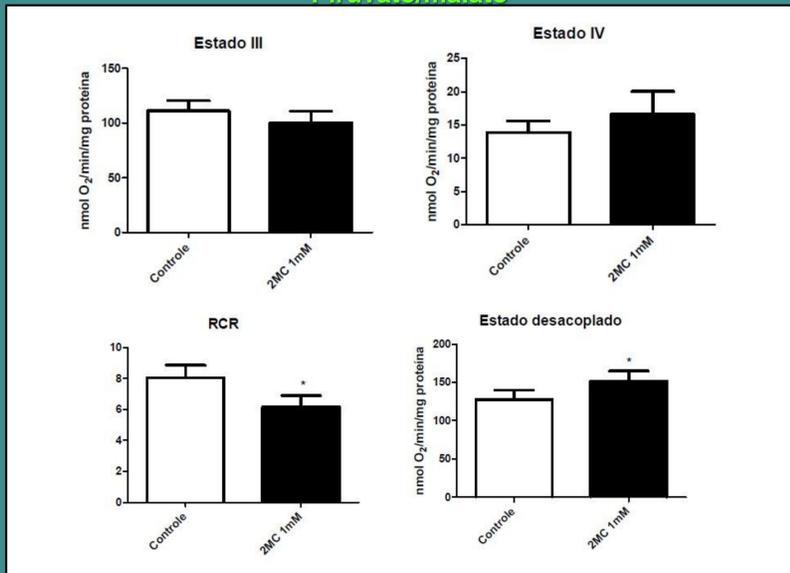


Figura 2. Efeito *in vitro* do ácido metilcítico (2MC) sobre o consumo de oxigênio no estado 4 (estimulado por oligomicina), estado 3 (estimulado por ADP), razão de controle respiratório (RCR) e estado desacoplado (estimulado por CCCP) utilizando-se piruvato/malato como substrato. 2MC (1 mM) foi adicionado ao meio de incubação contendo as preparações mitocondriais (0,75 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína). Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão para três experimentos independentes (animais). \*P<0,05 comparado aos controles (teste t de Student).

### Referências:

- Schuck, P. F., et al. Life Sci. 2010. 87(5-6): p. 139-46.
- Busanello, E.N., et al. Life Sci. 2014. 94(1): p. 67-73.
- Colon, A. D. et al. J Neurochem. 1986. 46(6): p. 1811-9.
- Lai, J. and A. Cooper. J Neurochem. 1986. 47(5): p. 1376-86.
- Fischer, J., et al. Clin Chim Acta. 1985. 153(1): p. 23-36.
- Kitto, G.B. Methods in enzymology. J.M. Lowenstein, Editor. 1969, Academic Press: New York. p. 106.

### $\alpha$ -cetoglutarato

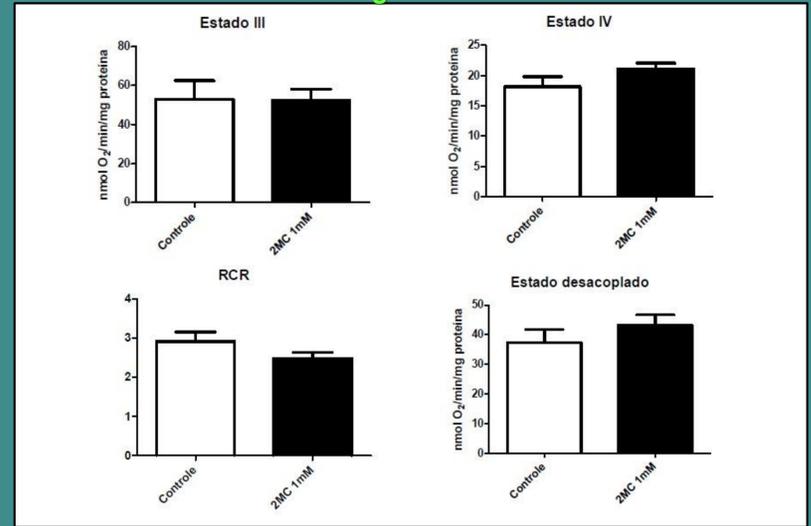


Figura 3. Efeito *in vitro* do ácido metilcítico (2MC) sobre o consumo de oxigênio no estado 4 (estimulado por oligomicina), estado 3 (estimulado por ADP), razão de controle respiratório (RCR) e estado desacoplado (estimulado por CCCP) utilizando-se  $\alpha$ -cetoglutarato como substrato. 2MC (1 mM) foi adicionado ao meio de incubação contendo as preparações mitocondriais (0,75 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína). Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão para três experimentos independentes (animais). Não foram encontradas diferenças significativas entre os vários grupos testados (Teste t de Student).

### Succinato

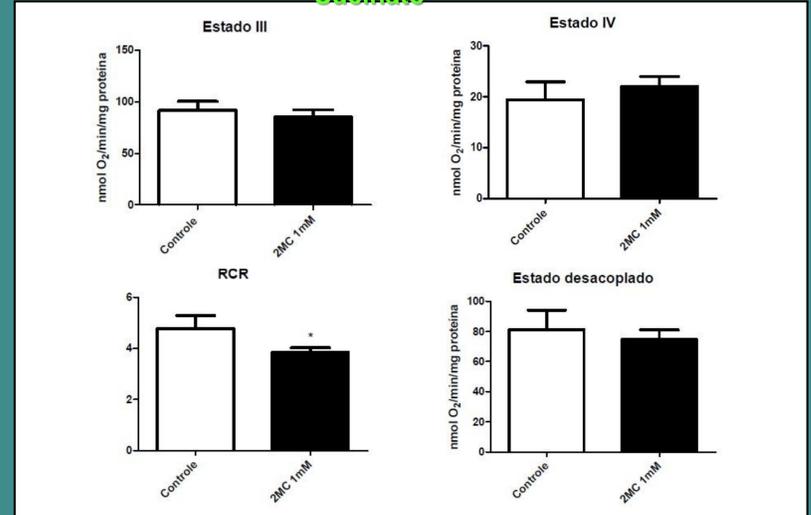


Figura 4. Efeito *in vitro* do ácido metilcítico (2MC) sobre o consumo de oxigênio no estado 4 (estimulado por oligomicina), estado 3 (estimulado por ADP), razão de controle respiratório (RCR) e estado desacoplado (estimulado por CCCP) utilizando-se succinato como substrato. 2MC (1 mM) foi adicionado ao meio de incubação contendo as preparações mitocondriais (0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína). Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão para três experimentos independentes (animais). \*P<0,05 comparado aos controles (Teste t de Student).

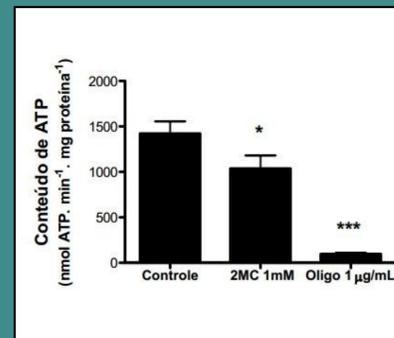


Figura 5. Efeito *in vitro* do ácido metilcítico (2MC) sobre o conteúdo de ATP em preparações mitocondriais usando glutamato/malato como substratos respiratórios. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão para seis experimentos independentes (animais) e estão expressos em nmol ATP min<sup>-1</sup> mg proteina<sup>-1</sup>. Oligomicina A (Oligo, 1 µM mL<sup>-1</sup>) foi usada como controle positivo. \*P<0,05; \*\*\*P<0,001 comparado ao controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

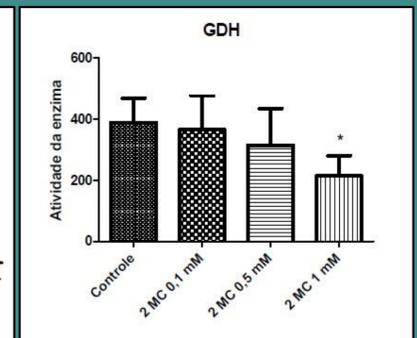


Figura 6. Efeito *in vitro* do ácido metilcítico (2MC) sobre a atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH) nas concentrações de 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM. Os valores são as médias  $\pm$  desvio padrão para seis experimentos independentes (animais). \*P<0,05 comparado ao controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

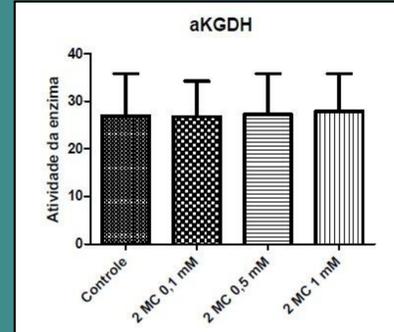


Figura 7. Efeito *in vitro* do ácido metilcítico (2MC) sobre a atividade da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase ( $\alpha$ KGDH) nas concentrações de 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM. Os valores são as médias  $\pm$  desvio padrão para seis experimentos independentes (animais). Não foram encontradas diferenças significativas entre os vários grupos testados (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

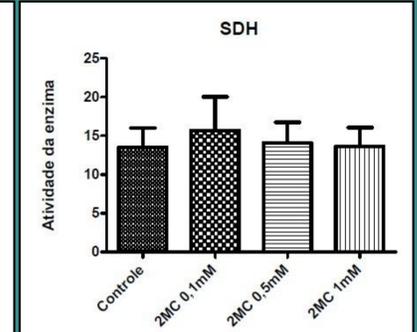


Figura 8. Efeito *in vitro* do ácido metilcítico (2MC) sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) nas concentrações de 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM. Os valores são as médias  $\pm$  desvio padrão para seis experimentos independentes (animais). Não foram encontradas diferenças significativas entre os vários grupos testados (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

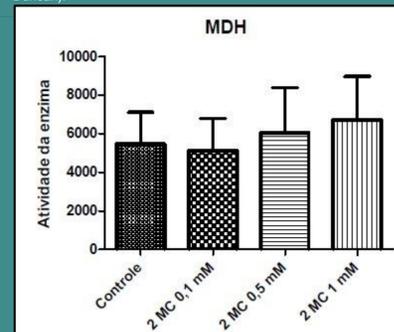


Figura 9. Efeito *in vitro* do ácido metilcítico (2MC) sobre a atividade da enzima malato desidrogenase (MDH) nas concentrações de 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM. Os valores são as médias  $\pm$  desvio padrão para seis experimentos independentes (animais). Não foram encontradas diferenças significativas entre os vários grupos testados (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

## Discussão

Nossos resultados indicam que o 2MC atua como inibidor metabólico comprometendo a síntese mitocondrial de ATP, os quais estão possivelmente relacionados com um efeito inibitório sobre a atividade da GDH provocado por esse composto. Portanto, presume-se que tais efeitos deletérios podem comprometer o metabolismo energético cerebral e contribuir, ao menos em parte, para as alterações neurológicas apresentadas pelos pacientes acometidos pelas doenças em que o 2MC se acumula.