

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Graduação em Biomedicina

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS *IN VIVO* DOS ÁCIDOS
METILMALÔNICO E PROPIÔNICO SOBRE PARÂMETROS DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM CORAÇÃO DE RATOS**

LEONARDO DE MOURA ALVORCEM

Porto Alegre, 2014

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Graduação em Biomedicina

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS *IN VIVO* DOS ÁCIDOS
METILMALÔNICO E PROPIÔNICO SOBRE PARÂMETROS DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM CORAÇÃO DE RATOS**

Leonardo de Moura Alvorcem

Orientador:

Prof. Dr. Guilhian Leipnitz

Co-orientadora:

M.Sc. Alana Pimentel

Trabalho Experimental do Estágio em Pesquisa e Monografia
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Porto Alegre, 2014

SUMÁRIO

RESUMO	4
1 - INTRODUÇÃO	5
1.1. Acidúria Metilmalônica	5
1.2. Acidúria Propiônica	5
1.3. Achados clínicos e neuropatológicos	7
1.4. Diagnóstico	8
1.5. Prognóstico e tratamento	9
1.6. Fisiopatologia	9
1.6.1. Acidúria Metilmalônica	9
1.6.2. Acidúria Propiônica	10
2 – OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Animais	13
3.2. Gerenciamento de resíduos químicos e biológicos	13
3.3. Estudos <i>in vivo</i>	13
3.4. Preparação das amostras para análise dos parâmetros de estresse oxidativo	14
3.5. Descrição das técnicas bioquímicas a serem utilizadas	14
3.6. Dosagem de proteínas	16
3.7. Análise Estatística	16
4 – RESULTADOS	17
5 – DISCUSSÃO	21
6 – PERSPECTIVAS	23
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

RESUMO

As acidúrias metilmalônica e propiônica são doenças que afetam o catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada e ácidos graxos de cadeia ímpar e são causadas pelas deficiências das enzimas metilmalonil-CoA mutase e propionil-CoA carboxilase, respectivamente. Esses distúrbios são bioquimicamente caracterizados pelo acúmulo tecidual e elevada excreção urinária dos ácidos metilmalônico (MMA) e propiônico (PA). Os sintomas apresentados pelos portadores dessas acidúrias são muito semelhantes e incluem manifestações neurológicas, além de dano cardíaco. Considerando que a etiopatogenia do dano cardíaco que acomete os indivíduos afetados por estas doenças ainda não foi estudada, o presente estudo teve por objetivo investigar o efeito agudo dos ácidos MMA e PA sobre parâmetros de estresse oxidativo em coração de ratos adolescentes. Foram realizadas 3 injeções intraperitoneais (a primeira injeção na dose de 10 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal seguida de duas com dose de 5 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal) com intervalo de 90 min entre cada uma delas, e eutanásia dos animais 60 min após a última administração. Foram então preparados sobrenadantes de coração, os quais foram utilizados para a avaliação dos parâmetros bioquímicos. Verificamos que o MMA e o PA diminuíram as concentrações de glutathiona em coração de ratos. Além disso, ambos os ácidos orgânicos diminuíram a atividade da superóxido dismutase e glutathiona peroxidase, ao passo que apenas o MMA diminuiu significativamente a atividade da catalase. Contudo, nenhum dos metabólitos alterou os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Nossos resultados indicam que alterações nas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas causadas pela administração de MMA e PA podem contribuir para a fisiopatologia do dano cardíaco observado nos pacientes afetados pelas acidúrias metilmalônica e propiônica.

1. INTRODUÇÃO

As acidúrias orgânicas são doenças metabólicas hereditárias caracterizadas pelo acúmulo tecidual e elevada excreção urinária de ácidos orgânicos produzidos no metabolismo intermediário (SCRIVER *et al.*, 2001). As acidúrias orgânicas de cadeia ramificada são um grupo de distúrbios resultantes de uma anormalidade hereditária de enzimas específicas que envolvem o catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada, ácidos graxos de cadeia ímpar, entre outros compostos. Dentre elas estão as acidúrias metilmalônica e propiônica (OGIER DE BAULNY e SAUDUBRAY, 2002).

1.1. Acidúria metilmalônica

A acidúria metilmalônica corresponde a um grupo de doenças geneticamente heterogêneas do metabolismo do metilmalonato e da cobalamina caracterizadas pelo acúmulo predominante de ácido metilmalônico (MMA) no plasma e líquido (3 mM) e na urina (1.000 – 10.000 mmol/mol de creatina) dos pacientes afetados (FENTON *et al.*, 2001; MANOLI e VENDITTI, 2010). Este acúmulo de MMA geralmente se associa à produção aumentada de alguns derivados, tais como propionil-CoA, ácido 2-metilcítrico, β -hidroxipropionato e butanona.

A acidúria metilmalônica causada pela deficiência da enzima metilmalonil-CoA mutase (MCM), a qual é dependente de adenosilcobalamina (uma forma da vitamina B12) (Figura 1), é uma doença de caráter autossômico recessivo com uma incidência aproximada de 1:50.000 recém-nascidos vivos. A MCM é encontrada na forma de um dímero com subunidades idênticas (α_2) e é codificada pelo gene *MUT* que está localizado no cromossomo 6p21.2-p12 (DEODATO *et al.*, 2006). As variantes mais comuns da acidúria metilmalônica são a mut⁰, na qual a enzima MCM está totalmente inativa, e a mut⁻, que apresenta de 2 a 75 % da atividade normal (DEODATO *et al.*, 2006). Mais de 80 mutações para esse gene já foram descritas. Por outro lado, a acidúria metilmalônica também pode acontecer devido a defeitos genéticos na síntese da coenzima adenosilcobalamina e é classificada de acordo com 2 diferentes grupos de complementação: *cblA*, causado por mutação no gene *MMAA* no cromossomo 4q31; e *cblB*, causado por mutação no gene *MMAB* no cromossomo 12q24 (OGIER DE BAULNY e SAUDUBRAY, 2002; DEODATO *et al.*, 2006).

1.2. Acidúria propiônica

A acidúria propiônica é uma doença de caráter autossômico recessivo causada pela deficiência na atividade da propionil-CoA carboxilase (PCC), uma enzima mitocondrial e

dependente de biotina (Figura 1). Essa enzima é formada por subunidades α e β não-idênticas (holocarboxilase $\alpha\beta$) e a coenzima biotina encontra-se ligada à subunidade α . A subunidade α é codificada pelo gene *PCCA* localizado no cromossomo 13q32, ao passo que a subunidade β é codificada pelo gene *PCCB* do cromossomo 3q13.3-q22 (FENTON *et al.*, 2001; DEODATO *et al.*, 2006).

A acidúria propiônica apresenta uma incidência de 1:50.000 recém-nascidos e é caracterizada pelo aumento de ácido propiônico (PA) no plasma e no líquido (2,5 a 5 mM) e na urina (11 a 14,5 mg/mg de creatinina) dos pacientes afetados, porém estas concentrações podem ser ainda maiores no cérebro (HOFFMANN *et al.*, 1993). Entretanto, este sinal pode estar ausente e, neste caso, o diagnóstico é baseado na presença de vários subprodutos, tais como propionil-carnitina, 3-hidroxiopropionato e metilcitrato. Além disso, durante episódios de crise metabólica o ácido 3-hidroxiisovalérico e intermediários da rota de catabolismo da leucina (ácido tíglico, tiglicina, 2-metil-3-hidroxi butirato, 3-hidroxi butirato e propionilglicina) também estão aumentados (OGIER DE BAULNY e SAUDUBRAY, 2002).

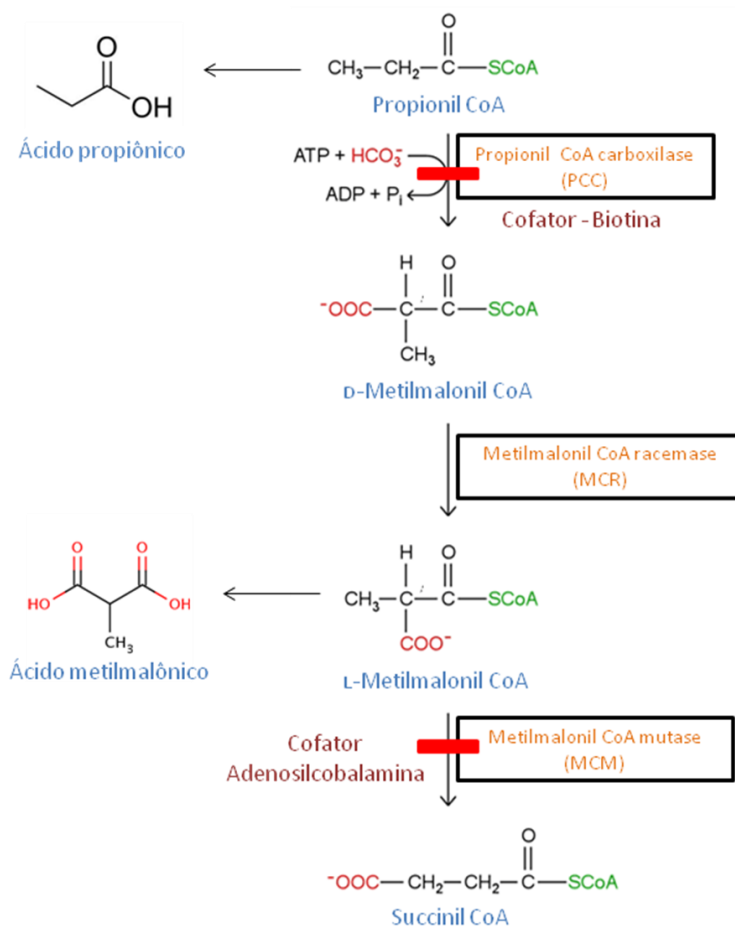


Figura 1. Rota do catabolismo do propionil-CoA com o bloqueio das enzimas propionil-CoA carboxilase (PCC) e metilmalonil-CoA mutase (MCM).

1.3. Achados clínicos e neuropatológicos

Os sintomas apresentados pelos portadores das acidúrias metilmalônica e propiônica são muito semelhantes. Na maioria dos casos, em ambas as doenças, os primeiros sintomas aparecem no período neonatal, mas também podem se manifestar mais tardiamente.

No período neonatal os sinais clínicos rapidamente pioram sem razão aparente depois de um período completamente livre de sintomas que pode durar horas ou até a primeira semana pós-nascimento. Os sintomas incluem predominantemente manifestações neurológicas, tais como postura e movimentos anormais, hipotonia generalizada, letargia e convulsões. Os pacientes também podem apresentar dano cardíaco, geralmente cardiomiopatia que pode estar associada à diversas alterações, tais como taquicardia, diminuição no bombeamento do coração, hipertrofia do ventrículo, arritmia ventricular, bem como desorganização de fibras miocárdicas e focos de áreas com morte celular (RAZZAGHY *et al.*, 2007; de BIE *et al.*, 2009; PROFITLICH *et al.*, 2009; PRADA *et al.*, 2011;). Se não

forem tratados rápida e adequadamente, os pacientes podem progredir até o coma e morrerem dentro de poucos dias ou desenvolverem dano neurológico permanente (DEODATO *et al.*, 2006).

Os achados laboratoriais mais frequentes são aumento do ânion GAP, hiperuricemia, leucopenia, trombocitopenia, anemia e cetonúria. A hiperamonemia, sinal frequentemente encontrado, é resultante da inibição secundária da carbamilfosfato sintetase do ciclo da ureia pelo acúmulo de propionil-CoA, que é um éster derivado do PA. Em alguns casos onde há hiperventilação e alcalose respiratória induzidas pela hiperamonemia, a acidose metabólica pode estar completamente ausente (WALTER *et al.*, 1995; FENTON *et al.*, 2001; DEODATO *et al.*, 2003). Ainda pode ser observado aumento nos níveis plasmáticos das enzimas creatina quinase e troponina-I devido ao dano cardíaco (PRADA C.E *ET AL.*, 2011).

Já nas formas tardias dessas doenças a apresentação clínica é mais variável, podendo ser na forma de encefalopatia aguda com alto risco de vida até sintomas intermitentes ou crônicos, tais como ataxia intermitente, distúrbios comportamentais, alimentação anormal com recusa proteica, anorexia, vômitos recorrentes e retardo no desenvolvimento. As crises recorrentes são normalmente desencadeadas por estresse metabólico (infecções, cirurgias, etc.) que estimulam o catabolismo endógeno ou por ingesta excessiva de proteínas. Similarmente à forma neonatal, esses sintomas são frequentemente relacionados à acidose metabólica, cetonúria e hiperamonemia. Anormalidades hematológicas, particularmente neutropenia, também são frequentes (DEODATO *et al.*, 2006). Os achados neuropatológicos das acidúrias metilmalônica e propiônica incluem desmielinização, atrofia cerebral, anormalidades na substância branca, cerebelo, tronco encefálico e nos gânglios basais (BRISMAR e OZAND, 1994; FENTON *et al.*, 2001; DEODATO *et al.*, 2006; HARTING *et al.*, 2008; ZWICKLER *et al.*, 2012).

1.4. Diagnóstico

As acidúrias metilmalônica e propiônica são diagnosticadas por seus perfis específicos de metabólitos excretados na urina. A análise dos ácidos orgânicos na urina é feita por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas, enquanto o perfil de acilcarnitinas é realizado por espectrometria de massas em *tandem* (JOHNSON *et al.*, 1996; BONAFE *et al.*, 2000; DEODATO *et al.*, 2006). Os portadores da acidúria propiônica apresentam aumento na excreção urinária dos ácidos PA, metilcítrico, 3-hidroxi-propiônico e outros metabólitos, tais como propionilglicina, tigilglicina, 3-hidroxi-2-metilbutirato e 2-metilacetoacetato. Já os pacientes com acidúria metilmalônica isolada apresentam aumento

dos ácidos MMA, metilcítrico, 3-hidroxiopropiônico e outros derivados de propionil-CoA. A análise plasmática de acilcarnitinas detecta propionilcarnitina como o éster de carnitina predominante, além de redução de carnitina livre (OGIER DE BAULNY e SAUDUBRAY, 2002; DEODATO *et al.*, 2006). Estudos enzimáticos em fibroblastos ou leucócitos periféricos são úteis para confirmação de diagnóstico, para um melhor delineamento do grupo enzimático e, combinado com análise molecular, para determinação da relação genótipo-fenótipo (OGIER DE BAULNY e SAUDUBRAY, 2002).

1.5. Tratamento

A forma neonatal requer rápida remoção das toxinas e, portanto, a restrição alimentar proteica é utilizada para a sobrevivência neste período, já que limita a formação dos ácidos orgânicos e seus derivados. Além disso, a prevenção e o tratamento precoce de episódios recorrentes de desequilíbrio metabólico são cruciais, já que a crise metabólica pode causar sequelas neurológicas ou até mesmo ser fatal em qualquer idade (OGIER DE BAULNY e SAUDUBRAY, 2002).

1.6. Fisiopatologia

A patogênese das acidúrias metilmalônica e propiônica não está bem estabelecida. No entanto, é sugerido que os metabólitos acumulados em tecidos e líquidos biológicos dos pacientes afetados sejam tóxicos e responsáveis por pelo menos parte dos sintomas apresentados.

1.6.1. Acidúria metilmalônica

No que se refere à acidúria metilmalônica, acredita-se que a acidose ocorra devido ao acúmulo de metilmalonil-CoA, diminuindo os níveis de coenzima A e acarretando em dano no metabolismo de carboidratos com consequente acidose. Também foi sugerido que o metilmalonil-CoA, por inibir a enzima piruvato carboxilase, interfere na gliconeogênese, levando à hipoglicemia e ao catabolismo excessivo de lipídios com cetose e acidose. Além disso, Halperin e colaboradores (1971) sugeriram que uma inibição da lançadeira do malato causada pelo MMA poderia estar envolvida na hipoglicemia a partir da inibição da gliconeogênese. Já a hiperglicinemia e hiperamonemia provavelmente são devido à inibição do sistema de clivagem da glicina e da carbamoil fosfato sintetase I, respectivamente, pelos ácidos orgânicos e seus ésteres acumulados. Ainda com relação à hiperamonemia, um estudo demonstrou que a administração de MMA em ratos causou diminuição na concentração

hepática de *N*-acetilglutamato, provavelmente pela inibição da enzima *N*-acetilglutamato sintetase (COUDE *et al.*, 1979; FENTON *et al.*, 2001).

Outros mecanismos que estão associados à fisiopatologia da acidemia metilmalônica incluem excitotoxicidade (WAJNER e COELHO, 1997; OKUN *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2009), disfunção bioenergética (WAJNER e COELHO, 1997; OKUN *et al.*, 2002; MACIEL *et al.*) e estresse oxidativo. No que se refere ao estresse oxidativo, foi verificado que o MMA induz dano oxidativo lipídico e proteico e reduz as defesas antioxidantes não enzimáticas *in vitro* e *in vivo* em cérebro de ratos (FONTELLA *et al.*, 2000; FIGHERA *et al.*, 2003; RIGO *et al.*, 2006; FURIAN *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2011). Além disso, a administração *in vivo* de ácido ascórbico, α -tocoferol e creatina resultou em um decréscimo na duração de episódios convulsivos e no estresse oxidativo provocados pela injeção intraestriatal aguda de MMA em ratos (FIGHERA *et al.*, 1999; MALFATTI *et al.*, 2003; MARISCO *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2005; ROYES *et al.*, 2006). Foi observado ainda um aumento nos níveis de Mn-superóxido dismutase (MnSOD), diminuição de glutathione (GSH) e anormalidades na morfologia de mitocôndrias de fígado de camundongos nocaute para o gene *mut* (CHANDLER *et al.*, 2009; MURPHY *et al.*, 2010), ao passo que em camundongos nocaute para a enzima iNOS foi observada uma diminuição de estresse oxidativo e de convulsões causadas pela administração de MMA, indicando o envolvimento de espécies reativas nos efeitos causados pelo metabólito (RIBEIRO *et al.*, 2009). Finalmente, foi observado que o MMA induz morte celular em culturas primárias de neurônios corticais e que esse efeito é atenuado pela adição de α -tocoferol, GSH, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no meio de incubação (McLAUGHIN *et al.*, 1998).

Já em fibroblastos de pacientes portadores desse distúrbio foi verificado um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e na expressão da MnSOD (RICHARD *et al.*, 2006, 2007 e 2009). Também foi encontrada uma diminuição de GSH em plasma de pacientes (TREACY *et al.*, 1996). Estudos recentes evidenciaram que portadores das acidúrias metilmalônica e propiônica apresentam dano oxidativo lipídico e proteico no plasma (RIBAS *et al.*, 2010a,b), reforçando os achados *in vitro* que indicam o envolvimento do estresse oxidativo na acidúria metilmalônica.

1.6.2. Acidúria propiônica

Similarmente à acidúria metilmalônica, tem sido sugerido que o acúmulo de metabólitos é importante na fisiopatogenia da acidúria propiônica. A intolerância a proteínas apresentada pelos pacientes é explicada pelo defeito no catabolismo dos aminoácidos

isoleucina, valina, treonina e metionina, ao passo que o acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa e ímpar no fígado reflete provavelmente o aumento na biossíntese desses compostos, já que o propionil-CoA acumulado pode ser usado como precursor desses ácidos graxos. A grande variação fenotípica encontrada nos pacientes pode ser explicada pelas diferenças no conteúdo proteico proveniente da dieta, na contribuição das bactérias do intestino para a geração de propionil-CoA e nas atividades das rotas alternativas responsáveis pela degradação do propionato. A hiperglicinemia parece ser devido à inibição do sistema de clivagem da glicina, enquanto a hiperamonemia é resultante das inibições das enzimas carbamoil fosfato sintetase I e *N*-acetilglutamato sintetase (FENTON *et al.*, 2001).

Também foi demonstrado que disfunção no metabolismo energético (SCHWAB *et al.*, 2006; de KEYZER *et al.*, 2009) e alterações na homeostasia redox contribuem para a fisiopatologia do dano neurológico na acidemia propiônica. Estudos prévios *in vitro* e *in vivo* verificaram que o PA induz estresse oxidativo em cérebro de ratos, culturas de células e em tecidos de animais submetidos a modelos da acidúria propiônica (FONTELLA *et al.*, 2000; BRUSQUE *et al.*, 2002; PETTENUZZO *et al.*, 2002; RIGO *et al.*, 2006; SCHWAB *et al.*, 2006). Nesse contexto, foi demonstrado que o PA estimula *in vitro* a produção de ânion superóxido em neutrófilos de seres humanos (NAKAO *et al.*, 1998). Já em pacientes portadores da acidúria propiônica foi observada uma diminuição nos níveis plasmáticos de α -tocoferol (MOYANO *et al.*, 1997) e aumento na excreção urinária de isoprostanos (Mc GUIRE *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho investigou os efeitos *in vivo* do MMA e do PA sobre parâmetros de estresse oxidativo em coração de ratos de 15 dias de vida.

2.2. Específicos

Foram verificados os efeitos *in vivo* do MMA e do PA em coração sobre:

1. Dano oxidativo lipídico através da determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico-TBA-RS);
2. Defesas antioxidantes não enzimáticas através da medida das concentrações de GSH;
3. Defesas antioxidantes enzimáticas através da medida das atividades da SOD, CAT e glutationala peroxidase-GPx).

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Serão utilizados ratos Wistar criados e mantidos em padrão sanitário convencional controlado no biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS com fotoperíodo de 12 h claro/escuro (07:00/19:00h) e temperatura controlada (21 °C). Os animais serão mantidos em gaiolas com dimensões 41 x 34 x 16 cm (máximo 6 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*. A troca da cama dos ratos será realizada pelos funcionários do Biotério do Departamento de Bioquímica duas vezes por semana (segundas e quintas-feiras). O consumo de água e ração será verificado diariamente, sendo feita a manutenção das mamadeiras e comedouros três vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras).

3.2. Gerenciamento de resíduos químicos e biológicos

Os resíduos biológicos gerados pelos experimentos foram descartados em sacos de lixo branco, que posteriormente foram depositados em recipientes próprios localizados no Departamento de Bioquímica. Esses resíduos foram periodicamente recolhidos e tratados pela empresa Stericycle de acordo com as normas vigentes de biossegurança. As carcaças de animais são colocadas em freezer próprio e também posteriormente recolhidas pela Stericycle.

Os resíduos químicos foram separados no laboratório em cinco grupos, de acordo com a seguinte classificação: resíduos orgânicos halogenados, orgânicos não-halogenados, solventes aquosos, solventes orgânicos passíveis de purificação e resíduos sólidos. As embalagens contendo estes resíduos foram periodicamente coletadas e enviadas para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos do Instituto de Química da UFRGS.

3.3. Estudos *in vivo*

Os estudos bioquímicos foram realizados após a administração aguda intraperitoneal dos ácidos MMA e PA, em ratos de 15 dias de vida. Foram realizadas 3 injeções (a primeira injeção com dose de 10 µmol / g de peso corporal seguida de duas injeções de 5 µmol / g de peso corporal) com intervalo de 90 min entre cada uma e 60 min depois da última injeção os animais foram eutanasiados por decapitação. Injeções com solução salina (NaCl 0,85%) nos mesmos volumes também foram feitas em ratos pertencentes ao grupo controle.

3.4. Preparação das amostras para análise dos parâmetros de estresse oxidativo

Para os estudos *in vivo* os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (9:6 v/v) nas doses de 75 e 10 mg/kg respectivamente, e sofreram uma perfusão transcardíaca com solução salina. O coração foi então removido e limpo, sendo retirado o excesso de sangue dos vasos externos. O tecido foi então homogeneizado em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo KCl 140 mM e submetido a uma centrifugação a 750 g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi separado e utilizado para a determinação das técnicas bioquímicas.

3.5. Descrição das técnicas bioquímicas a serem utilizadas

Defesas antioxidantes não enzimáticas

Determinação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH)

As concentrações de GSH foram determinadas através do método descrito por Browne e Armstrong (1998). As amostras foram diluídas em 10 volumes de tampão fosfato de sódio, pH 8,0, contendo EDTA 5 mM. Foram adicionados a 100 µL dessa preparação 100 µL de o-ftaldialdeído (1 mg / mL preparado em metanol) e a mistura foi incubada durante 15 min à temperatura ambiente e a fluorescência foi posteriormente lida em espectrofluorímetro a 350 nm (excitação) e 420 nm (emissão). As concentrações de GSH foram calculadas a partir de uma curva padrão de GSH (0,001 – 1 mM) e os resultados expressos como nmol / mg de proteína.

Defesas antioxidantes enzimáticas

Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada pelo método de Wendel (1981) usando hidroperóxido de tert-butila como substrato. Em cubeta de quartzo foram adicionados os seguintes reagentes: 600 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, 10 µL de azida sódica 40 mM, 15 µL de glutathiona 100 mM, 15 µL de glutathiona redutase 10 U / ml, 10 µL de NADPH 10 mM e 10 µL de amostra (0,1 – 0,3 µg de proteína). Esta mistura foi incubada a 25 °C durante 1 min a fim de estabilizar o meio e após foram adicionados 50 µL de hidroperóxido de tert-butila 10 mM para iniciar a reação. Os brancos foram preparados substituindo a amostra por tampão fosfato. A queda da absorbância a 340 nm foi acompanhada durante 240 s e a atividade da GPx foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção do NADPH a 340 nm de 6,2 mM⁻¹ cm⁻¹. A atividade da GPx foi calculada como U / mg de proteína (1U = 1 µmol NADPH consumido / min).

Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida mediante a utilização do Kit Randox. O método baseia-se na formação do vermelho de formazan através da reação do ânion superóxido (produzido no meio a partir de um sistema xantina-xantina oxidase) e do cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazólio gerando um complexo rosa que é lido a 505 nm. A inibição de formação do cromógeno foi proporcional à atividade da SOD.

Atividade da catalase (CAT)

A atividade desta enzima foi determinada através do método de Aebi (1984). Em 100 μL do sobrenadante foram adicionados 10 μL de Triton 0,1 % seguido de agitação e esta mistura foi então conservada em gelo durante 15 min. Em 50 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, foram adicionados 100 μL de H_2O_2 30 % (v/v) (meio de reação). Foram pipetados 600 μL deste meio em cubeta de quartzo e o aparelho estabilizado contra um branco realizado separadamente de tampão fosfato. Após adição de 25 ± 5 μL de amostra foi realizada a leitura da queda da absorbância do H_2O_2 em espectrofotômetro a 240 nm à temperatura ambiente ($22\text{ }^\circ\text{C} \pm 2$), durante 100 s. Para o cálculo da CAT foi utilizado o coeficiente de extinção do H_2O_2 de $43,6\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os resultados da atividade da CAT foram expressos em U / mg proteína (1U = 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumido / min).

Dano oxidativo lipídico

Medida substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A medida de níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foi realizada de acordo com o método de Esterbauer e Cheeseman (1990). Trezentos microlitros de TCA 10 % foram adicionados a uma alíquota de sobrenadante. Após centrifugação, 300 μL do sobrenadante foram tratados com ácido tiobarbitúrico 0,67 % na proporção de 1:1. A mistura foi levada a um banho fervente durante 25 min e então resfriada em água à temperatura ambiente. A absorbância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1, 1, 3, 3 – tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol TBA-RS / mg de proteína.

3.6. Dosagem de proteínas

Foi feita através do método de Lowry e colaboradores (1951), usando-se a albumina sérica bovina como padrão.

3.7. Análise estatística

A análise estatística utilizada foi selecionada de acordo com o desenho experimental utilizado e com o tipo de distribuição apresentado pelo conjunto dos dados. Assumindo que os dados tenham uma distribuição normal, para comparação de três ou mais médias foi utilizada análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Duncan quando o F foi significativo. As análises estatísticas foram feitas pelo programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences software*), versão 15.0. Foram consideradas diferenças significativas quando o $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

Inicialmente, observamos que o tratamento agudo do MMA e do PA diminuiu significativamente as concentrações de GSH em coração de ratos [$F_{(2,9)}= 16.341$; $P<0,001$] (Figura 2), sugerindo que as defesas antioxidantes não enzimáticas estão diminuídas nesse tecido.

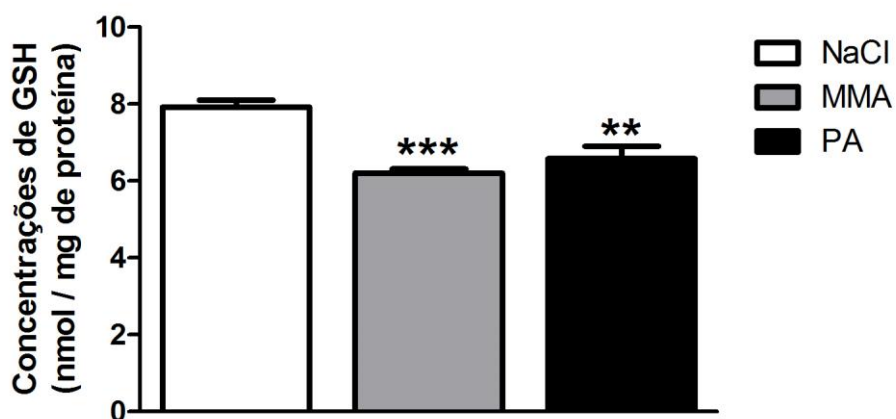


Figura 2 – Efeito da administração aguda intraperitoneal (ip) dos ácidos metilmalônico (MMA) e propiônico (PA) sobre as concentrações de glutatona (GSH) em coração de ratos. Os valores representam média \pm desvio padrão para 4-6 ratos (animais) realizados em triplicata e estão expressos em nmol / mg de proteína. ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, comparado ao grupo que recebeu NaCl (ANOVA seguido de teste post-hoc de Duncan).

Também verificamos que a administração aguda de MMA e PA diminuiu a atividade das enzimas GPx [$F_{(2,9)}= 58.771$; $P<0,001$] (Figura 3) e SOD [$F_{(2,9)}= 12.844$; $P<0,01$] (Figura 4) em coração de ratos. Por outro lado, apenas o tratamento com MMA diminuiu a atividade da CAT [$F_{(2,10)}= 11.333$; $P<0,01$] (Figura 5). Nossos achados indicam que o MMA e o PA alteram as defesas antioxidantes enzimáticas no coração de ratos.

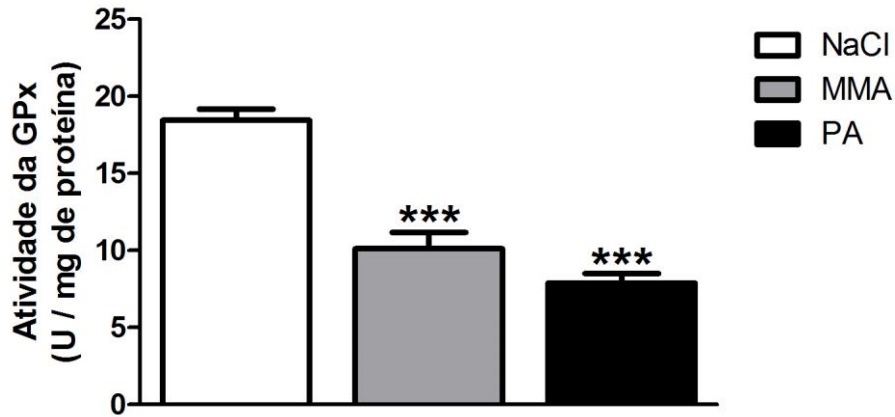


Figura 3 – Efeito da administração intraperitoneal (ip) dos ácidos metilmalônico (MMA) e propiônico (PA) sobre a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) em coração de ratos. Os valores representam média \pm desvio padrão para 5-6 ratos (animais) realizados em triplicata e estão expressos em U / mg de proteína. *** $P<0,001$, comparado ao grupo NaCl (ANOVA seguido de teste post-hoc de Duncan).

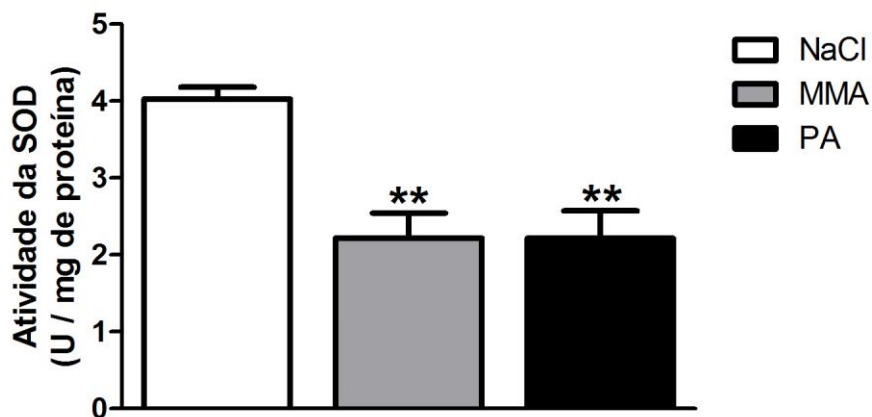


Figura 4 – Efeito da administração aguda intraperitoneal (ip) dos ácidos metilmalônico (MMA) e propiônico (PA) sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) em coração de ratos. Os valores representam média \pm desvio padrão para 4-6 ratos (animais) realizados em triplicata e estão expressos em U / mg de proteína. ****** $P < 0,01$, comparado ao grupo que recebeu NaCl (ANOVA seguido de teste post-hoc de Duncan).

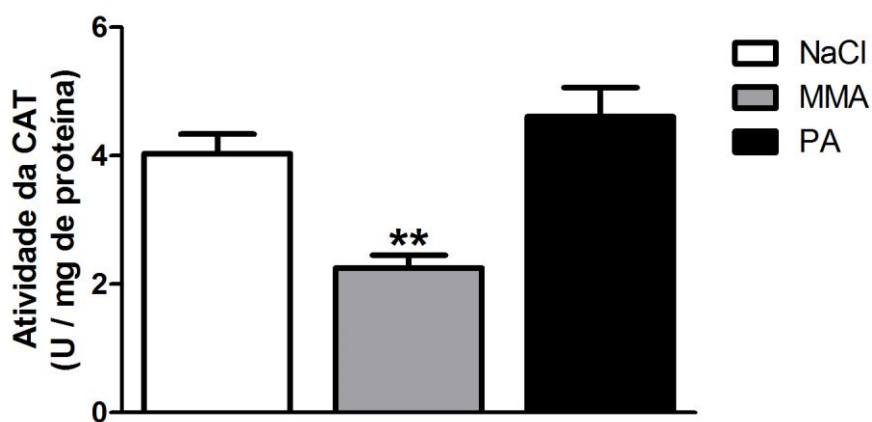


Figura 5 – Efeito da administração intraperitoneal (ip) dos ácidos metilmalônico (MMA) e propiônico (PA) sobre a atividade da catalase (CAT) em coração de ratos. Os valores representam média \pm desvio padrão para 5-6 ratos (animais) realizados em triplicata e estão expressos em U / mg de proteína. ****** $P < 0,01$, comparado ao grupo NaCl (ANOVA seguido de teste post-hoc de Duncan).

Finalmente, foi verificado que o MMA e o PA não alteraram significativamente os níveis de TBA-RS em coração de ratos de ratos (Figura 6), indicando que ambos os ácidos orgânicos não induzem dano oxidativo lipídico em coração.

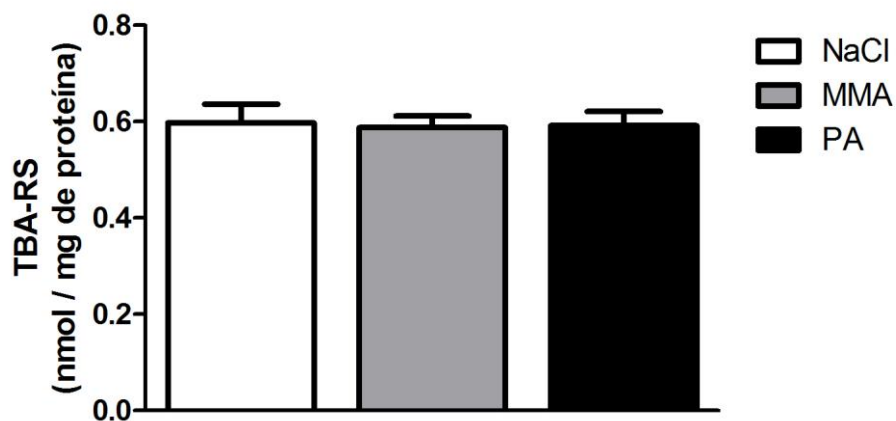


Figura 6 – Efeito da administração aguda intraperitoneal (ip) dos ácidos metilmalônico (MMA) e propiônico (PA) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em coração de ratos. Os valores representam média \pm desvio padrão para 4-6 ratos (animais) realizados em triplicata e estão expressos em nmol / mg de proteína. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (ANOVA).

5. DISCUSSÃO

O quadro clínico das acidúrias metilmalônica e propiônica é caracterizado predominantemente por disfunção neurológica, porém os pacientes também são acometidos por cardiomiopatia. O dano cardíaco observado nessas acidúrias é considerado um grande complicador do prognóstico dessas doenças, visto que geralmente se consitui em um achado crônico nos pacientes (FENTON *et al.*, 2001; ROMANO *et al.*, 2010). Embora os patomecanismos responsáveis pelo dano cardíaco nessas doenças ainda não tenham sido estudados, é sugerido que o acúmulo de metabólitos tóxicos esteja envolvido (MARDACH *et al.*, 2005; ROMANO *et al.*, 2010). Portanto, no presente estudo avaliamos o efeito agudo do MMA e do PA sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo em coração de ratos.

Foi verificado que a administração aguda do MMA e do PA diminuiu as concentrações de GSH em coração de ratos. Considerando que a GSH endógena é um importante protetor de grupamentos sulfidrilas e sequestrador de espécies reativas e que suas concentrações refletem a capacidade antioxidante não enzimática de um tecido para prevenir o dano associado a radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), pode ser presumido que as defesas antioxidantes não enzimáticas do coração foram comprometidas *in vivo* pelo MMA e PA.

Também foi observado que o MMA e o PA alteraram as defesas antioxidantes enzimáticas. Ambos os ácidos orgânicos diminuíram a atividade da SOD, ao passo que apenas o MMA diminuiu a atividade da CAT. A inibição das atividades da SOD e da CAT pode estar sendo causada por espécies reativas geradas pelo MMA e PA, acarretando em modificações sítio-específicas em determinados aminoácidos essenciais para a atividade enzimática (SINGH ET AL., 2004). Pode ser presumido também que a diminuição da atividade da SOD leve ao aumento de ânion superóxido, enquanto que a diminuição da atividade da CAT pelo MMA provavelmente ocasione um aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio. É importante ressaltar aqui que tanto o ânion superóxido quanto o peróxido de hidrogênio pode levar à produção de outras espécies reativas com alta toxicidade, tais como o radical hidroxila. O MMA e o PA também diminuíram a atividade da GPx, provavelmente causando um aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio e peróxidos de lipídios. Pode ser sugerido que a diminuição da atividade da GPx verificada em nosso trabalho esteja ocorrendo devido a uma inibição por espécies reativas geradas pelo MMA e PA. Esses achados demonstrando que o MMA e PA modulam as atividades das enzimas antioxidantes indicam que os metabólitos causam um aumento na produção de espécies reativas e prejudicam as defesas antioxidantes em coração.

Ainda foi observado que os níveis de TBA-RS não foram modificados pela administração de MMA e PA. Visto que a medida de TBA-RS reflete a quantidade de malondialdeído, que é um produto da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados de lipídios complexos, nossos resultados sugerem que o MMA e o PA não induzem peroxidação lipídica em coração.

Portanto, o presente estudo indica que o MMA e o PA causam significativas alterações nas defesas antioxidantes do coração. Caso estes achados sejam confirmados em experimentos *in vivo* adicionais e em tecidos de pacientes acometidos pelas acidúrias metilmalônica e propiônica, pode-se presumir que o estresse oxidativo pode contribuir, ao menos em parte, para a cardiomiopatia apresentada pelos indivíduos portadores dessas doenças. Além disso, o uso de agentes antioxidantes poderia representar uma nova abordagem terapêutica, em conjunto com outras medidas, no tratamento dos pacientes.

6. PERSPECTIVAS

- Determinar os níveis de MMA e PA alcançados no plasma e coração com a aplicação do modelo *in vivo* de administração intraperitoneal dos ácidos orgânicos em ratos;
- Avaliar os efeitos da administração aguda do MMA e do PA sobre parâmetros de dano oxidativo proteico e produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio em coração de ratos;
- Avaliar os efeitos da N-acetilcisteína e da melatonina sobre as alterações causadas pela administração aguda do MMA e do PA em coração de ratos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brismar J, Ozand PT, 1994. CT and MR of the brain in disorders of the propionate and methylmalonate metabolism. *AJNR Am J Neuroradiol* 15:1459-1473.
- Browne RW, Armstrong D, 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347-352.
- Brusque AM, Rotta LN, Tavares RG, Emanuelli T, Schwarzbald CV, Dutra-Filho CS, de Souza Wyse AT, Duval Wannmacher CM, Gomes de Souza DO, Wajner M, 2001. Effects of methylmalonic and propionic acids on glutamate uptake by synaptosomes and synaptic vesicles and on glutamate release by synaptosomes from cerebral cortex of rats. *Brain Res* 920:194-201.
- Cassina P, Peluffo H, Pehar M, Martinez-Palma L, Ressia A, Beckman JS, Estévez AG, Barbeito L, 2002. Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J Neurosci Res* 67(1):21-9.
- Chandler RJ, Zervas PM, Shanske S, Sloan J, Hoffmann V, DiMauro S, Venditti CP, 2009. Mitochondrial dysfunction in *mut* methylmalonic acidemia. *FASEB J* 23(4):1252-1261.
- Cheema-Dhadli S, Leznoff CC, Halperin ML, 1975. Effect of 2-methylcitrate on citrate metabolism: implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic aciduria. *Pediatr Res* 9:905-908.
- Coude FX, Sweetman L, Nyhan WL, 1979. Inhibition by propionyl CoA of *N*-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondrial. *J Clin Invest* 64:1544-1551.
- De Bie I, Nizard S.D.P., Mitchell G.A., 2009. *Prenat Diagn* 29: 266–270.
- de Keyser Y, Valayannopoulos V, Benoist JF, Batteux F, Lacaille F, Hubert L, Chrétien D, Chadeaux-Vekemans B, Niaudet P, Touati G, Munnich A, de Lonlay P, 2009. Multiple OXPHOS deficiency in the liver, kidney, heart, and skeletal muscle of patients with methylmalonic aciduria and propionic aciduria. *Pediatr Res* 66(1):91-5.
- de Mello CF, Beghini J, Jimenez-Bernal RE, Rubin MA, de bastiani J, da Costa E Jr., Wajner M, 1996. Intraatrial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. *Brain Res* 721:120-125.
- Deodato F, Dionisi-Vici C, Bartuli A, Rizzo C, Goffredo B, Sabetta G, Abeni D, 2003. Weight loss at admission may distinguish newborns with organic aciduria vs. urea cycle defects. *J Inherit Metab Dis* 26:37.
- Deodato F, Boenzi S, Santorelli FM, Dionisi-Vici C, 2006. Methylmalonic and propionic aciduria. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 142:104-112.

Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS, 2001. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver CR, Beaudet AL, Valle AD, Sly WS, eds.) McGraw-Hill Inc., New York, pp. 2165-2193.

Fernandes CG, Borges CG, Seminotti B, Amaral AU, Knebel LA, Eichler P, de Oliveira AB, Leipnitz G, Wajner M, 2011. Experimental evidence that methylmalonic acid provokes oxidative damage and compromises antioxidant defenses in nerve terminal and striatum of young rats. *Cell Mol Neurobiol* 31(5):775-85.

Figuera MR, Queiroz CM, Stracke MP, Brauer MC, González-Rodríguez LL, Frussa-Filho R, Wajner M, de Mello CF, 1999. Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. *Neuroreport* 13:2039-2043.

Figuera MR, Bonini JS, de Oliveira TG, Frussa-Filho R, Dutra-Filho CS, Rubin MA, Mello CF, 2003. GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intra-striatal injection of methylmalonic acid. *Int J Biochem Cell Biol* 35:465-473.

Fontella FU, Pulrolnik V, Gassen E, Wannmacher CM, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS, 2000. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *NeuroReport* 11:541-544.

Furian AF, Figuera MR, Oliveira MS, Ferreira AP, Fiorenza NG, de Carvalho Myskiw J, Petry JC, Coelho RC, Mello CF, Royes LF, 2007. Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. *Neurochem Int* 50:164-171.

Halperin ML, Schiller CM, Fritz IB, 1971. The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *J Clin Invest* 50:2276-2282.

Harting I, Seitz A, Geb S, Zwickler T, Porto L, Lindner M, Kölker S, Höster F, 2008. Looking beyond the basal ganglia: the spectrum of MRI changes in methylmalonic acidemia. *J Inher Metab Dis* 31:368-378.

Hoffmann GF, Meler-Augenstein W, Stockler S, Surtees R, Rating D, Nyhan WL, 1993. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *J Inher Metab Dis* 16:648-669.

Johnson AW, Mills K, Clayton PT, 1996. The use of automated electrospray ionization tandem MS for the diagnosis of inborn errors of metabolism from dried blood spots. *Biochem Soc Trans* 24:932-938.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Maciel EN, Kowaltowski AJ, Schwalm FD, Rodrigues JM, Souza DO, Vercesi AE, Wajner M, Castilho RF, 2004. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca²⁺ and respiratory chain complex II inhibition. *Epilepsia* 45(5):1025-35.

Malfatti CRM, Royes LFF, Francescato L, Sanabria ERG, Rubin MA, Cavalleiro EA, Mello CF, 2003. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na⁺,K⁺-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. *Epilepsia* 44:761-767.

Manoli I e Venditti CP, 2010. Methylmalonic acidemia. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2005 [atualizado em 2010].

Marisco P da C, Ribeiro MC, Bonini JS, Lima TT, Mann KC, Brenner GM, Dutra-Filho CS, Mello CF, 2003. Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. *Exp Neurol* 182:455-460.

Mc Guire PJ, Parikh A, Diaz GA, 2009. Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab* 98:173-180.

Murphy GE, Lowekamp BC, Zerfas PM, Chandler RJ, Narasimha R, Venditti CP, Subramaniam S, 2010. Ion-abrasion scanning electron microscopy reveals distorted liver mitochondrial morphology in murine methylmalonic acidemia. *J Struct Biol* 171:125-132.

Nakao S, Moriya Y, Furuyama S, Niederman R, Sugiya H, 1998. Propionic acid stimulates superoxide generation in human neutrophils. *Cell Biol Int* 22:331-337.

Ogier de Baulny H e Saudubray JM, 2002. Branched-chain organic acidurias. *Semin Neonatol* 7:65-74.

Okun JG, Hörster F, Farkas LM, Feyh P, Hinz A, Sauer S, Haffmann GF, Unsicker K, Mayatepek E, Kölker S, 2002. Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. *J Biol Chem* 277:14674-14680.

Pettenuzzo LF, Schuck PF, Fontella F, Wannmacher CM, Wyse AT, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wajner M, 2002. Ascorbic acid prevents cognitive deficits caused by chronic administration of propionic acid to rats in the water maze. *Pharmacol Biochem Behav* 73:623-629.

Prada CE, Jasmi FA, Kirk EP, Hopp M, Jones O, Leslie ND, Burrow TA, 2011. *Pediatr* 159: 862-4.

Profitlich LE, Kirmse B, Wasserstein MP, Diaz GA, Srivastava S, 2009. *Molecular Genetics and Metabolism* 98: 344–348.

Razzaghy M, Marjan A, Tafreshi S.I., 2007. Heart failure in a patient with methylmalonic acidemia. *Molecular Genetics and Metabolism* 92: 188.

Ribas GS, Manfredini V, de Mari JF, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, Sitta A, Deon M, Wajner M, Vargas CR, 2010a. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int J Dev Neurosci* 28:127-132.

Ribas GS, Manfredini V, de Marco MG, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, Wajner M, Vargas CR, 2010b. Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes *in vitro*. *Mutat Res* 702:123-128.

Ribeiro MC, de Avila DS, Schneider CY, Hermes FS, Furian AF, Oliveira MS, Rubin MA, Lehmann M, Krieglstein J, Mello CF, 2005. Alpha-tocopherol protects against pentylentetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res* 66:185-194.

Ribeiro LR, Figuera MR, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ferreira AP, Saraiva AL, Souza MA, Lima FD, Magni DV, Dezengrini R, Flores EF, Butterfield DA, Ferreira J, dos Santos AR, Mello CF, Royes LF, 2009, Methylmalonate-induced seizures are attenuated in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Int J Dev Neurosci.* 27:157-63

Richard E, Monteoliva L, Juarez S, Perez B, Desviat LR, Ugarte M, Albar JP, 2006. Quantitative analysis of mitochondrial protein expression in methylmalonic acidemia by two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteome Res* 5:1602-1610.

Richard E, Alvarez-Barrientos A, Pérez B, Desviat LR, Ugarte M, 2007. Methylmalonic acidemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway. *J Pathol* 213:453-461.

Richard E, Jorge-Finnigan A, Garcia-Villoria J, Merinero B, Desviat LR, Gort L, Briones P, Leal F, Pérez-Cerdá C, Ribes A, Ugarte M, Pérez B, and the MMACHC Working Group (Aguirre A, Andrés M, Badía J, Baldellou A, Couce ML, García-Carzola A, García-Silva MT, Lama R, Lopez-Mendoza S, Martínez-Pardo M, Olivares JL, Parini R, Parraga D, Pedrón C, Peña L, Pineda M, Pintos G, Porta R, Roselló P, Ruiz A, Toro M, Urbón A, Vernet A, Vilaseca MA, Yoldi ME), 2009. Genetic and cellular studies of oxidative stress in methylmalonic aciduria (MMA) cobalamin deficiency type C (cblC) with homocystinuria (MMACHC). *Hum Mutat* 30:1558-1566.

Rigo FK, Pasquetti L, Malfatti CR, Figuera MR, Coelho RC, Petri CZ, Mello CF, 2006. Propionic acid induces convulsions and protein carbonylation in rats. *Neurosci Lett* 408:151-154.

Royes LF, Fighera MR, Furian AF, Oliveira MS, da Silva LG, Malfatti CR, Schneider PH, Braga AL, Wajner M, Mello CF, 2003. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience* 118:1079-1090.

Royes LF, Fighera MR, Furian AF, Oliveira MS, Myskiw J de C, Fiorenza NG, Frussa-Filho R, Mello CF, 2005. Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by intrastriatal injection of methylmalonate. *Neurosci Lett* 376:116-120.

Royes LFF, Fighera MR, Furian AF, Oliveira MS, Myskiw J de C, Fiorenza NG, Petry JC, Coelho RC, Mello CF, 2006. Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. *Pharmacol Biochem Behav* 83:136-144.

Schwab MA, Sauer SW, Okun JG, Nijtmans LG, Rodenburg RJ, van den Heuvel LP, Dröse S, Brandt U, Hoffmann GF, Ter Laak H, Kölker S, Smeitink JA, 2006. Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *Biochem J* 398:107-112.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, 2001. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8^o ed. New York: McGraw-Hill Inc, p. 3-45.

Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Miyatake K, Nakano Y, 1995. Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. *J Nutr* 125:2846-2850.

Treacy E, Arbour L, Chessex P, Graham G, Kasprzak L, Casey K, Bell L, Mamer O, Scriver CR, 1996. Glutathione deficiency as a complication of methylmalonic acidemia: response to high doses of ascorbate. *J Pediatr* 129:445-448.

Wajner M, Coelho JC, 1997. Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production. *J Inher Metab Dis* 20:761-768.

Walter JH, Wraith JE, Cleary MA, 1995. Absence of acidosis in the initial presentation of propionic acidemia. *Arch Dis Child* 72:197-199.

Wendel A 1981. Glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 77:325-332.

Zwickler T, Haegi G, Riderer A, Hörster F, Hoffmann GF, Burgard P, Kölker S, 2012. Metabolic decompensation in methylmalonic aciduria: which biochemical parameters are discriminative? *J Inher Metab Dis* 35:797-806