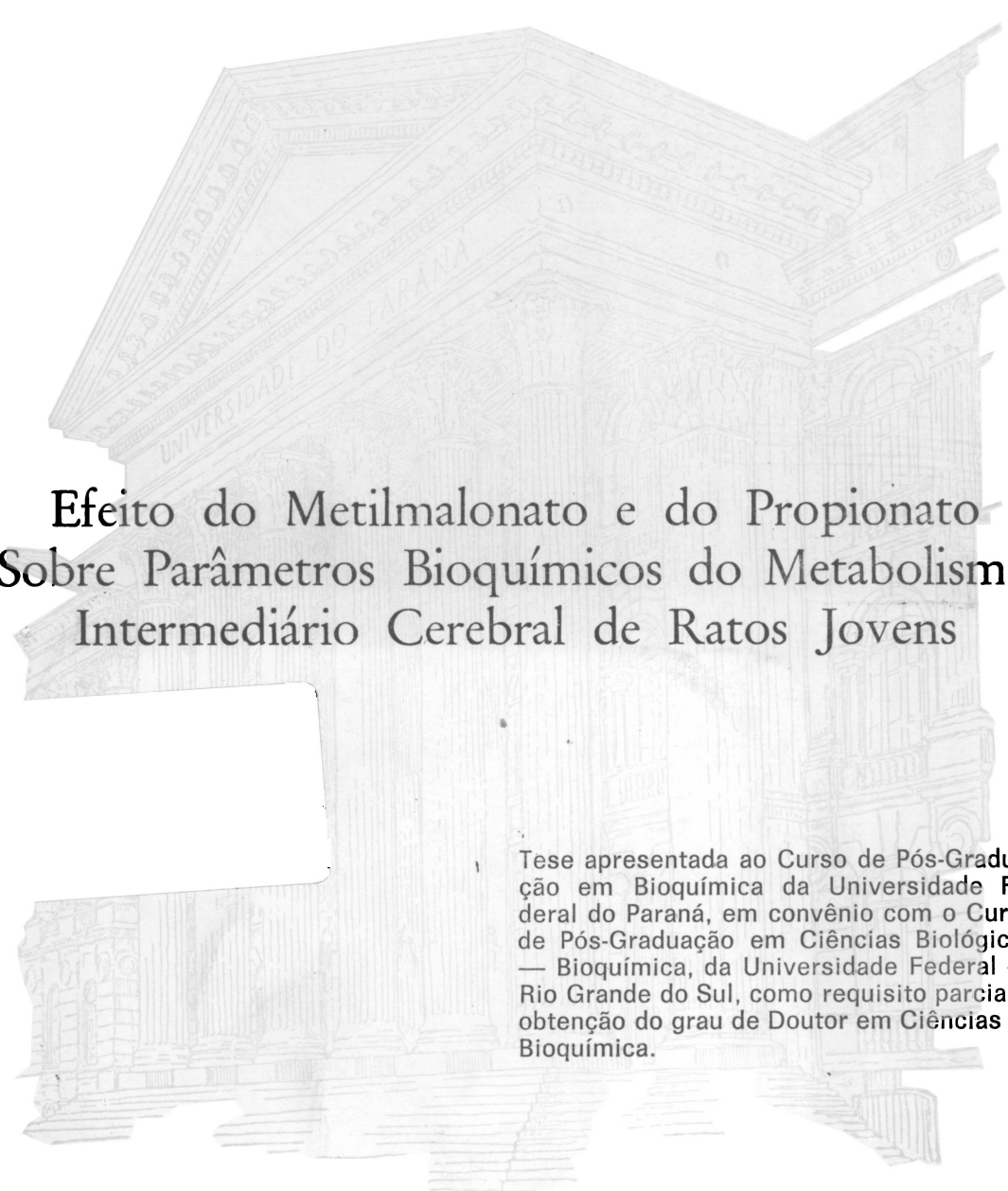


JANICE COELHO DUTRA



# Efeito do Metilmalonato e do Propionato Sobre Parâmetros Bioquímicos do Metabolismo Intermediário Cerebral de Ratos Jovens

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas — Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências — Bioquímica.

CURITIBA

1992

JANICE COELHO DUTRA

# Efeito do Metilmalonato e do Propionato Sobre Parâmetros Bioquímicos do Metabolismo Intermediário Cerebral de Ratos Jovens

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas — Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências — Bioquímica.

CURITIBA  
1992

JANICE COELHO DUTRA

EFEITO DO METILMALONATO E DO PROPIONATO SOBRE PARÂMETROS  
BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO CEREBRAL DE  
RATOS JOVENS

Tese aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Doutor no  
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica  
pela Comissão formada pelos  
Professores:

Orientador: Prof. Moacir Wajner  
UFRGS

Prof. Rui Curi  
USP - SP

Prof. Manoel Francisco Guimarães  
UFPR

Prof. Roberto Giugliani  
UFRGS

Prof. José Eduardo de Salles Roselino  
USP - Ribeirão Preto

Curitiba, 21 de agosto de 1992

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
E  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

EFEITO DO METILMALONATO E DO PROPIONATO SOBRE PARÂMETROS  
BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO CEREBRAL  
DE RATOS JOVENS

JANICE COELHO DUTRA

Orientador

Prof. Dr. MOACIR WAJNER

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Curitiba

1991



## AGRADECIMENTOS

Ao amigo, colega e orientador, prof. Moacir Wajner, pela orientação e carinho durante todos estes anos de nossa convivência.

Ao prof. Clóvis Wannmacher pela co-orientação e por estar ao meu lado nas horas mais difíceis.

Ao amigo e companheiro durante todo este trabalho, prof. Carlos S. Dutra Filho, pelo auxílio nas experiências, estatística e discussão dos resultados.

Aos bolsistas Carlos Frederico Wannmacher, Sílvia Elaine Cardozo e Eduardo Motta, sem os quais este trabalho teria levado o dobro do tempo para ser executado.

À Luiza, Ângela, Lavínia, Sandra, Fernanda, Ricardo e Roberto por todo incentivo, ajuda e carinho que sempre me forneceram.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica da UFRGS que me apoiaram e auxiliaram com sugestões, em especial ao prof. João J. F. Sarkis, ao prof. Marcos L. S. Perry e ao prof. Diogo O. G. de Souza.

Ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica da UFRGS, em especial aos seus funcionários e ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica da UFPR que proporcionou a realização deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES, FINEP, FAPERGS e PROPESP/UFRGS pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

Metilmalonato (MMA) e secundariamente propionato (PA) acumulam-se nos tecidos de pacientes afetados por um grupo de doenças hereditárias chamada metilmalonicacidemia. As crianças afetadas apresentam anormalidades neurológicas e um grau variável de retardo físico e mental. Pouco tem sido feito para identificar os mecanismos que levam à disfunção neurológica desses pacientes. O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito isolado do MMA e do PA sobre parâmetros bioquímicos do metabolismo intermediário cerebral de ratos Wistar de 15 dias de vida em jejum de 30 horas. Estudamos o efeito destes metabólitos sobre a utilização de glicose, sobre a glicólise aeróbica e anaeróbica, sobre a síntese de lipídios a partir de glicose ou acetato marcados e sobre a utilização de acetoacetato e beta-hidroxibutirato. Nossos resultados mostraram os seguintes efeitos sobre o metabolismo cerebral estudado: (1) MMA aumenta a utilização de glicose, mas PA não tem efeito sobre a mesma; (2) MMA e PA não interferem na atividade das enzimas hexoquinase, fosfofrutoquinase, piruvatoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase; (3) MMA aumenta e PA diminui a produção de lactato a partir de glicose; (4) MMA inibe competitivamente a enzima succinato desidrogenase em cérebro e também em fígado, mas PA não tem efeito significativo sobre a atividade desta enzima; (5) MMA inibe a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose ou acetato e esta inibição é também observada quando PA e acetato estão presentes no meio de incubação; (6) MMA e PA diminuem a síntese de lipídios a partir de acetato; (7) MMA inibe a utilização de beta-hidroxibutirato, mas não de acetoacetato e PA inibe a utilização dos dois corpos cetônicos; e (8) MMA inibe competitivamente a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase em cérebro e fígado enquanto PA não tem efeito sobre esta enzima. Os resultados mostram que o MMA e o PA interferem sobre alguns parâmetros estudados do metabolismo intermediário do cérebro de ratos em desenvolvimento e em jejum, e estes dados podem ser relevantes ao entendimento bioquímico das alterações clínicas encontradas na metilmalonicacidemia. Se esses achados ocorrem em humanos e quais as consequências que podem ter em uma criança com metilmalonicacidemia é objeto de futuras investigações.

## SUMARIO

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. INTRODUÇÃO.....                                                                                                    | 1  |
| I.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO.....                                                                                 | 1  |
| I.2. METILMALONICACIDEMIA.....                                                                                        | 5  |
| I.3. MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DE ERROS INATOS DO<br>METABOLISMO.....                                             | 11 |
| I.4. EFEITOS DO METILMALONATO, PROPIONATO E SEUS<br>DERIVADOS E PRECURSORES SOBRE O METABOLISMO<br>INTERMEDIÁRIO..... | 14 |
| I.5. METABOLISMO INTERMEDIÁRIO NO CÉREBRO DE RATOS EM<br>DESENVOLVIMENTO.....                                         | 20 |
| I.6. OBJETIVOS.....                                                                                                   | 26 |
| II. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                           | 27 |
| II.1. MATERIAL.....                                                                                                   | 27 |
| II.1.1. Reagentes.....                                                                                                | 27 |
| II.1.2. Soluções.....                                                                                                 | 29 |
| II.1.3. Equipamentos.....                                                                                             | 31 |
| II.1.4. Amostra.....                                                                                                  | 31 |
| II.2. PROCEDIMENTOS.....                                                                                              | 33 |
| II.2.1. Administração de ácido metilmalônico tamponado<br>(tratamento in vivo).....                                   | 33 |
| II.2.2. Preparação do cérebro e fígado.....                                                                           | 34 |
| II.2.3. Captação de glicose in vitro por prismas de<br>cérebro.....                                                   | 35 |
| II.2.3.1. Efeito do MMA e PA adicionados in vitro.....                                                                | 35 |
| II.2.3.2. Efeito da administração in vivo.....                                                                        | 36 |
| II.2.4. Captação de corpos cetônicos in vitro por prismas<br>de cérebro.....                                          | 36 |

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 11.2.4.1. Captação de acetoacetato in vitro por prismas de cérebro.....              | 36 |
| 11.2.4.2. Captação de beta-hidroxibutirato in vitro por prismas de cérebro.....      | 37 |
| 11.2.4.2.1. Efeito do MMA ePA adicionados in vitro.....                              | 37 |
| 11.2.4.2.2. Efeito da administração in vivo de MMA.....                              | 38 |
| 11.2.5. Produção de lactato in vitro a partir de glicose por prismas de cérebro..... | 39 |
| 11.2.5.1. Efeito do MMA ePA adicionados in vitro.....                                | 39 |
| 11.2.5.2. Efeito da administração in vivo de MMA.....                                | 40 |
| 11.2.6. Medida de atividades enzimáticas.....                                        | 40 |
| 11.2.6.1. Medida da atividade da hexoquinase.....                                    | 40 |
| 11.2.6.2. Medida da atividade da fosfofrutoquinase.....                              | 44 |
| 11.2.6.3. Medida da atividade da piruvatoquinase.....                                | 46 |
| 11.2.6.4. Medida da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase.....                | 50 |
| 11.2.6.5. Medida da atividade da succinato desidrogenase..                           | 53 |
| 11.2.6.5.1. Preparação da fração mitocondrial.....                                   | 53 |
| 11.2.6.5.2. Medida da atividade enzimática.....                                      | 53 |
| 11.2.6.6. Medida da atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase.....             | 57 |
| 11.2.6.6.1. Preparação do material enzimático.....                                   | 57 |
| 11.2.6.6.2. Medida da atividade enzimática.....                                      | 57 |
| 11.2.7. Dosagem de proteínas.....                                                    | 61 |
| 11.2.8. Produção de $CO_2$ a partir de substratos radioativos.....                   | 61 |
| 11.2.8.1. Produção de $CO_2$ a partir de glicose.....                                | 61 |
| 11.2.8.2. Produção de $CO_2$ a partir de acetato.....                                | 62 |

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 11.2.9. Incorporação de substratos radioativos em<br>lipídios.....                                                                             | 64 |
| 11.2.10. Análise estatística.....                                                                                                              | 65 |
| III. RESULTADOS.....                                                                                                                           | 66 |
| III.1. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE A<br>CAPTAÇÃO IN VITRO DE GLICOSE POR CÉREBRO DE RATOS<br>COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM..... | 66 |
| III.1.1. Efeito do metilmalonato e propionato adicionados<br>ao meio de incubação.....                                                         | 66 |
| III.1.2. Efeito da administração de metilmalonato sobre<br>a captação in vitro de glicose.....                                                 | 66 |
| III.2. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE<br>ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM RATOS COM 15 DIAS DE<br>VIDA, EM JEJUM.....                     | 69 |
| III.2.1. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a<br>atividade da hexoquinase de cérebro de ratos....                                      | 69 |
| III.2.2. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a<br>atividade da fosfofrutoquinase de cérebro de<br>ratos.....                            | 69 |
| III.2.3. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a<br>atividade da piruvatoquinase de cérebro de ra-<br>tos.....                            | 72 |
| III.2.4. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a<br>atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase de<br>cérebro de ratos.....              | 73 |

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| III.3. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO IN VITRO A PARTIR DE GLICOSE POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM..... | 73 |
| III.3.1. Efeito do metilmalonato e propionato adicionados ao meio de incubação.....                                                                          | 73 |
| III.3.2. Efeito da administração de metilmalonato sobre a produção in vitro de lactato a partir de glicose.....                                              | 76 |
| III.4. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE.....                                                                | 77 |
| III.4.1. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a atividade da succinato desidrogenase de cérebro de ratos.....                                          | 77 |
| III.4.2. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a atividade da succinato desidrogenase de fígado de ratos.....                                           | 79 |
| III.4.3. Efeito da administração de metilmalonato a ratos com 15 dias de vida, em jejum, sobre a atividade da succinato desidrogenase em cérebro.....        | 81 |
| III.4.4. Efeito da administração de metilmalonato a ratos com 15 dias de vida, em jejum, sobre a atividade da succinato desidrogenase em fígado.....         | 82 |
| III.4.5. Determinação do Km para a succinato desidrogenase de ratos de 15 dias de vida.....                                                                  | 83 |
| III.4.5.1. Determinação do Km para a succinato desidrogenase em cérebro de ratos.....                                                                        | 83 |

|                                                                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.4.5.2. Determinação do Km para a succinato desidrogenase em fígado de ratos.....                                                                                   | 85  |
| III.4.6. Determinação do tipo de inibição causada pelo metilmalonato sobre a succinato desidrogenase...                                                                | 87  |
| III.4.6.1. Determinação do tipo de inibição da succinato desidrogenase em cérebro de ratos.....                                                                        | 87  |
| III.4.6.2. Determinação do tipo de inibição da succinato desidrogenase em fígado de ratos.....                                                                         | 89  |
| III.4.7. Determinação do Ki do metilmalonato para a succinato desidrogenase.....                                                                                       | 91  |
| III.4.7.1. Determinação do Ki para a succinato desidrogenase em cérebro de ratos.....                                                                                  | 91  |
| III.4.7.2. Determinação do Ki para a succinato desidrogenase em fígado de ratos.....                                                                                   | 91  |
| III.5. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE A PRODUÇÃO DE CO <sub>2</sub> A PARTIR DE SUBSTRATOS RADIOATIVOS POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM  | 94  |
| III.5.1. Produção de CO <sub>2</sub> a partir de glicose.....                                                                                                          | 94  |
| III.5.2. Produção de CO <sub>2</sub> a partir de acetato.....                                                                                                          | 94  |
| III.6. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE A BIOSSÍNTESE DE LIPÍDIOS A PARTIR DE SUBSTRATOS RADIOATIVOS POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM..... | 97  |
| III.6.1. Biossíntese de lipídios a partir de glicose.....                                                                                                              | 97  |
| III.6.2. Biossíntese de lipídios a partir de acetato.....                                                                                                              | 97  |
| III.7. EFEITO DO METILMALONATO PROPIONATO SOBRE A CAPTAÇÃO IN VITRO DE CORPOS CETÔNICOS POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM.....                        | 100 |

|                                                                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.7.1. Efeito do metilmalonato e propionato adicionados ao meio de incubação sobre a captação de acetoacetato.....                                        | 100 |
| III.7.2. Efeito do metilmalonato e propionato adicionados ao meio de incubação sobre a captação de beta-hidroxibutirato.....                                | 100 |
| III.7.3. Efeito da administração de metilmalonato a ratos com 15 dias de vida, em jejum, sobre a captação de beta-hidroxibutirato.....                      | 103 |
| III.7.4. Efeito da administração de metilmalonato a ratos com 15 dias de vida, em jejum, sobre os níveis de beta-hidroxibutirato sanguíneos.....            | 103 |
| III.8. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE A ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE...                                                      | 106 |
| III.8.1. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro de ratos.....                              | 106 |
| III.8.2. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase de fígado de ratos.....                               | 106 |
| III.8.3. Efeito da administração de metilmalonato a ratos com 15 dias de vida, em jejum, sobre a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase em cérebro | 109 |
| III.8.4. Efeito da administração de metilmalonato a ratos com 15 dias de vida, em jejum, sobre a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase em fígado  | 109 |
| III.8.5. Determinação do Km para a beta-hidroxibutirato desidrogenase de ratos 15 dias de vida.....                                                         | 112 |



|                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.8.5.1. Determinação do Km para a beta-hidroxibutirato desidrogenase em cérebro de ratos.....                     | 112 |
| III.8.5.2. Determinação do Km para a beta-hidroxibutirato desidrogenase em fígado de ratos.....                      | 114 |
| III.8.6. Determinação do tipo de inibição causada pelo metilmalonato sobre a beta-hidroxibutirato desidrogenase..... | 116 |
| III.8.6.1. Determinação do tipo de inibição da beta-hidroxibutirato desidrogenase em cérebro de ratos.....           | 116 |
| III.8.6.2. Determinação do tipo de inibição da beta-hidroxibutirato desidrogenase em fígado de ratos.....            | 116 |
| III.8.7. Determinação do Ki do metilmalonato para a beta-hidroxibutirato desidrogenase.....                          | 119 |
| III.8.7.1. Determinação do Ki para a beta-hidroxibutirato desidrogenase em cérebro de ratos.....                     | 119 |
| III.8.7.2. Determinação do Ki para a beta-hidroxibutirato desidrogenase em fígado de ratos.....                      | 120 |
| IV. DISCUSSÃO.....                                                                                                   | 123 |
| V. CONCLUSÕES.....                                                                                                   | 141 |
| VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                  | 143 |
| ANEXOS.....                                                                                                          | 160 |

## LISTA DE TABELAS

|              |                                                                                                                                                         |    |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA I.1.  | -CLASSIFICAÇÃO DOS ERROS INATOS DO<br>METABOLISMO DE ACORDO COM A ÁREA DO<br>METABOLISMO ENVOLVIDA.....                                                 | 5  |
| TABELA II.1  | -COMPOSIÇÃO DA DIETA GERMANI.....                                                                                                                       | 32 |
| TABELA III.1 | -EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO<br>(PA) SOBRE A CAPTAÇÃO IN VITRO DE GLICOSE<br>POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA,<br>EM JEJUM.....  | 67 |
| TABELA III.2 | -CAPTAÇÃO IN VITRO DE GLICOSE POR CÉREBRO DE<br>RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM,<br>TRATADOS COM METILMALONATO (MMA) OU COM<br>SOLUÇÃO SALINA.....  | 68 |
| TABELA III.3 | -EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO<br>(PA) SOBRE A ATIVIDADE DA HEXOQUINASE<br>DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM<br>JEJUM.....       | 70 |
| TABELA III.4 | -EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO<br>(PA) SOBRE A ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOQUINASE<br>DE CÉREBRO COM RATOS DE 15 DIAS DE VIDA, EM<br>JEJUM..... | 71 |
| TABELA III.5 | -EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO<br>(PA) SOBRE A ATIVIDADE DA PIRUVATOQUINASE<br>DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM<br>JEJUM.....   | 72 |

|                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA III.6 -EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM.....      | 74 |
| TABELA III.7 -EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A PRODUÇÃO IN VITRO DE LACTATO A PARTIR DE GLICOSE POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM..... | 75 |
| TABELA III.8 -PRODUÇÃO IN VITRO DE LACTATO A PARTIR DE GLICOSE POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, TRATADOS COM METILMALONATO (MMA) OU COM SOLUÇÃO SALINA..... | 76 |
| TABELA III.9 -EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM.....              | 78 |
| TABELA III.10-EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM.....               | 80 |
| TABELA III.11-ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, TRATADOS COM METILMALONATO (MMA) OU COM SOLUÇÃO SALINA.....              | 81 |
| TABELA III.12-ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, TRATADOS COM METILMALONATO (MMA) OU COM SOLUÇÃO SALINA.....               | 82 |

|                                                          |     |
|----------------------------------------------------------|-----|
| TABELA III.13-EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO |     |
| (PA) SOBRE A PRODUÇÃO DE CO <sub>2</sub> A PARTIR DE     |     |
| <sup>14</sup> [2- C]GLICOSE POR CÉREBRO DE RATOS COM 15  |     |
| DIAS DE VIDA, EM JEJUM.....                              | 95  |
| TABELA III.14-EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO |     |
| (PA) SOBRE A PRODUÇÃO DE CO <sub>2</sub> A PARTIR DE     |     |
| <sup>14</sup> [U- C]ACETATO POR CÉREBRO DE RATOS COM 15  |     |
| DIAS DE VIDA, EM JEJUM.....                              | 96  |
| TABELA III.15-EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO |     |
| (PA) SOBRE A BIOSSÍNTESE DE LIPÍDIOS A                   |     |
| <sup>14</sup> PARTIR DE [2- C]GLICOSE POR CÉREBRO DE     |     |
| RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM.....                 | 98  |
| TABELA III.16-EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO |     |
| (PA) SOBRE A BIOSSÍNTESE DE LIPÍDIOS A                   |     |
| <sup>14</sup> PARTIR DE [U- C]ACETATO POR CÉREBRO DE     |     |
| RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM.....                 | 99  |
| TABELA III.17-EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO |     |
| (PA) SOBRE A CAPTAÇÃO IN VITRO DE                        |     |
| ACETOACETATO POR CÉREBRO DE RATOS COM 15                 |     |
| DIAS DE VIDA, EM JEJUM.....                              | 101 |
| TABELA III.18-EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO |     |
| (PA) SOBRE A CAPTAÇÃO IN VITRO DE BETA-                  |     |
| HIDROXIBUTIRATO POR CÉREBRO DE RATOS COM 15              |     |
| DIAS DE VIDA, EM JEJUM.....                              | 102 |
| TABELA III.19-CAPTAÇÃO IN VITRO DE BETA-HIDROXIBUTIRATO  |     |
| POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA,                |     |
| EM JEJUM.....                                            | 104 |

|                                                                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TABELA III.20-NÍVEIS SANGUÍNEOS DE BETA-HIDROXIBUTIRATO<br>EM RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM,<br>TRATADOS COM METILMALONATO (MMA) OU COM<br>SOLUÇÃO SALINA.....                   | 105 |
| TABELA III.21-EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO<br>(PA) SOBRE A ATIVIDADE DA BETA-<br>HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE<br>RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM..... | 107 |
| TABELA III.22-EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO<br>(PA) SOBRE A ATIVIDADE DA BETA-<br>HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE FÍGADO<br>DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM.....  | 108 |
| TABELA III.23-ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO<br>DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15<br>DIAS DE VIDA, EM JEJUM.....                                                             | 110 |
| TABELA III.24-ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO<br>DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS COM 15<br>DIAS DE VIDA, EM JEJUM.....                                                              | 111 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA I.1 - ROTA DE DEGRADAÇÃO DA PROPIONIL-CoA A<br>SUGGINIL-CoA.....                                                                                                                           | 6  |
| FIGURA II.1 - ATIVIDADE DA HEXOQUINASE DE CÉREBRO DE RA-<br>TOS DE 15 DIAS DE VIDA EM FUNÇÃO DA QUANTI-<br>DADE DE MATERIAL ENZIMÁTICO ADICIONADO AO<br>MEIO DE INCUBAÇÃO.....                    | 41 |
| FIGURA II.2 - CURVA DE TEMPO DA REAÇÃO DA HEXOQUINASE<br>DE CÉREBRO DE RATOS DE 15 DIAS DE VIDA.....                                                                                              | 43 |
| FIGURA II.3 - ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOQUINASE DE CÉREBRO<br>DE RATOS DE 15 DIAS DE VIDA EM FUNÇÃO DA<br>QUANTIDADE DE MATERIAL ENZIMÁTICO<br>ADICIONADO AO MEIO DE INCUBAÇÃO.....                  | 45 |
| FIGURA II.4 - CURVA DE TEMPO DA REAÇÃO DA FOSFOFRUTO-<br>QUINASE DE CÉREBRO DE RATOS DE 15 DIAS<br>DE VIDA.....                                                                                   | 46 |
| FIGURA II.5 - ATIVIDADE DA PIRUVATOQUINASE DE CÉREBRO DE<br>RATOS DE 15 DIAS DE VIDA EM FUNÇÃO DA<br>QUANTIDADE DE MATERIAL ENZIMÁTICO<br>ADICIONADO AO MEIO DE INCUBAÇÃO.....                    | 48 |
| FIGURA II.6 - CURVA DE TEMPO DA REAÇÃO DA PIRUVATOQUI-<br>NASE DE CÉREBRO DE RATOS DE 15 DIAS<br>DE VIDA.....                                                                                     | 49 |
| FIGURA II.7 - ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATO<br>DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS DE 15<br>DIAS DE VIDA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE<br>MATERIAL ENZIMÁTICO ADICIONADO AO MEIO DE<br>INCUBAÇÃO..... | 51 |

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA II.8 - CURVA DE TEMPO DA REAÇÃO DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS DE 15 DIAS DE VIDA.....                                                                                        | 52 |
| FIGURA II.9 - ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO (A) E DE FÍGADO (B) DE RATOS DE 15 DIAS DE VIDA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE MATERIAL ENZIMÁTICO ADICIONADO AO MEIO DE INCUBAÇÃO.....            | 55 |
| FIGURA II.10 -CURVA DE TEMPO DA REAÇÃO DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO (A) E DE FÍGADO (B) DE RATOS DE 15 DIAS DE VIDA.....                                                                            | 56 |
| FIGURA II.11 -ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO (A) E DE FÍGADO (B) DE RATOS DE 15 DIAS DE VIDA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE MATERIAL ENZIMÁTICO ADICIONADO AO MEIO DE INCUBAÇÃO..... | 58 |
| FIGURA II.12 -CURVA DE TEMPO DA REAÇÃO DA BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO (A) E DE FÍGADO (B) DE RATOS DE 15 DIAS DE VIDA.....                                                                 | 60 |
| FIGURA II.13 -FRASCO UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DE CO <sub>2</sub> A PARTIR DE SUBSTRATOS RADIOATIVOS.....                                                                                                    | 63 |
| FIGURA III.1 -DETERMINAÇÃO DO Km PARA A SUCCINATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS DE 15 DIAS DE VIDA. (A) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE MICHAELIS-MENTEN. (B) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK.....   | 84 |

|                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA III.2 -DETERMINAÇÃO DO $K_m$ PARA A SUCCINATO<br>DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS DE 15<br>DIAS DE VIDA. (A) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE<br>MICHAELIS-MENTEN. (B) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA<br>DE LINEWEAVER E BURK..... | 86 |
| FIGURA III.3 -REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK<br>PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO DE INIBIÇÃO<br>CAUSADA PELO METILMALONATO SOBRE A<br>SUCCINATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS<br>DE 15 DIAS DE VIDA.....        | 88 |
| FIGURA III.4 -REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK<br>PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO DE INIBIÇÃO<br>CAUSADA PELO METILMALONATO SOBRE A<br>SUCCINATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS<br>DE 15 DIAS DE VIDA.....         | 90 |
| FIGURA III.5 -REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE DIXON PARA<br>DETERMINAÇÃO DO $K_i$ PARA O METILMALONATO<br>SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO<br>DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS DE 15<br>DIAS DE VIDA.....                        | 92 |
| FIGURA III.6 -REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE DIXON PARA<br>DETERMINAÇÃO DO $K_i$ PARA O METILMALONATO<br>SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO<br>DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS DE 15<br>DIAS DE VIDA.....                         | 93 |



FIGURA III.7 -DETERMINAÇÃO DO  $K_m$  PARA A BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS DE 15 DIAS DE VIDA. (A) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE MICHAELIS-MENTEN. (B) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK.113

FIGURA III.8 -DETERMINAÇÃO DO  $K_m$  PARA A BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS DE 15 DIAS DE VIDA. (A) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE MICHAELIS-MENTEN. (B) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK.115

FIGURA III.9 -REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO DE INIBIÇÃO CAUSADA PELO METILMALONATO SOBRE A BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS DE 15 DIAS DE VIDA.....117

FIGURA III.10-REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO DE INIBIÇÃO CAUSADA PELO METILMALONATO SOBRE A BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS DE 15 DIAS DE VIDA.....118

FIGURA III.11-REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE DIXON PARA DETERMINAÇÃO DO  $K_i$  PARA O METILMALONATO SOBRE A ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS DE 15 DIAS DE VIDA.....120

FIGURA III.12-REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE DIXON PARA  
DETERMINAÇÃO DO  $K_i$  PARA O METILMALONATO  
SOBRE A ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO  
DESIDROGENASE DE FÍREGADO E RATOS DE 15  
DIAS DE VIDA.....122

## ABREVIATURAS

|       |   |                                    |                          |
|-------|---|------------------------------------|--------------------------|
| ADP   | - | adenosina 5'-difosfato             |                          |
| ATP   | - | adenosina 5'-trifosfato            |                          |
| DCIP  | - | 2,6-diclorofenolindofenol          |                          |
| EIM   | - | erros inatos do metabolismo        |                          |
| MMA   | - | metilmalonato                      |                          |
| MMCoA | - | metilmalonil coenzima A            |                          |
| NAD   | - | nicotinamida adenina dinucleotídio | (forma oxidada)          |
| NADH  | - | nicotinamida adenina dinucleotídio | (forma reduzida)         |
| NADP  | - | nicotinamida adenina dinucleotídio | fosfato (forma oxidada)  |
| NADPH | - | nicotinamida adenina dinucleotídio | fosfato (forma reduzida) |
| PA    | - | propionato                         |                          |
| PCA   | - | ácido perclórico                   |                          |
| PCoA  | - | propionil coenzima A               |                          |
| TCA   | - | ácido tricloroacético              |                          |
| TRIS  | - | tris(hidroximetil)-aminometano     |                          |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO

Em 1908, Sir Archibald Garrod, usou pela primeira vez o termo Erros Inatos do Metabolismo (EIM). Seus estudos foram inicialmente realizados em pacientes com alcaptonúria, uma doença em que o indivíduo afetado excreta grandes quantidades de ácido homogentísico na urina, o que não ocorre em pessoas normais. Ele observou que esta doença tinha uma concentração familiar e que frequentemente um ou mais indivíduos na mesma família eram afetados embora seus pais ou outros parentes fossem normais. Outro fato que chamou sua atenção foi a maior incidência de consanguinidade entre os pais destes pacientes. Como na época as leis de Mendel tinham sido recém descobertas, Garrod, propôs um modelo de herança autossômica recessiva para estes distúrbios.

Além de observar pacientes com alcaptonúria, Garrod também estudou outros EIM como a cistinúria, o albinismo e a pentosúria e desenvolveu o conceito de que esses EIM eram devidos à deficiência total ou parcial de uma substância que catalisa um determinado passo em uma rota metabólica. Ele observou, por exemplo, que o acúmulo de ácido homogentísico na urina de pacientes com alcaptonúria mostrava que essa substância era um metabólito normal da degradação da tirosina e que seu acúmulo era devido a uma falha na conversão do ácido homogentísico até fumarato e

acetoacetato. Novas descobertas foram sendo realizadas, tendo sido identificadas e as proteínas deficientes responsáveis pelo acúmulo das substâncias na urina dos pacientes investigados por Garrod.

Mais tarde foi demonstrado que cada gene exercia influência sobre a síntese de uma determinada enzima, a qual catalisava um passo de uma rota metabólica. A partir disto, Beadle e Tatum em 1941, desenvolveram o conceito "um gene - uma enzima" que, entre outras coisas, expressava que toda reação bioquímica estava sob controle de um único gene e que a mutação deste ocasionava uma alteração da habilidade celular em realizar uma reação química. Com o desenvolvimento, em anos mais recentes, de técnicas que permitiram identificar a base bioquímica de algumas doenças genéticas, entre elas muitos EIM, o conceito "um gene - uma enzima" foi modificado para "um gene - uma proteína", abrangendo assim, uma classe maior de compostos. Hoje, este conceito foi restrito para "um cistron - uma cadeia polipeptídica", ou seja, as alterações genéticas resultam na síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, enzimática ou não (Beaudet et al., 1989).

Quando a cadeia polipeptídica afetada faz parte de uma enzima, a deficiência total ou severa da atividade enzimática resulta em um bloqueio de uma rota metabólica, o que leva, por um lado, ao acúmulo de seu substrato, precursores e derivados anteriores ao bloqueio, que podem ser produtos tóxicos e, por outro, à falta de substâncias

posteriores ao bloqueio que podem ser essenciais ao organismo.

Foram descritos até o momento mais de 300 EIM (McKusick, 1990), a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Benson e Fensom, 1985).

A frequência conjunta destas doenças é de aproximadamente 1 caso para cada 1000 recém nascidos (Lubs, 1977), em sua maioria herdadas de forma autossômica recessiva. Em muitas dessas desordens a mortalidade é alta e os sobreviventes podem apresentar um grau variável de retardo físico e/ou mental. Em outras, a instalação do quadro clínico é lenta, levando, em muitos casos, à disfunção neurológica (como retardo mental, convulsões) ou de outros órgãos. Devido a este fato, o estudo destas doenças tem sido muito importante, pois a descoberta da etiopatogenia em algumas delas tem contribuído para um tratamento mais eficaz, baseado em terapêuticas dietéticas e medicamentosas com a finalidade de prevenir e/ou amenizar o quadro clínico. Em alguns casos, o estudo a nível bioquímico-molecular dessas patologias levou à elucidação de rotas metabólicas até então desconhecidas. Outro aspecto que evoluiu na última década foi o diagnóstico pré-natal, hoje disponível para muitas dessas desordens, permitindo-se que o EIM seja detectado no feto antes do nascimento, possibilitando ao casal optar pela interrupção da gestação quando um tratamento eficaz não é possível. Mesmo que o EIM detectado não seja tratável, o diagnóstico é importante para

o aconselhamento genético das famílias envolvidas, de modo a que possam evitar o nascimento de novos afetados.

A tabela 1.1 mostra a classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo envolvida. Os EIM mais exhaustivamente estudados têm sido os do metabolismo dos aminoácidos. Isto deriva do fato deles apresentarem uma frequência populacional relativamente alta, de muitos deles serem passíveis de detecção precoce em recém-nascidos por métodos simples e de vários deles possuírem um tratamento dietético que, se aplicado precocemente, previne a instalação do quadro clínico. Com o aprimoramento de técnicas laboratoriais de diagnóstico, outros EIM passaram a ganhar importância nos últimos anos. Destacando-se o grupo dos EIM dos ácidos orgânicos. Já em 1980, Chalmers et al. observaram, em pacientes hospitalizados, que a prevalência das acidúrias orgânicas era até maior do que a das aminoacidopatias. Outros trabalhos realizados a seguir enfatizaram a frequência relativamente alta destes distúrbios. O interesse por este grupo de doenças tem sido crescente, mas ainda poucas informações estão disponíveis na literatura internacional.

Mais de 45 doenças são hoje reconhecidas como acidúrias orgânicas, nas quais um ou mais ácidos orgânicos acumulam-se nos tecidos dos afetados (Chalmers e Lawson, 1982). Dentre as acidúrias orgânicas a metilmalonicacidemia é das mais frequentes, com uma prevalência de 1 para cada 29.000 nascimentos vivos (Ledley et al., 1984). A propionicacidemia

é um outro distúrbio pertencente à mesma rota metabólica.

TABELA 1.1 - CLASSIFICAÇÃO DOS ERROS INATOS DO METABOLISMO  
DE ACORDO COM A ÁREA DO METABOLISMO ENVOLVIDA

---

EIM dos aminoácidos  
EIM dos ácidos orgânicos  
EIM dos glicídios  
EIM dos lipídios  
EIM dos glicosaminoglicanos  
EIM das glicoproteínas  
EIM das purinas e pirimidinas  
EIM das enzimas eritrocitárias  
EIM dos metais  
EIM das lipoproteínas  
EIM dos hormônios  
EIM das proteínas plasmáticas

---

## 1.2. METILMALONICACIDEMIA

A metilmalonicacidemia foi descrita pela primeira vez por Oberholzer et al. e Storke et al. em 1967. Caracteriza-se principalmente pelo acúmulo de metilmalonato (MMA) nos tecidos devido a um defeito na atividade da enzima metilmalonil-CoA mutase que realiza a conversão de L-metilmalonil-CoA (MMCoA) a succinil-CoA (figura 1.1).



Valina  
Isoleucina  
Treonina  
Metionina  
Colesterol  
Ácidos graxos de cadeia ímpar de carbonos

5

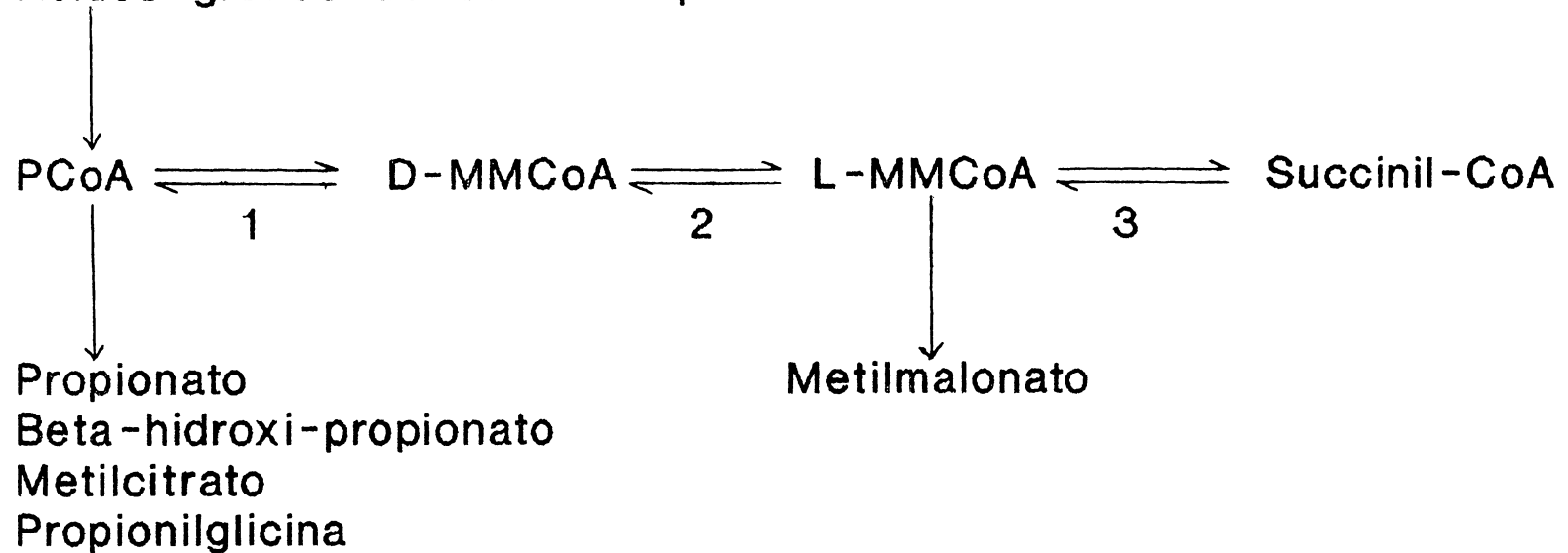


FIGURA I.1 -

ROTA DE DEGRADACAO DA PROPIONIL-CoA A SUCCINIL-CoA

Legenda: PCoA - propionil-CoA; MMCoA - metilmalonil-CoA; 1 - propionil-CoA carboxilase; 2 - metilmalonil-CoA racemase; 3 - metilmalonil-coA mutase (Rosenberg e Fenton, 1989).

O bloqueio neste passo da rota metabólica leva ao acúmulo de MMCoA, o qual se converte espontaneamente em MMA. O reverso desta reação até hoje não foi descrito. Outros metabólitos, precursores e derivados, acumulam-se secundariamente, salientando-se em primeiro lugar o propionato (PA), seguindo-se após beta-hidroxipropionato, tiglate, metilcitrato e propionilglicina. A administração de precursores do PA e do MMA como metionina, treonina, valina, isoleucina, colesterol, ácidos graxos de cadeia ímpar de carbonos e timina é responsável por um aumento significativo nas concentrações teciduais do MMA e dos outros metabólitos neste distúrbio.

Os indivíduos afetados apresentam um quadro clínico usualmente severo com hipotonia, letargia e progressão para coma, vômitos e convulsões. Os que sobrevivem ao estágio inicial sem tratamento, usualmente apresentam um retardo mental de grau variável. O quadro laboratorial caracteriza-se principalmente por acidose metabólica ocorrendo também cetonemia ou cetonúria, hiperamonemia, hipoglicemia, hiperglicinemia, neutropenia e trombocitopenia (Rosenberg e Fenton, 1989).

Alterações morfológicas no sistema nervoso central a nível de globus pallidus, em pacientes portadores de metilmalonicacidemia, já foram descritas (Korf et al., 1986; Heidenreich et al., 1988; de Sousa et al., 1989 e Roodhooft et al., 1990). Segundo de Sousa et al. (1989), o surgimento destas alterações pode ter sido desencadeado por episódios de cetoacidose, mas provavelmente piorou como resultado da

exposição continuada a metabólitos tóxicos. Esta hipótese também é sustentada por Roodhooft et al. (1990) que afirma serem os ácidos orgânicos acumulados um dos prováveis agentes causadores das lesões do gânglio da base. Segundo estes autores, embora dados de autópsia de pacientes portadores de metilmalonicacidemia sejam raros, já foi demonstrado em alguns pacientes necrose do putamen, espongiose e gliose do globus pallidus, espongiose difusa do córtex cerebral, da substância branca do cérebro e dos hemisférios cerebelares. Foram relatadas, ainda, anormalidades neuropsiquiátricas em pacientes com metilmalonicacidemia associada à deficiência de cobalamina (Lindenbaum et al., 1987).

O nível de MMA no sangue de indivíduos afetados pelo distúrbio é da ordem de 2,9 mM e a quantidade excretada na urina varia de 240 a 5700 mg/24 horas, enquanto em indivíduos normais o metabólito não é detectado no sangue e a excreção urinária diária é inferior a 5 mg. Recentemente, Gerhardt et al. (1991), registraram o caso de um paciente adulto, portador de metilmalonicacidemia, que apresentava níveis plasmáticos de MMA da ordem de 10 mM e urinários de 6100mmol/mol de creatinina. Este paciente apresentava retardo mental, mas as alterações morfológicas a nível do sistema nervoso central não puderam ser analisadas. Nos poucos pacientes onde foi medido, o nível de MMA no líquido céfalo raquidiano foi igual ao do plasma (Rosenberg e Fenton, 1989).

A metilmalonicacidemia é, na realidade, um conjunto de desordens, podendo ser classificada, de acordo com o defeito bioquímico envolvido, em oito variantes. As duas variantes mais comuns são a mut<sup>0</sup>, onde a enzima metilmalonil-CoA mutase está totalmente inativa, e a mut<sup>2</sup>, com 2 a 75% da atividade enzimática normal. Cinco variantes estão relacionadas com defeitos na síntese ou no transporte do cofator da metilmalonil-CoA mutase, a adenosilcobalamina, um derivado da vitamina B<sup>12</sup>. Estas variantes foram denominadas Cbl A, Cbl B, Cbl C, Cbl D e Cbl F. Na variante Cbl A ocorre a deficiência em uma das cobalaminas redutases mitocondriais e na classe Cbl B ocorre a deficiência de cob(II)alamina adenosiltransferase. Os outros três grupos, Cbl C, Cbl D e Cbl F, estão associados com defeitos na síntese de adenosilcobalamina e de metilcobalamina. As variantes Cbl D e Cbl C são devidas a defeitos no metabolismo citosólico das cobalaminas. A diferença entre as duas reside na severidade dos distúrbios apresentados, sendo o tipo C o mais severo. Na variante Cbl F, o defeito está no transporte da cobalamina formada para fora do lisossoma (Rosenberg e Fenton, 1989). A oitava variante de metilmalonicacidemia foi identificada por Ledley et al. em 1984 e denominada de metilmalonicacidemia benigna, pois os pacientes, apesar de excretarem quantidades elevadas de MMA na urina e apresentarem uma mutação envolvendo a enzima metilmalonil-CoA mutase, não apresentam qualquer sintomatologia.

O diagnóstico da metilmalonicacidemia é feito pela detecção de altas concentrações de MMA na urina e sangue dos afetados através de cromatografia gasosa. Também é possível realizar-se o diagnóstico pré-natal através da quantificação de MMA e metilcitrato no líquido amniótico e de ensaios enzimáticos em cultura de células deste líquido (Chalmers e Lawson, 1982; Sweetman et al., 1982 e Fensom et al., 1984). A identificação da variante de metilmalonicacidemia envolvida é realizada através de ensaios enzimáticos em fibroblastos cultivados in vitro na presença ou ausência de vitamina B<sub>12</sub> e dosagens séricas de cobalamina (Rosenberg e Fenton, 1989).

Uma dieta com baixa concentração protéica e principalmente pobre nos aminoácidos valina, isoleucina, metionina e treonina e outros precursores do PA e do MMA tem sido o tratamento empregado para a metilmalonicacidemia. A adição de carnitina à dieta foi proposta em 1984 simultaneamente por Di Donato et al. e por Sugiyama et al., tendo-se mostrado eficaz. A carnitina liga-se à propionil-CoA através da carnitina acetiltransferase (Bohmer e Bremer, 1968), facilitando dessa forma a excreção de propionil-CoA, a qual, segundo Di Donato et al. (1984), é excretada em grandes quantidades por portadores de metilmalonicacidemia e de propionicacidemia, causando diminuição dos níveis de carnitina nos tecidos. Por outro lado, afetados pelos tipos Cbl A e Cbl B melhoram clínica e laboratorialmente com a suplementação de vitamina B<sub>12</sub> à dieta.

### 1.3. MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DE ERROS INATOS DO METABOLISMO

A deficiência da atividade enzimática nos EIM pode ser detectada por ensaios específicos e os metabólitos acumulados podem ser detectados por análises bioquímicas dos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes afetados. Deste modo, pode-se determinar a enzima envolvida e as substâncias acumuladas e/ou excretadas em cada EIM, mas isto não esclarece sobre a cadeia completa de eventos que afeta o desenvolvimento de um determinado órgão, como por exemplo o cérebro ou o fígado. Embora, às vezes, até a localização celular do defeito e as estruturas cerebrais afetadas sejam conhecidas, a dificuldade reside em estabelecer a hierarquia dos eventos, distinguindo entre causa e efeito (Herschkowitz, 1982).

Os modelos animais de EIM humanos podem ser de grande ajuda para o estudo destes mecanismos, pois permitem investigar isoladamente as diferentes variáveis que podem estar envolvidas com a etiopatologia do distúrbio. Os modelos animais não mimetizam completamente a doença humana, mas auxiliam no entendimento de alguns aspectos desta, como, por exemplo, os efeitos dos metabólitos sobre o metabolismo de determinados órgãos. Alguns modelos animais que procuram mimetizar a metilmalonicacidemia foram descritos na literatura.

O primeiro modelo animal proposto para a metilmalonicacidemia baseia-se na retirada da vitamina B<sub>12</sub> da dieta (Barnes et al., 1963; William et al., 1969;

Cardinale et al., 1969; Weidemann e Krebs, 1969 e Orlando et al., 1973), levando à excreção urinária elevada de MMA devida à deficiência do cofator adenosilcobalamina. Embora este modelo tenha sido útil para o estudo de várias alterações bioquímicas envolvidas nesta patologia, ele causa anemia megaloblástica nos animais, fato não observado na metilmalonicacidemia humana.

Patel et al. (1976) propuseram um modelo agudo para metilmalonicacidemia baseado em três injeções intraperitoneais de MMA em ratos de uma semana de vida com intervalos de duas horas entre cada injeção. Os autores não registraram o nível de MMA no sangue e outros tecidos dos ratos submetidos a este tratamento. Este modelo, embora tenha simulado a doença e se prestado para os estudos bioquímicos propostos, causou uma mortalidade de 10% no grupo experimental, talvez devido às altas doses de MMA injetadas.

Bhatt e Linnell em 1983 demonstraram que estreptozotocina, uma droga que usualmente produz diabetes melito, induzia metilmalonicacidúria. Em 1989, Bailey et al., contestaram este modelo afirmando que os níveis de MMA encontrados no plasma e nos tecidos destes animais não estavam elevados, sendo portanto inadequado para o estudo da metilmalonicacidemia. Estes autores quantificaram MMA por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa, uma técnica muito mais sensível do que a cromatografia por camada delgada utilizada por Bhatt e Linnell (1983).

Dutra (1987) e Dutra et al. (1991) propuseram um modelo para estudar o efeito isolado do MMA, baseado na administração crônica subcutânea de MMA tamponado duas vezes ao dia durante o período de desenvolvimento pós-natal do rato. Não foi verificada nenhuma mortalidade no grupo experimental e os níveis de MMA plasmático atingidos por este grupo foram similares aqueles encontrados na metilmalonicacidemia humana. Este modelo foi utilizado para estudos comportamentais em ratos adultos e também para a determinação do efeito da administração crônica do MMA sobre as concentrações de gangliosídeos, DNA, RNA e proteínas no cérebro e cerebelo dos mesmos (Wajner et al., 1988; Dutra et al., 1991).

Recentemente, Brass et al. (1990), produziram metilmalonicacidemia em ratos após a administração subcutânea de um análogo da cobalamina, a hidroxicobalamina[c-lactamo]. A administração *in vivo* deste composto causou uma diminuição nos níveis de cobalamina e um decréscimo na atividade da metilmalonil-CoA mutase no fígado dos ratos. Os animais tratados com este análogo da cobalamina apresentaram uma excreção urinária de MMA, 700 vezes maior que os animais controles, um aumento na excreção urinária de propionilcarnitina e um aumento no conteúdo de acilcarnitina de cadeia curta no plasma e fígado. Os autores afirmam que o tratamento com hidroxicobalamina[c-lactamo] produz defeitos metabólicos menos heterogêneos do que o tratamento com retirada de vitamina B<sub>12</sub> da dieta e também que já com 2 semanas de tratamento os animais desenvolvem



uma metilmalonicacidúria tão severa quanto aquela desenvolvida pela remoção da vitamina B<sub>12</sub>, a qual necessita de 12 a 30 semanas de dieta especial para produzir os resultados esperados.

#### 1.4. EFEITOS DO METILMALONATO, PROPIONATO E SEUS DERIVADOS E PRECURSORES SOBRE O METABOLISMO INTERMEDIÁRIO

Pouco tem sido descrito na literatura sobre os efeitos do MMA e do PA, principais metabólitos acumulados na metilmalonicacidemia e propionicacidemia, sobre o metabolismo dos indivíduos afetados, e mais especificamente sobre o metabolismo intermediário cerebral. Os trabalhos publicados, na maioria das vezes em fígado de ratos, utilizam precursores ou derivados, bem como análogos destes ácidos orgânicos, numa tentativa de relacioná-los com as principais alterações bioquímicas presentes nestas patologias, como por exemplo, a hipoglicemia, a cetonemia, a hiperglicinemia e a hiperamonemia.

Utter et al. (1970) pesquisaram o efeito da MMCoA sobre a piruvato carboxilase e observaram que aquele metabólito inibia significativamente esta enzima gliconeogênica. Para eles, esta inibição poderia causar diminuição da gliconeogênese levando à hipoglicemia encontrada nos pacientes com metilmalonicacidemia.

Weideman et al (1970) observaram que MMA inibia a gliconeogênese a partir de PA em fígado e rim de ratos deficientes em vitamina B<sub>12</sub>. Os autores afirmaram que esta

não poderia corresponder a uma inibição da piruvato carboxilase, pois esta enzima não está envolvida na formação de glicose a partir de PA. A mesma inibição não foi verificada a partir de lactato, succinato e fumarato. Quando hidroxycobalamina era adicionada ao meio de incubação, a capacidade das fatias de córtex de rim de metabolizarem o PA voltava ao normal. Os resultados mostraram que ratos deficientes em vitamina B<sub>12</sub> formavam menos glicose e captavam menos PA que os ratos normais.

Williamson et al. (1970), trabalhando com butilmalonato, um análogo do malonato, verificaram que este composto inibia competitivamente o transporte de malato através da mitocôndria de fígado de ratos em jejum e também a troca de malato por fosfato inorgânico. Além disso, pelos resultados obtidos, concluíram que poderiam haver possíveis sítios inibitórios a nível das enzimas piruvato carboxilase, gliceraldeído-fosfato desidrogenase e frutose-difosfato fosfatase ou sítios ativadores a nível da piruvatoquinase e fosfofrutoquinase. A inibição do transporte mitocondrial de malato por MMA foi confirmada no ano seguinte por Halperin et al. (1971) em mitocôndria de fígado de rato. Os autores utilizaram MMA e verificaram que o mesmo era substrato para o sistema de transporte de malato, alfa-cetoglutarato e isocitrato, embora a inibição fosse específica para o sistema de transporte do primeiro metabólito.

A inibição da incorporação de acetil-CoA e malonil-CoA em ácidos graxos por MMCoA em fígado de rato foi descrita por Cardinale et al. em 1970. Os resultados mostraram também

que MMCoA se incorpora nas posições não terminais dos ácidos graxos resultando em ácidos graxos saturados e ramificados. Segundo os autores, é possível que a síntese desses ácidos graxos anormais afete as propriedades das membranas onde eles estiverem incorporados.

Ando et al. (1972), por sua vez, verificaram que o metilcitrato, formado pela condensação intramitocondrial da propionil-CoA com o oxalacetato, inibe a citrato sintase e a isocitrato desidrogenase através de um efeito similar ao do fluorcitrato ou fluoracetato. Isto poderia contribuir para um aumento no nível dos corpos cetônicos por conversão do citrato acumulado em acetil-CoA e desta em acetoacetato.

A inibição da acetil-CoA carboxilase e da ácido graxo sintase por MMCoA em fígado e tecido nervoso de ratos tratados com dieta deficiente em vitamina B foi descrita por Frenkel et al. (1973). Em 1984, Wahle et al.,<sup>12</sup> demonstraram que MMCoA inibe a ácido graxo sintase, a acetil-CoA carboxilase e a propionil-CoA carboxilase e propionil-CoA inibe a acetil-CoA carboxilase em glândula mamária de bovinos.

Em 1975, Chema-Dadhli et al, confirmaram os dados obtidos por Ando et al. (1972). Os autores verificaram que metilcitrato inibe a citrato sintase, a isocitrato desidrogenase e a aconitase de fígado de rato.

Por outro lado, a beta-hidroxibutirato desidrogenase de fígado de porco e coração de rato, porco e boi é inibida competitivamente pelo MMA (Tan et al., 1975). Embora não

haja nenhum trabalho demonstrando a inibição da beta-hidroxi-butirato desidrogenase no cérebro, Patel et al. (1976) verificaram que a oxidação até  $\text{CO}_2$  de beta-hidroxi-butirato marcado e sua incorporação em lipídios cerebrais por fatias de córtex cerebral de ratos de uma semana de vida são significativamente inibidas por MMA. Observaram também que MMA não possui efeito sobre a oxidação de acetoacetato, glicose e acetato a  $\text{CO}_2$  por fatias de cérebro. Também foi verificado pelos mesmos autores que a síntese de lipídios cerebrais estava diminuída quando PA era adicionado ao meio de incubação a partir de acetato marcado.

Já Arinze et al. (1979) verificaram em fígado de rato que MMA inibe a gliconeogênese a partir de lactato, PA, piruvato e alanina, mas não a partir de glicerol e xilitol, o que os fez concluir que o sítio de inibição seria anterior ao nível das trioses fosfato na rota gliconeogênica, podendo corresponder ao transporte de metabólitos através da membrana mitocondrial.

Uma das possíveis causas para a hiperglicinemia foi levantada por Hillman e Otto (1974). Estes autores observaram que a oxidação da glicina à serina era inibida por isoleucina e tiglato (um catabólito do metabolismo da isoleucina) em cultura de fibroblastos humanos. Estes dois compostos estão presentes em quantidades significativas nos pacientes com metilmalonicacidemia e propionacidemia.

A hiperamonemia, presente na metilmalonicacidemia e na propionacidemia, foi estudada por Glasgow e Chase (1976). Eles observaram que PA inibe a síntese de uréia em fatias de

fígado de ratos com amônia como substrato, embora o mesmo não ocorresse quando aspartato ou citrulina eram utilizados como substratos. Foi verificado também que PA não inibe diretamente a enzima carbamil-fosfato sintetase I ou a ornitina transcarbamilase, sugerindo que o bloqueio não seja devido à depleção de ornitina ou à ação direta do PA sobre as enzimas acima. Os autores sugerem, como sítios de bloqueio, uma inibição direta pela PCoA do transporte de citrulina e ornitina através da membrana mitocondrial ou a depleção de um substrato da reação da carbamil-fosfato sintetase I.

Em 1979, Coude et al. demonstraram uma inibição competitiva da síntese de N-acetilglutamato (ativador alostérico da carbamil fosfato sintetase I) por PCoA em relação à acetil-CoA. Foi também verificado que o PA reduz a síntese da uréia a 60% do normal a partir de ornitina e amônia em fígado de rato. Já Stewart e Walser (1980), baseados no aumento dos níveis de aspartato e citrulina de ratos tratados com MMA, concluíram que o MMA pode exercer efeito inibitório sobre a argininossuccinato sintetase. Além disso, estes autores sugerem um outro mecanismo para a hiperamonemia. A deficiência do substrato acetil-CoA ou a inibição competitiva da N-acetilglutamato sintetase por PCoA levaria à diminuição da síntese de N-acetilglutamato e, conseqüentemente, ao aumento dos níveis plasmáticos de amônia.

Em 1982, Hayasaka et al., observaram que pacientes com

propionicacidemia e metilmalonicacidemia possuíam a atividade da citocromo oxidase significativamente reduzida quando comparados com indivíduos normais, mas não conseguiram demonstrar qualquer efeito do PA, MMA, tiglato, succinato, propionil-CoA e tigilil-CoA sobre a atividade da citocromo oxidase de mitocôndria de fígado de rato.

Patel et al. (1983) em estudos com fígado de rato verificaram que este metabólito quando em baixa concentração (0,5mM) inibe o complexo enzimático da piruvato desidrogenase, mas na concentração de 10 mM, o efeito é de ativação. A inibição enzimática foi explicada pela diminuição dos níveis de coenzima A livre (ativador da piruvato desidrogenase) e a ativação, por um efeito direto do PA sobre a piruvato desidrogenase quinase inibindo-a e consequentemente ativando o complexo piruvato desidrogenase. O efeito ativador foi comprovado quando ATP foi adicionado ao meio de incubação contendo PA. Neste caso, o PA anula o efeito do ATP sobre a piruvato desidrogenase quinase que permanece na forma defosforilada e inativa, permitindo o funcionamento do complexo piruvato desidrogenase.

Em 1988, Wajner et al., observaram que ratos tratados cronicamente com MMA, do 5<sup>o</sup> ao 25<sup>o</sup> dia de vida, possuem níveis de gangliosídeos cerebelares menores ao final do tratamento quando comparados com ratos que haviam recebido solução salina durante o mesmo período. Os níveis de DNA no cerebelo destes animais não estavam alterados indicando uma provável ação do MMA sobre a sinaptogênese.

## 1.5. METABOLISMO INTERMEDIÁRIO NO CÉREBRO DE RATOS EM DESENVOLVIMENTO

O cérebro de ratos em desenvolvimento utiliza como fonte energética fundamentalmente glicose e corpos cetônicos. Aos 18 dias de vida estes dois nutrientes são utilizados em iguais proporções pelo tecido cerebral (Cremer e Heath, 1974). Além destes compostos, o cérebro é capaz de oxidar glicerol, piruvato, lactato e glutamina para produção de energia ou como precursores de componentes estruturais e de neurotransmissores, embora contribuindo significativamente menos quando comparados com a glicose e os corpos cetônicos (Cremer, 1981; Hertz et al., 1983).

No período de amamentação, até aproximadamente 25 dias de vida do rato, apesar de haver glicose disponível em concentração considerável no sangue (6mM), o cérebro deste animal possui uma capacidade limitada para utilizá-la, tanto aeróbica quanto anaerobicamente (Booth et al., 1980). O leite materno possui uma alta concentração de lipídios (12,3% de lipídios, 9,2% de proteínas e 3% de glicídios), que ao serem degradados produzem altos níveis de corpos cetônicos no sangue dos ratos (Dymza et al., 1964). Com isto os corpos cetônicos tornam-se disponíveis como combustível energético para o cérebro que passa a utilizá-los para manter seu metabolismo oxidativo.

A glicose e os corpos cetônicos necessitam atravessar a barreira hematoencefálica para atingir o cérebro. A glicose utiliza para isso o sistema de carreadores de hexoses

(Oldendorf, 1980). O transporte é passivo e funciona em ambas as direções, ou seja, para dentro e para fora do órgão, e é independente de sódio. Já o beta-hidroxibutirato e o acetoacetato atravessam a barreira pelo sistema de carreadores de ácidos monocarboxílicos, utilizado também por outros ácidos como o láctico, pirúvico, acético, butírico e propiônico (Oldendorf, 1980).

Uma vez dentro do cérebro, estes nutrientes necessitam ser oxidados para a produção de energia. As atividades das enzimas de oxidação da glicose e dos corpos cetônicos variam de acordo com a idade do rato e não obedecem ao mesmo padrão de desenvolvimento.

Considerando a glicólise, pode-se observar que as suas principais enzimas vão aumentando de atividade durante o período de amamentação do rato. A hexoquinase aos 5 dias de vida possui uma atividade de 40% quando comparada com a fase adulta, sendo que a partir dos 15 dias de vida ocorre um aumento de 3 vezes na atividade da forma mitocondrial e um menor aumento na forma citosólica até atingir os valores da idade adulta, o que ocorre ao redor de 30 dias de vida (MacDonnell e Greengard, 1974; Booth et al., 1980; Leong e Clark, 1984a). A piruvatoquinase possui um desenvolvimento semelhante. Aos 15 dias de vida do rato sua atividade equivale ao dobro da atividade ao nascer e a 50% da atividade na idade adulta (MacDonnell e Greengard, 1974).

Assim como estas enzimas, a atividade da aldolase e da lactato desidrogenase aumenta linearmente até 30 e 25 dias de vida, respectivamente, quando atingem os valores de



animais adultos (MacDonnell e Greengard, 1974; Land et al., 1977; Booth et al., 1980; Leong e Clark, 1984a).

Outra enzima importante de degradação da glicose, a piruvato desidrogenase, também segue um padrão similar de desenvolvimento. No primeiro dia de vida do rato sua atividade não é detectável. A partir daí, ela aumenta linearmente até atingir seu valor máximo ao redor dos 30 dias de vida (Land et al., 1977; Booth et al., 1980).

Este padrão de desenvolvimento observado pelas enzimas de oxidação da glicose até acetil-CoA também é verificado pelas enzimas do Ciclo de Krebs, como a isocitrato desidrogenase que atinge seu pico de atividade aos 40 dias de vida pós-natal, sendo que aos 15 dias de vida sua atividade é equivalente a 50% da atividade máxima (Leong e Clark, 1984b), a fumarase, que possui um desenvolvimento linear até atingir sua atividade máxima aos 30 dias de vida do animal (Leong e Clark, 1984b) e a citrato sintase que desenvolve-se linearmente até aproximadamente 20 dias de vida permanecendo com a mesma atividade até a idade adulta (Land et al., 1977; Booth et al., 1980).

A glicose-6-fosfato desidrogenase permanece com a mesma atividade desde o nascimento até a idade adulta do rato (Leong e Clark, 1984a).

Segundo Booth et al. (1980), o período de maior atividade das enzimas glicolíticas no cérebro do rato está associado com o completo desenvolvimento das funções neurológicas cerebrais.

Enquanto a atividade das enzimas de degradação da glicose, durante o período de amamentação do rato, está diminuída em relação ao adulto, o contrário ocorre com as enzimas de oxidação dos corpos cetônicos.

A beta-hidroxibutirato desidrogenase, responsável pela conversão de beta-hidroxibutirato em acetoacetato no cérebro, aumenta sua atividade linearmente dos 5 aos 25 dias de vida, quando ocorre um declínio, também linear, até a idade adulta em que os valores permanecem os mesmos de um rato aos 5 dias de vida (Page et al., 1971; Leong e Clark, 1984b; Patel e Clark, 1978; Booth et al., 1980; Escrivá et al., 1985). Outras duas enzimas, a 3-oxoacido-CoA transferase e a acetoacetil-CoA tiolase, também obedecem a um padrão semelhante de desenvolvimento: a primeira aumenta 5 vezes sua atividade dos 5 aos 25 dias de vida declinando a 60% do valor máximo no adulto e a segunda aumenta 3 vezes durante este período e chega a 37% da atividade máxima na idade adulta (Page et al., 1971; Patel e Clark, 1978; Booth et al., 1980; Escrivá et al., 1985).

A alta atividade das enzimas de oxidação de corpos cetônicos, durante o período de amamentação, representa uma adaptação ao estado hipercetonêmico no qual o animal se encontra e que é aumentado também pela alta atividade cetogênica do fígado nesta fase (Booth et al., 1980).

Além da glicose e dos corpos cetônicos, existe um outro nutriente energético importante nas primeiras horas de vida do rato. Este composto é o lactato que está presente em grandes quantidades no plasma fetal durante a última fase da

gestação e é removido rapidamente nas primeiras horas após o nascimento (Vannucci et al., 1980).

A partir do nascimento até as duas primeiras horas de vida pós-natal, o rato passa por um período de hipoglicemia como consequência da baixa taxa de produção de glicose (Guezva et al., 1980; Fernandez et al., 1983). Durante esse período o nível de glicose não é suficiente para manter o suprimento energético do cérebro. Além disso, como o rato quase não possui tecido adiposo ao nascer (Jones, 1982), a cetogênese somente ocorrerá quando os ácidos graxos não esterificados do leite materno estiverem disponíveis. A baixa concentração de corpos cetônicos observada durante o período de pré-amamentação é consequência, portanto, da falta de precursores cetogênicos e não de um aumento na utilização destes corpos cetônicos. Consequentemente, durante este período, são oferecidas ao cérebro outras substâncias que não os corpos cetônicos como fonte de energia. O substrato energético alternativo disponível durante esta fase de pré-amamentação é o lactato. Em 1973, Snell e Walker, sugeriram que, como um excelente substrato gliconeogênico, ele era metabolizado através da rota gliconeogênica. Entretanto, Guezva et al. (1980) demonstraram que a gliconeogênese a partir do lactato é insignificante nas primeiras duas horas após o nascimento, período no qual o lactato é quase que completamente removido do plasma. Esta hipótese foi confirmada pelos experimentos de Medina et al. (1980) que administraram lactato radioativo a ratos recém nascidos e

observaram que este foi principalmente convertido no plasma em  $\text{CO}_2$ , indicando que o lactato plasmático é consumido através de sua oxidação no Ciclo de Krebs.

As altas taxas de oxidação do lactato durante as primeiras horas após o nascimento mostram seu papel importante na homeostase da energia do cérebro neonatal durante o período de pré-amamentação. Além disso, ele pode contribuir como fonte de carbonos para a síntese de lipídios (Arizmendi e Medina, 1983; Fernandez e Medina, 1986).

Além de oxidar a glicose e os corpos cetônicos para produção de energia, o cérebro os utiliza para síntese de lipídios que formarão a mielina, membranas celulares (Cotman e Peterson, 1989) e neurotransmissores. Segundo Winick (1970), a síntese de mielina no cérebro do rato está mais acelerada entre o 10<sup>o</sup> e o 21<sup>o</sup> dia de idade e após este período ocorre um declínio até atingir os níveis do cérebro adulto. Todo este processo de mielinização é acompanhado por uma rápida síntese de lipídios (Dobbing, 1966) e é de grande importância para o desenvolvimento funcional do sistema nervoso central do rato (Sobotka et al., 1974).

## 1.6. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito do MMA e do PA sobre o cérebro de ratos de 15 dias de vida pós-natal, em jejum de 24 a 30 horas, nos seguintes parâmetros metabólicos:

1. Utilização de glicose.
2. Glicólise anaeróbica e aeróbica.
3. Síntese de lipídios a partir de glicose ou acetato.
4. Utilização de acetoacetato e beta-hidroxibutirato.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

### II.1. MATERIAL

#### II.1.1. Reagentes (todos P.A. ou superior)

<sup>14</sup>  
[U- C]acetato - atividade específica 55,1mCi/ml - Amersham

Acetato de sódio - Riedel

Ácido acetoacético - sal de lítio 90-95% - Sigma

DL-Ácido beta-hidroxibutírico - sal de sódio 98% - Sigma

Ácido etilenodiamino tetracético - sal de potássio - Merck

Ácido láctico - Solução padrão - Sigma

Ácido metilmalônico - Sigma

Ácido perclórico - 69-72% - Baker

Ácido propiônico - sal de sódio 99% - Sigma

Ácido succínico - P.A. - Merck

Ácido tricloroacético - Sigma

Adenosina 5'-difosfato - de músculo equino, sal de sódio, grade IX - Sigma

Adenosina 5'-trifosfato - de músculo equino, sal dissódico, grade - Sigma

Aldolase - de músculo de coelho, tipo X - Sigma

Alfa-glicerofosfato desidrogenase / Triose fosfato desidrogenase - de músculo de coelho, tipo X, 100 U/ml - Sigma

Beta-hidroxibutirato desidrogenase - de Rhodopseudomonas spheroides, tipo V, 25 U/ml - Sigma

Bicarbonato de sódio - Riedel

1,4-bis[5-fenil-2-oxazol] benzeno - Sigma

Carbonato de sódio - Merck

Cianeto de potássio - Merck  
 Cloreto de cálcio bi-hidratado - Riedel  
 Cloreto de magnésio - Reagen  
 Cloreto de potássio - Merck  
 Cloreto de sódio - Merck  
 Clorofórmio - Merck  
 2,6-Diclorofenolindofenol - Sigma  
 2,5-Difeniloxazol - Koch-light  
 1,4-Ditiotreitol - Sigma  
 Fenazina metassulfato - Sigma  
 Fosfato de potássio bibásico - Merck  
 Fosfato de potássio monobásico - Baker  
 Fosfoenolpiruvato - trissódio hidratado - Sigma  
 Frutose-6-fosfato - sal dissódico, grade I - Sigma  
 Glicina - Sigma  
 Glicose anidra - Merck  
<sup>14</sup>  
 [2- C]glicose - atividade específica 55mCi/ml -  
 American Radiolabeled Chemicals Inc.  
 Glicose-6-fosfato - sal monossódico - Sigma  
 Glicose-6-fosfato desidrogenase - de fungo Bakers, tipo  
 V, 250 U/ml - Sigma  
 Hidrato de hidrazina - Sigma  
 Hidróxido de hiamina - Sigma  
 Hidróxido de potássio - Merck  
 Indicador universal de pH líquido - Merck  
 Kit de dosagem de glicose - SeraPak - Ames  
 Lactato desidrogenase - de músculo cardíaco, 1000 U/ml -  
 Sigma  
 Metanol - Merck

Mistura carbogênica - 95% O<sub>2</sub> : 5% CO<sub>2</sub> - White Martins

Nicotinamida adenina dinucleotídio (forma oxidada) - de fungo grade III - Sigma

Nicotinamida adenina dinucleotídio (forma reduzida) - sal dissódico de fungo 98% grade III - Sigma

Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (forma oxidada) - de fungo beta-NAD, sal monossódico, grade - Sigma

Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (forma reduzida) - sal tetrassódico, tipo I - Sigma

Nitrogênio líquido - Semeia

Rotenona - Sigma

Sacarose - P.A. Merck

Sulfato de hidrazina - Sigma

Sulfato de magnésio - Reagen

Tolueno - Merck

Trietanolamina-Cl - Boehringer-Mannheim

Triton X-100 - Sigma

Trizma<sup>R</sup> base - Sigma

#### 11.1.2. Soluções

Líquido de cintilação:

- 2,5-Difeniloxazol 22,6mM
- 1,4-bis [5-fenil-2-oxazol] benzeno 0,137mM
- Tolueno 1L

Líquido de homogeneização:

- Sacarose 0,32M
- Ácido etilenodiamino tetracético 0,5mM
- Dissolvidos em tampão Tris 10mM, pH 7,4



**Solução salina-sacarose, pH 7,2:**

- Sacarose 400mM
- Fosfato de potássio monobásico 270mM
- Cloreto de magnésio 5mM
- Glicose 20mM
- Dissolvidos em NaCl 0,9%
- O pH foi acertado com NaOH 10N

**Tampão Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,0:**

- Bicarbonato de sódio 0,65M
- Fosfato de potássio monobásico 0,031M
- Cloreto de potássio 0,12M
- Cloreto de sódio 3,08M
- Sulfato de magnésio 0,031M
- Cloreto de cálcio 0,065M
- Dissolvidos em água destilada
- O pH foi acertado com NaOH 10N

**Tampão Krebs-Ringer III, pH 7,0:**

- Cloreto de sódio 0,154M
- Cloreto de potássio 0,154M
- Fosfato de potássio monobásico 0,155M
- Sulfato de magnésio 0,154M
- Carbonato de sódio 0,123M
- Cloreto de cálcio 0,083M
- Dissolvidos em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0
- O pH foi acertado com NaOH 10N

#### 11.1.3. Equipamentos

- Agitador de tubos Phoenix modelo AT 56A
- Balança analítica Sartorius
- Banho-maria marca Biomatic tipo 1052
- Banho-maria metabólico tipo Dubinoff marca Fanem, modelo 145
- Calculadora programável Hewlett-Packard modelo 11C
- Centrífuga marca Excelsa modelo 205N
- Centrífuga refrigerada marca Sorvall modelo RC2-B
- Cintilador LKB Wallac modelo 1209 rackbeta
- Espectrofotômetro marca Incibrás MF 200 UV-VIS
- Homogeneizador Medingen tipo LR10
- Microcomputador modelo SP16 II marca Prológica
- Microfatilador de McIlwain

#### 11.1.4. Amostra

Foram usados ratos Wistar de ambos os sexos. As ratas grávidas foram colocadas em gaiolas separadas e por ocasião do nascimento, foram deixados oito filhotes com a mãe.

Os ratos foram alimentados com dieta Germani (tabela 11.1) e água "ad libitum" e mantidos em ambiente climatizado (22 C) com 12 horas de intervalo de luminosidade claro/escuro.

Ratos de 15 dias de vida foram utilizados para os experimentos. Vinte e quatro a 30 horas antes do sacrifício os animais foram separados da mãe e mantidos em jejum em uma gaiola separada. A utilização de ratos em jejum para os experimentos deveu-se ao fato de que as crianças afetadas

por metilmalonicacidemia e não tratadas, além de apresentarem altas concentrações dos metabólitos que se acumulam nos seus tecidos, não se alimentam adequadamente. Procurou-se, portanto, ao se trabalhar com ratos em jejum, mimetizar a situação humana com todas as implicações metabólicas do jejum.

TABELA II.1  
COMPOSIÇÃO DA DIETA GERMANI

|                   |            |                  |          |
|-------------------|------------|------------------|----------|
| Proteínas         | 20,5%      | Ácido nicotínico | 2mg/Kg   |
| Carboidratos      | 54%        | Colina           | 300mg/Kg |
| Fibras            | 4,5%       | Sódio            | 5g/Kg    |
| Lipídios          | 4%         | Cálcio           | 20g/Kg   |
| Cinzas            | 7%         | Ferro            | 20mg/Kg  |
| Água              | 10%        | Manganês         | 81mg/Kg  |
| Retinol           | 8000 UI/Kg | Zinco            | 48mg/Kg  |
| Cloranfenicol     | 1489 UI/Kg | Cobre            | 2mg/Kg   |
| Menadione         | 2mg/Kg     | Cobalto          | 0,2mg/Kg |
| Alfa-tocoferol    | 5 UI/Kg    | Iodo             | 2mg/Kg   |
| Piridoxina        | 2mg/Kg     | Fósforo          | 6g/Kg    |
| Cianocobalamina   | 10mg/Kg    | Antioxidante     | 100mg/Kg |
| Riboflavina       | 3,3mg/Kg   | Histidina        | 6,1g/Kg  |
| Ácido pantotênico | 10mg/Kg    | Metionina        | 700mg/Kg |

## 11.2. PROCEDIMENTOS

Os animais foram utilizados para dois tipos de experimentos. No primeiro, MMA ou PA tamponados foram adicionados ao meio de incubação que continha o tecido a ser analisado, cérebro ou fígado (tratamento *in vitro*). No segundo, o ácido metilmalônico tamponado foi administrado por via subcutânea e seu efeito verificado após o sacrifício dos animais, de modo que no meio de incubação que continha o tecido (cérebro ou fígado) não foi adicionado qualquer metabólito (tratamento *in vivo*).

### 11.2.1. Administração de ácido metilmalônico tamponado (tratamento *in vivo*)

Antes de serem sacrificados, metade dos animais de cada caixa, escolhidos randomicamente, foram injetados subcutaneamente com NaCl 0,85% (grupo controle) ou com solução de ácido metilmalônico tamponado, pH 7,2-7,4 a 1,5% (Dutra et al., 1991). Três injeções foram aplicadas com um intervalo de 90 minutos entre cada uma. A primeira dose foi de 0,7ml/100g de peso corporal e as duas subsequentes corresponderam à metade da primeira. Estas doses de MMA permitiram, segundo Dutra et al. (1991), que a droga atingisse os níveis plasmáticos encontrados na metilmalonicacidemia humana. Noventa minutos após a última injeção os animais foram decapitados sem anestesia e seus cérebros e/ou fígados retirados e preparados conforme a técnica a ser utilizada.

Em alguns experimentos o sangue dos animais foi coletado e transferido para tubos de centrífuga contendo solução de ácido perclórico 10% para posterior dosagem de beta-hidroxibutirato.

#### 11.2.2. Preparação do cérebro e fígado

Após a decapitação dos animais, o cérebro foi removido e imediatamente transferido a uma placa de vidro sobre gelo. Os bulbos olfatórios, ponte, medula e cerebelo foram descartados. O resto do cérebro, que, a partir daqui será chamado de cérebro, foi então processado conforme o tipo de técnica a ser utilizada. Para os estudos de captação de glicose e corpos cetônicos ou produção de lactato, o cérebro foi cortado em duas direções em prismas de 40um de tamanho, aproximadamente, com o auxílio de um microfatizador (chopper de McIlwain) e então pesados diretamente em copos de Becker contendo tampão Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,0 (item 11.1.2, pg 30). Para as dosagens enzimáticas os cérebros foram homogeneizados em líquido de homogeneização (item 11.1.2 pg 29) na proporção de 1g de tecido para 10ml do líquido.

O fígado foi retirado e imediatamente transferido para uma placa de vidro sobre gelo. O órgão foi pesado e homogeneizado em líquido de homogeneização (item 11.1.2 pg 29) na proporção de 1g de tecido para 10ml de líquido.

### 11.2.3. Captação de glicose in vitro por prismas de cérebro

#### 11.2.3.1. Efeito do MMA e PA adicionados in vitro

Prismas de cérebro pesando 100mg foram transferidos para beckers de 5ml contendo 1ml de tampão Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,0 (item 11.1.2 pg 30) contendo glicose 5mM.

MMA e PA tamponados foram adicionados aos copos de Becker até a concentração final de 1, 2,5 ou 5mM para MMA e 2, 5 ou 10mM para PA. Os controles não continham MMA ou PA no meio de incubação. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Os prismas de cérebro foram incubados à 37°C em banho metabólico com agitação (30 agitações por minuto) em atmosfera de carbogênio (5% CO<sub>2</sub> :95% O<sub>2</sub>) por uma hora. Após a incubação, foi retirada uma alíquota de 20µl do meio de incubação para dosagem de glicose pelo método da glicose oxidase (Trinder, 1969) utilizando o kit de dosagem de glicose da Ames.

A captação de glicose pelo cérebro foi determinada a partir de uma curva padrão de glicose, subtraindo a quantidade encontrada após a incubação da quantidade total medida antes da incubação. Os resultados foram expressos como umol de glicose captada por hora por grama de cérebro.

#### 11.2.3.2. Efeito da administração in vivo de MMA

Prismas de cérebro de ratos administrados com solução de MMA ou solução salina (controles) foram transferidos para beckres com tampão Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,0 (item 11.1.2 pg 30) contendo glicose 5mM, na prporção de 100mg de tecido para 1ml de tampão.

O procedimento para captação de glicose pelos prismas de cérebro e para posterior dosagem de glicose no meio de incubação, foi realizado conforme o item 11.2.3.1.

#### 11.2.4. Captação de corpos cetônicos in vitro por prismas de cérebro

##### 11.2.4.1. Captação de acetoacetato in vitro por prismas de cérebro

Prismas de cérebro (100mg) foram incubados em 1ml de tampão Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,0 (item 11.1.2. pg 30) contendo acetoacetato 5mM por 1 hora em banho metabólico com agitação (30 agitações por minuto) em atmosfera de carbogênio.

MMA e PA tamponados foram adicionados ao meio de incubação até as mesmas concentrações finais citadas no ítem 11.2.3. Os controles continham somente acetoacetato no meio de incubação.

Uma alíquota de 300ul foi retirada ao final da incubação e adicionada ao mesmo volume de ácido perclórico 10%. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, foi adicionado ao sobrenadante KOH 20% até que a solução

atingisse pH 7,0 (verificado pela mudança de cor ocorrida na solução, à qual tinham sido previamente adicionados 5ul de indicador universal de pH). O perclorato de potássio formado por adição de KOH 20% ao meio foi precipitado a -20°C por 5 minutos. O sobrenadante límpido foi utilizado para a dosagem de acetoacetato pelo método de Mellanby e Williamson (1974) através da formação de NAD detectada a 340nm a partir do consumo de NADH 2mM e beta-hidroxibutirato desidrogenase adicionados ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,8.

O acetoacetato foi determinado no início e no final da incubação e a quantidade de acetoacetato captada pelo cérebro foi calculada por subtração da quantidade final da inicial medida a partir de uma curva padrão de acetoacetato. Os resultados foram expressos como umol de acetoacetato captado por hora por grama de tecido.

#### 11.2.4.2. Captação de beta-hidroxibutirato in vitro por prismas de cérebro

##### 11.2.4.2.1. Efeito do MMA e PA adicionados in vitro

Prismas de cérebro (100mg) foram incubados em 1ml de tampão Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,0 (item 11.1.2. pg 30) contendo beta-hidroxibutirato 2mM por uma hora em banho metabólico com agitação (30 agitações por minuto) em atmosfera de carbogênio.



MMA e PA tamponados foram adicionados ao meio de incubação nas mesmas doses citadas no ítem 11.2.3. Os controles não continham MMA ou PA no meio de incubação.

Uma alíquota de 300ul foi retirada ao final da incubação, desproteïnizada com ácido perclórico e neutralizada com KOH. O sobrenadante límpido foi utilizado para a dosagem de beta-hidroxibutirato pelo método de Willianson e Mellanby (1974) através da formação de NADH detectada a 340nm a partir de NAD 14mM e beta-hidroxibutirato desidrogenase adicionados ao meio de incubação contendo tampão hidrazina 0,1M, pH 8,5.

O beta-hidroxibutirato foi medido no início e no final da incubação e a quantidade de beta-hidroxibutirato captada pelo cérebro foi determinada por subtração da quantidade final da inicial dosada a partir de uma curva padrão de beta-hidroxibutirato. Os resultados foram expressos como umol de beta-hidroxibutirato captado por hora por grama de tecido.

#### 11.2.4.2.2. Efeito da administração in vivo de MMA

Prismas de cérebro (100mg) de ratos administrados com solução de MMA ou solução salina (controles) foram incubados em 1ml de tampão Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,0 (ítem 11.1.2. pg 30) contendo beta-hidroxibutirato 2mM, por 1 hora em banho metabólico com agitação (30 agitações por minuto) em atmosfera de carbogênio.

O procedimento para dosagem do beta-hidroxibutirato no meio de incubação foi realizado conforme o ítem 11.2.4.2.1.

#### 11.2.5. Produção de lactato *in vitro* a partir de glicose por prismas de cérebro de ratos

##### 11.2.5.1. Efeito do MMA e PA adicionados *in vitro*

Prismas de cérebro (100mg) foram incubados em 1ml de tampão Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,0 (item 11.1.2. pg 30) contendo glicose 5mM conforme procedimento descrito no item 11.2.3.

MMA e PA tamponados foram adicionados ao meio de incubação nas mesmas doses citadas no item 11.2.3. Os controles não continham MMA ou PA no meio de incubação.

Após a incubação, foi adicionado ácido perclórico 0,6N ao meio de incubação na proporção de 2ml de ácido perclórico para 1ml de meio de incubação (concentração final de perclorato = 0,4N). A mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. O lactato foi dosado no sobrenadante segundo Gutmann et al. (1974) através da formação de NADH detectada a 340nm a partir de NAD 27 mM e lactato desidrogenase adicionados ao meio de incubação contendo tampão hidrazina 0,5M - glicina 0,4M, pH 9,0.

A quantidade de lactato formada pelo cérebro foi determinada subtraindo-se a concentração de lactato produzida ao final da incubação daquela existente no início da mesma e expressa em  $\mu\text{mol}$  de lactato produzido por hora por grama de cérebro.

Para o cálculo das concentrações de lactato foi utilizada uma curva padrão de lactato.

#### 11.2.5.2. Efeito da administração in vivo de MMA

Prismas de cérebro (100mg) de ratos administrados com solução de MMA ou solução salina (controles) foram incubados em 1ml de tampão Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,0 (item 11.1.2. pg 30) contendo glicose 5mM, conforme descrito no item 11.2.3.

O procedimento para dosagem do lactato produzido a partir de glicose adicionada ao meio de incubação foi realizado conforme o item 11.2.5.1.

#### 11.2.6. Medida de atividades enzimáticas

##### 11.2.6.1. Medida da atividade da hexoquinase

A atividade da hexoquinase foi dosada em homogeneizados de cérebro de ratos conforme o método descrito por Leong e Clark (1984).

A 0,5ml de meio de incubação contendo triton X-100 0,1% (v/v), tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5, glicose 6mM, ditiotreitól 1mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NADP<sup>+</sup> 0,5mM, glicose-6-fosfato desidrogenase 1,4 U, ATP 8mM, foram adicionados 25ul de homogeneizado de cérebro diluído 5 vezes com tampão Tris-HCl 0,5M pH 7,5 (40ug de proteína). A figura 11.1 mostra que entre 15 e 60ug de proteína, a velocidade da reação é proporcional à quantidade de material utilizado.

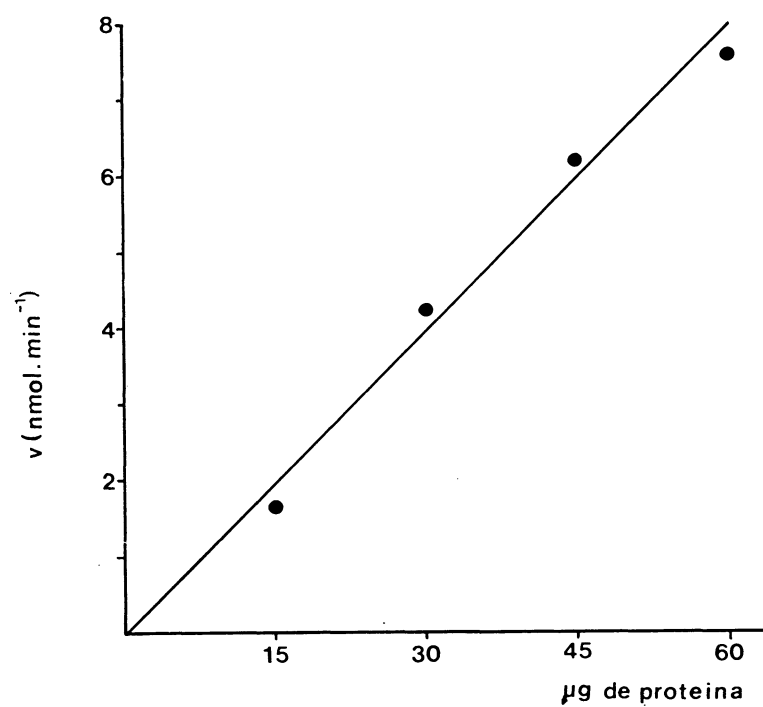


FIGURA 11.1 - ATIVIDADE DA HEXOQUINASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO NO ITEM 11.2.6.1. PG 40

MMA e PA tamponados foram adicionados ao meio de incubação nas concentrações de 1, 2,5 e 5mM para MMA e 2, 5 e 10mM para PA. Os tubos controles não continham MMA ou PA. A reação foi realizada a 25 °C.

A formação de NADPH a partir de NADP<sup>+</sup> foi detectada à 340nm. As leituras foram lineares pelo menos até 10 minutos após ser adicionado o homogeneizado (figura 11.2), quando o meio de incubação continha 40µg de proteína.

A atividade enzimática foi expressa como  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tecido e calculada a partir de uma curva padrão de NADPH. Para realização da mesma, concentrações conhecidas de NADPH (47,9; 95,8; 143,7  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ), foram adicionadas ao meio de incubação da reação e suas extinções medidas a 340nm.

Todos os experimentos foram realizados até 8 horas após o sacrifício dos animais.

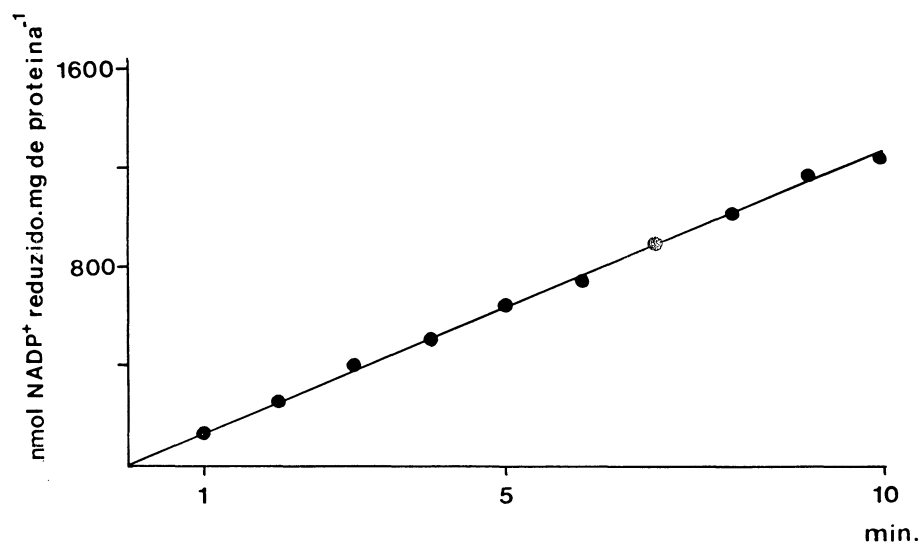


FIGURA 11.2 - LINEARIDADE DA REAÇÃO CATALIZADA PELA HEXOQUINASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, EM FUNÇÃO DO TEMPO. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO NO ITEM 11.2.6.1. PG 40

#### 11.2.6.2. Medida da atividade da fosfofrutoquinase

A atividade da fosfofrutoquinase foi dosada em homogeneizados de cérebro de ratos conforme o método descrito por Leong et al. (1981).

A 0,5ml de meio de incubação contendo Triton X-100 0,1% (v/v), tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0, ditioneitol 1mM,  $MgCl_2$  5mM, KCl 50mM, NADH 0,2mM, ATP 2mM, alfa-glicerofosfato desidrogenase 1U, triose fosfato isomerase 6,7U, aldolase 1U e frutose-6-fosfato 2mM, foram adicionados 25ul de homogeneizado de cérebro diluído 20 vezes em tampão fosfato de potássio 0,05M a pH 8,0 (12ug de proteína). A figura 11.3 mostra que entre 5 e 20ul de proteína a velocidade da reação é proporcional à quantidade de material utilizado.

MMA e PA tamponados foram adicionados ao meio de incubação nas concentrações de 1, 2,5 e 5mM para MMA e 2, 5 e 10mM para PA. Os tubos controles não continham MMA ou PA. A reação foi realizada a 25 °C.

A oxidação do NADH foi detectada a 340nm. As leituras foram lineares pelo menos até 10 minutos após ser adicionado o homogeneizado (figura 11.4) quando o meio de incubação continha 12ug de proteína.

A atividade enzimática foi expressa como  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tecido e calculada a partir de uma curva padrão de NADH. Para realização da mesma, concentrações conhecidas de NADH (58,7; 117,5; 176,2  $\mu\text{mol/ml}$ ) foram adicionadas ao meio de incubação da reação e suas extinções observadas a 340nm.

Todos os experimentos foram realizados até 8 horas após o sacrifício dos animais.

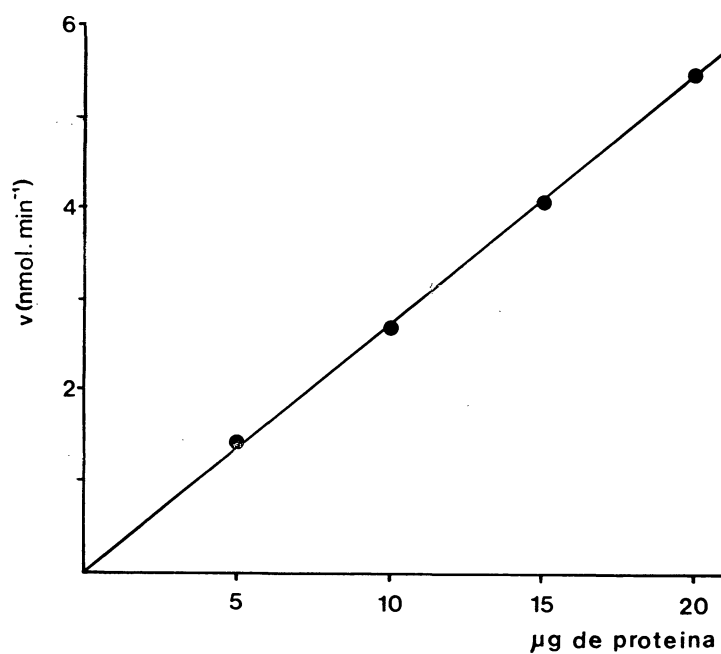


FIGURA 11.3 - ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOQUINASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO NO ITEM 11.2.6.2. PG 44



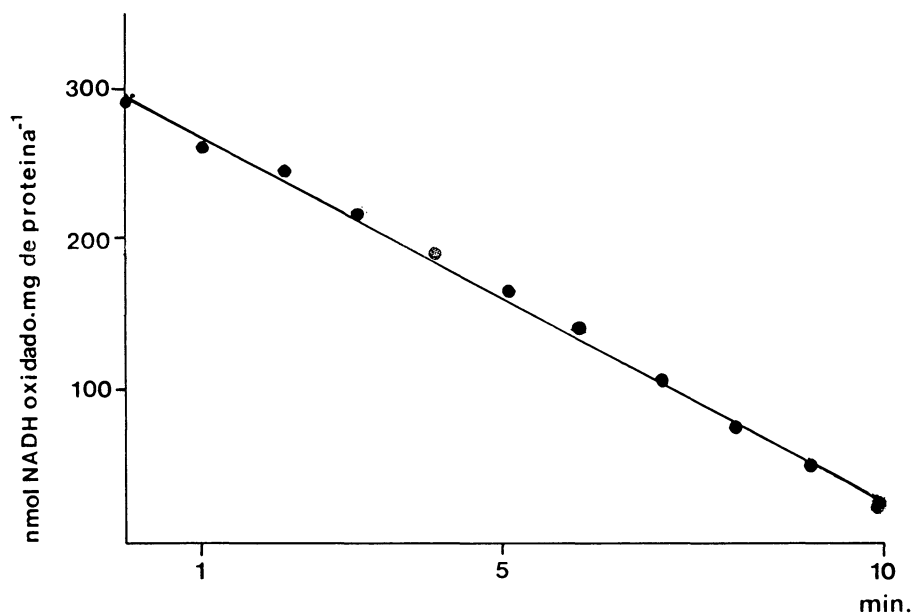


FIGURA 11.4 - LINEARIDADE DA REAÇÃO CATALIZADA PELA FOSFOFRUTOQUINASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, EM FUNÇÃO DO TEMPO. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO NO ITEM 11.2.6.2. PG 44

#### 11.2.6.3. Medida da atividade da piruvatoquinase

A atividade da piruvatoquinase foi dosada em homogeneizados de cérebro de ratos conforme o método descrito por Leong et al. (1981).

A 0,5ml de meio de incubação contendo Triton X-100 0,1% (v/v), tampão Trietanolamina-Cl 100mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10mM, KCl 75mM, fosfoenolpiruvato 1mM, NADH 0,2mM, lactato desidrogenase 13,75U e ADP 5mM, foram adicionados 25ul de homogeneizado de cérebro diluído 10 vezes com líquido de homogeneização (item 11.1.2. pg 29), 25ug de proteína. A figura 11.5 mostra que entre 10 e 40ug de proteína a velocidade da reação é proporcional à quantidade de material utilizado.

MMA e PA tamponados foram adicionados ao meio de incubação nas concentrações de 1, 2,5 e 5mM para MMA e 2, 5 e 10mM para PA. Os controles não continham MMA ou PA. A reação foi realizada a 25 °C.

A oxidação do NADH foi detectada a 340nm. As leituras foram lineares pelo menos até 10 minutos após ser adicionado o homogeneizado (figura 11.6) quando o meio de incubação continha 25ug de proteína.

A atividade enzimática foi expressa como  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tecido e calculada a partir de uma curva padrão de NADH, realizada conforme descrito no item 11.2.6.2. pg 44.

Todos os experimentos foram realizados até 8 horas após o sacrifício dos animais.

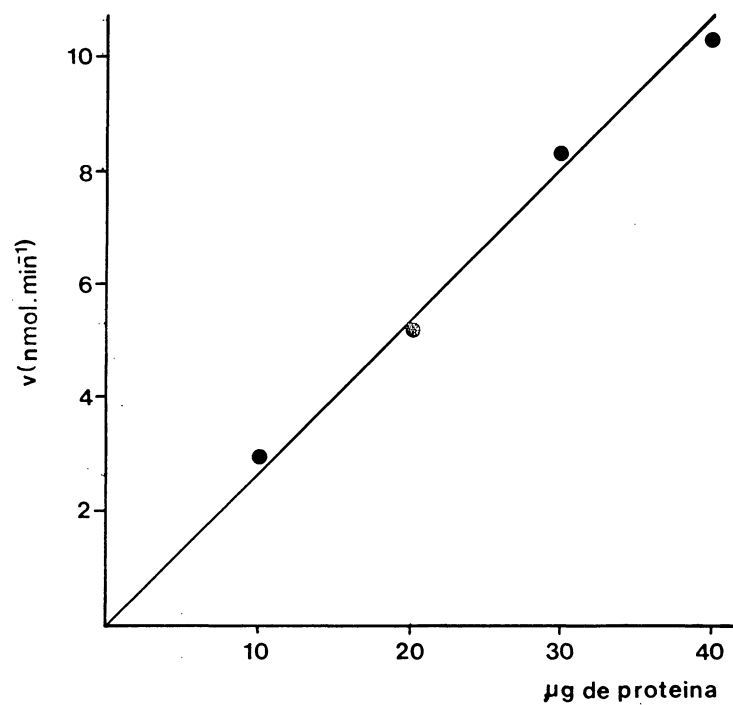


FIGURA 11.5 - ATIVIDADE DA PIRUVATOQUINASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO NO ITEM 11.2.6.3. PG 47

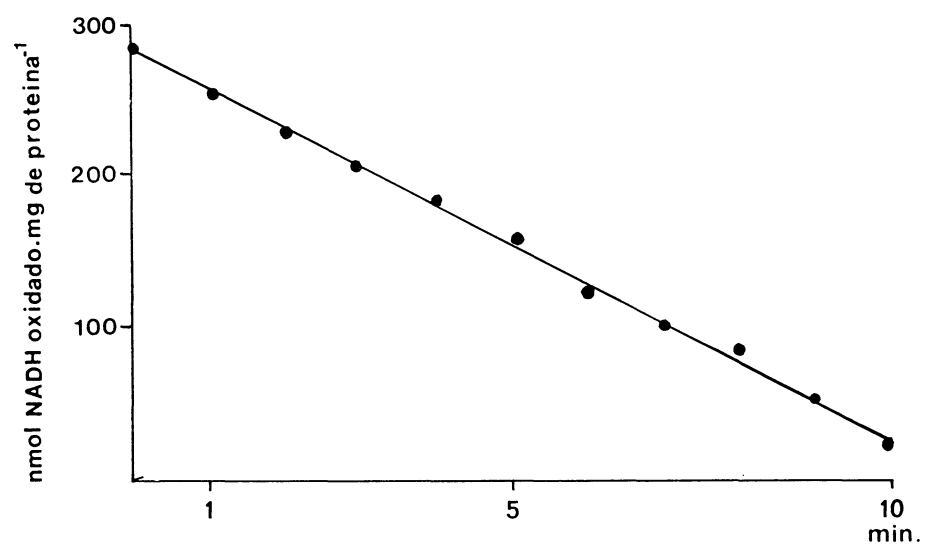


FIGURA 11.6 - LINEARIDADE DA REAÇÃO CATALIZADA PELA PIRUVATOQUINASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, EM FUNÇÃO DO TEMPO. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO NO ITEM 11.2.6.3. PG 47

#### 11.2.6.4. Medida da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase foi dosada em homogeneizados de cérebro de ratos conforme o método descrito por Leong e Clark (1984).

A 0,5ml de meio de incubação contendo Triton X-100 0,1% (v/v), tampão Tris-HCl 100mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NADP<sup>+</sup> 0,5mM, e glicose-6-fosfato 1mM, foram adicionados 25ul de homogeneizado de cérebro (175ug de proteína). A figura 11.7 mostra que entre 70 e 280ug de proteína a velocidade da reação é proporcional à quantidade de material utilizado.

MMA e PA tamponados foram adicionados ao meio de incubação nas concentrações de 1, 2,5 e 5mM para MMA e 2, 5 e 10mM para PA. Os tubos controles não continham nenhum dos metabólitos. A reação foi realizada a 25 °C.

A redução do NADP<sup>+</sup> foi detectada à 340nm. As leituras foram lineares pelo menos até 10 minutos após ser adicionado o homogeneizado (figura 11.8) quando o meio de incubação continha 175ug de proteína.

A atividade enzimática foi expressa como  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tecido e calculada a partir de uma curva padrão de NADPH, realizada conforme descrito no item 11.2.6.1. pg 42.

Todos os experimentos foram realizados até 8 horas após o sacrifício dos animais.

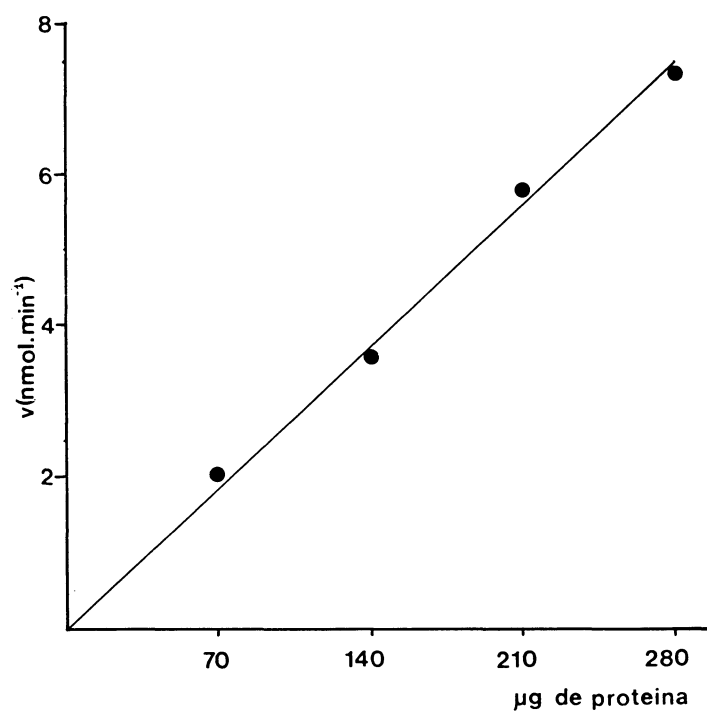


FIGURA 11.7 - ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO NO ITEM 11.2.6.4. PG 50

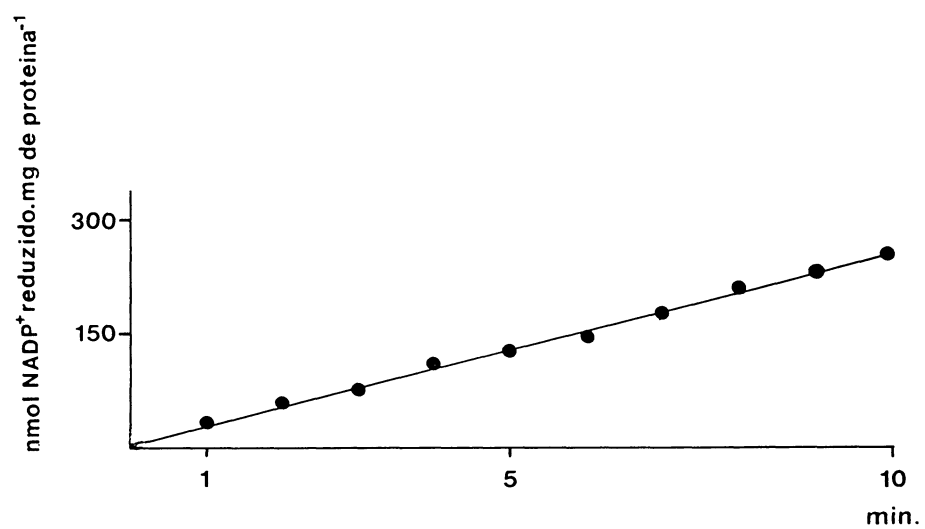


FIGURA 11.8 - LINEARIDADE DA REAÇÃO CATALIZADA PELA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, EM FUNÇÃO DO TEMPO. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO NO ITEM 11.2.6.4. PG 50

#### 11.2.6.5. Medida da atividade da succinato desidrogenase

##### 11.2.6.5.1. Preparação da fração mitocondrial

A fração mitocondrial foi preparada de acordo com Nagy et al. (1986). O cérebro e fígado foram removidos cirurgicamente conforme descrito no item 11.2.3. Os tecidos (cérebro e fígado), após serem homogeneizados com líquido de homogeneização (item 11.1.2. pg 29), foram centrifugados a 1000 g por 4<sup>o</sup> C para precipitação dos núcleos e membranas. Após esta centrifugação inicial, o precipitado foi descartado e o sobrenadante (S1) foi novamente centrifugado a 12000 g por 20 minutos a 4<sup>o</sup> C para precipitação das mitocôndrias. O precipitado desta segunda centrifugação foi então suspenso com solução salina-sacarose, pH 7,2 (item 11.1.2. pg 30) em um volume equivalente a 60% do volume do S1.

##### 11.2.6.5.2. Medida da atividade enzimática

A dosagem da atividade da succinato desidrogenase em cérebro e fígado de ratos foi realizada de acordo com o método de Sorensem e Mahler (1982).

A 0,5ml de meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,5, fenazina metassulfato 0,5mM, KCN 1,5mM e diclorofenolindofenol (DCIP) 50uM, foram adicionados 25ul de fração mitocondrial (60ug de proteína para o cérebro e 35ug de proteína para o fígado). A figura 11.9 mostra que entre 25 e 100ug de proteína de fração mitocondrial de cérebro ou entre 15 e 60ug de proteína de fração mitocondrial de fígado, a velocidade da reação é



proporcional às quantidades de material utilizado. A mistura foi incubada durante 10 minutos, protegida da luz, a 37 °C em banho-maria.

Após o período de incubação, foi adicionado succinato de sódio 40mM pH 7,0 e a redução do DCIP foi acompanhada à 600nm.

MMA ou PA tamponados foram adicionados ao meio de incubação nas concentrações de 2,5, 5, 20 e 40mM para MMA e 5, 20 e 40mM para PA. Os tubos controles não continham MMA ou PA.

Também foi verificado o efeito da administração subcutânea de MMA tamponado aos animais sobre a atividade da succinato desidrogenase. Nesse caso, o meio de incubação não continha MMA ou PA. Solução salina em igual volume foi administrada a ratos controles.

A redução do DCIP foi linear até 10 minutos após a adição do substrato da reação (figura 11.10) quando o meio de incubação continha 60ug de proteína de fração mitocondrial de cérebro ou 35ug de proteína de fração mitocondrial de fígado e calculada de acordo com uma curva padrão de DCIP. Para realização da mesma, foram adicionadas concentrações conhecidas de DCIP (12,5; 25 e 50nmol/ml) ao meio de incubação e suas extinções observadas a 600nm.

A atividade enzimática foi expressa como  $\text{nmol de DCIP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

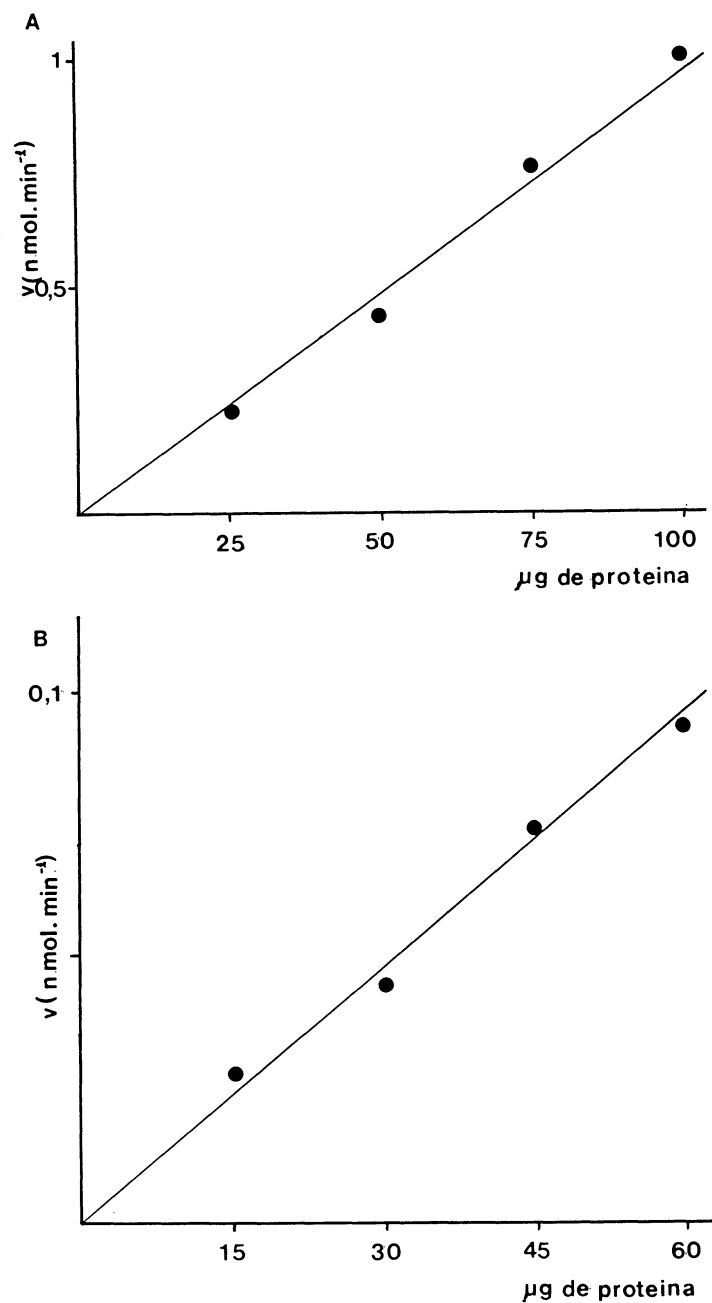


FIGURA 11.9 - ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO (A) E DE FÍGADO (B) DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO NO ITEM 11.2.6.5.2. PG 53

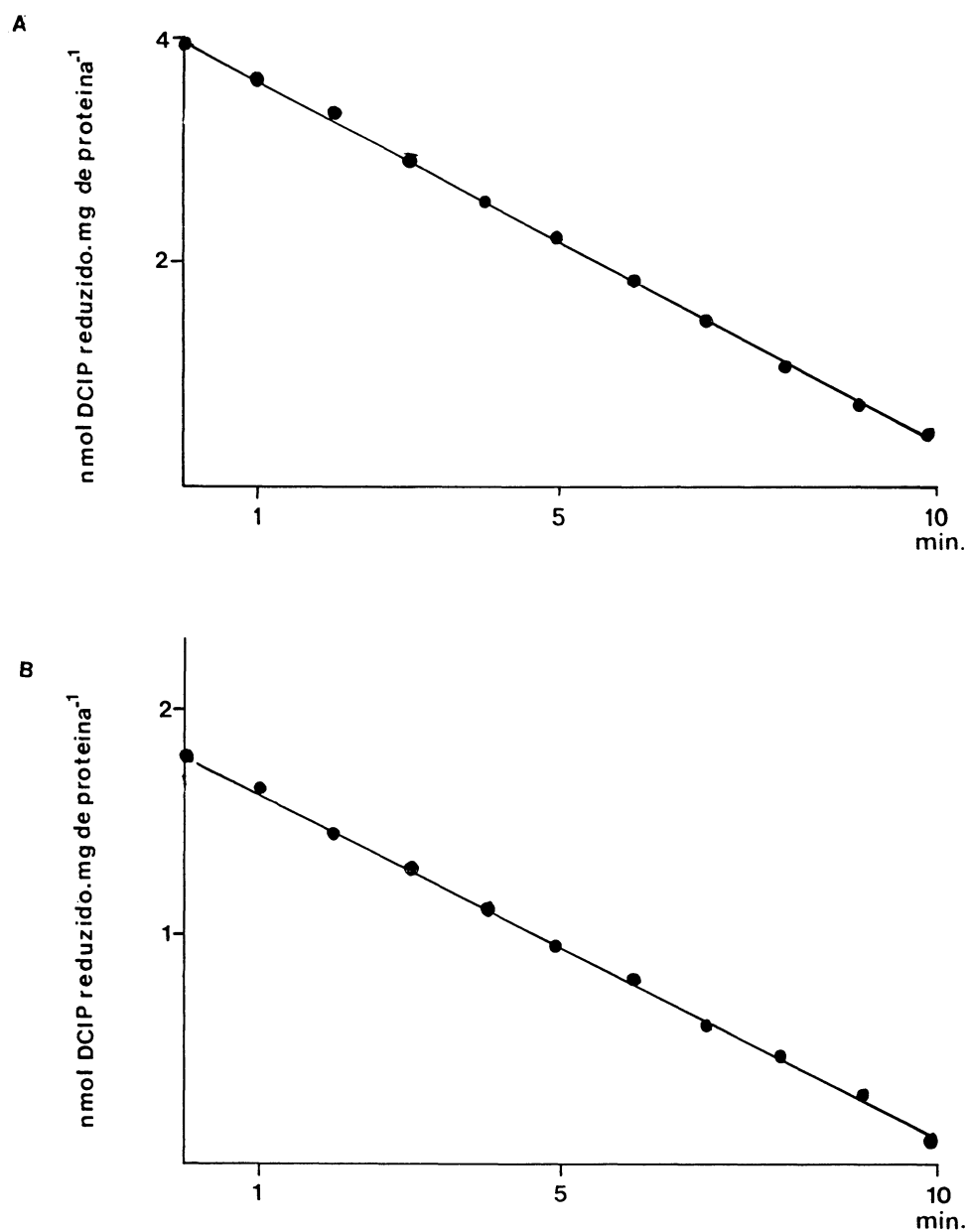


FIGURA 11.10 - LINEARIDADE DA REAÇÃO CATALIZADA PELA SUCINATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO (A) E FÍGADO (B) DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, EM FUNÇÃO DO TEMPO. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO NO ITEM 11.2.6.5.2. PG 53

#### 11.2.6.6. Medida da atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase

##### 11.2.6.6.1. Preparação do material enzimático

O material enzimático foi preparado de acordo com Leong et al. (1981). O cérebro e o fígado, após serem removidos e homogeneizados conforme descritos no item 11.2.2. pg 34, foram submetidos a 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para rompimento das mitocôndrias. O homogeneizado de fígado foi novamente diluído 10 vezes com líquido de homogeneização (item 11.1.2. pg 29), antes de processar-se a análise.

##### 11.2.6.6.2. Medida da atividade enzimática

A dosagem da atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase em cérebro e fígado de ratos foi realizada de acordo com o método de Leong et al. (1981).

A 0,5ml de meio de incubação contendo tampão Tris-HCl 100mM pH 8,5, hidrato de hidrazina 400mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, K<sup>+</sup>-EDTA 5mM, NAD<sup>+</sup> 10mM e rotenona 1uM, foram adicionados 20ul de homogeneizado ( 120ug de proteína de cérebro ou 70ug de proteína de fígado). A figura 11.11 mostra que entre 60 e 240ug de proteína de cérebro ou entre 35 e 140ug de proteína de fígado, a velocidade da reação é proporcional às quantidades de material utilizado. A reação foi iniciada por adição de DL-beta-hidroxibutirato, 20mM.

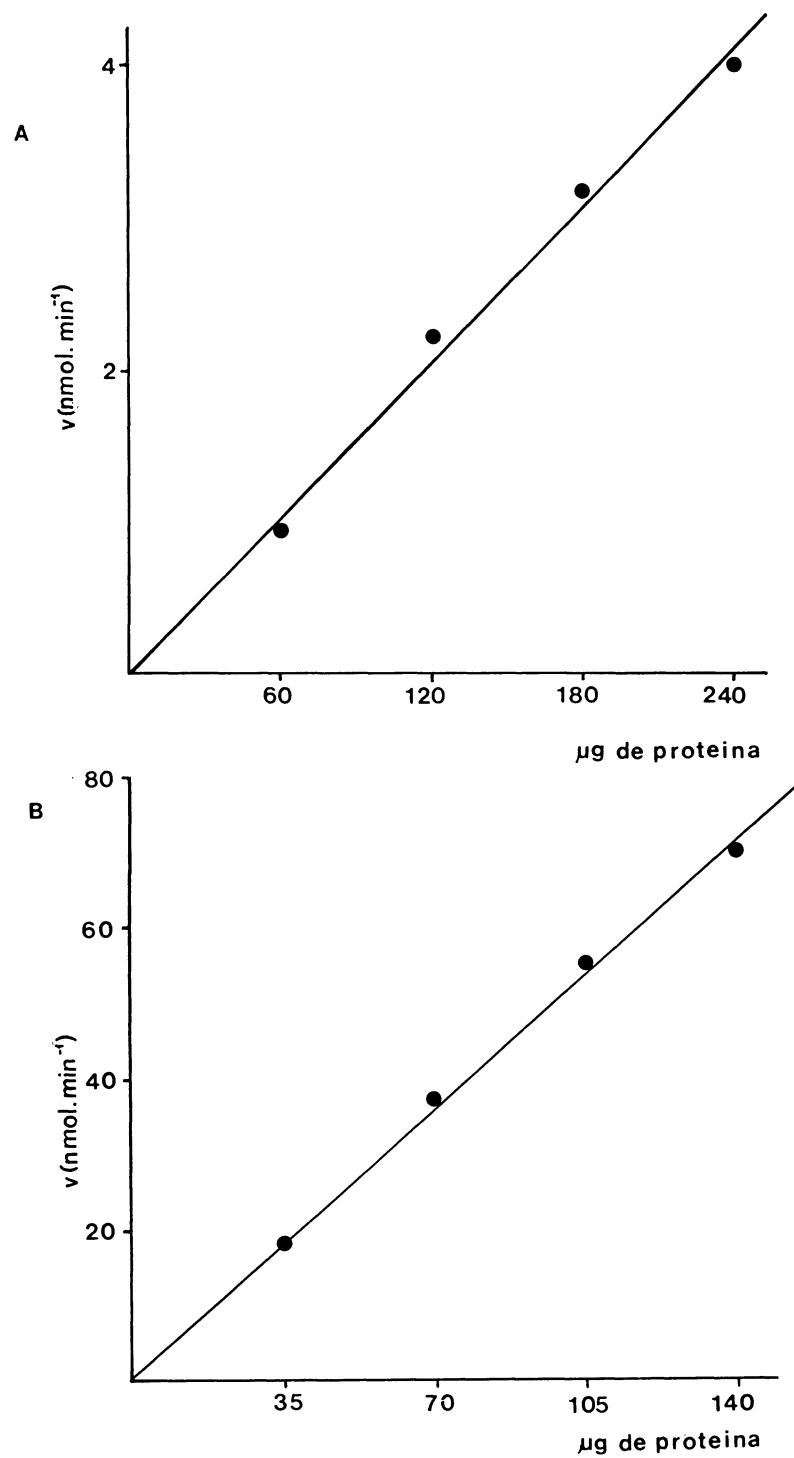


FIGURA 11.11 - ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO (A) E FÍGADO (B) DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO NO ITETM 11.2.6.6.2. PG 57

MMA ou PA tamponados foram adicionados ao meio de incubação nas concentrações de 1, 2,5 e 5mM para MMA e 2, 5 e 10mM para PA. Os controles não continham MMA ou PA.

Também foi verificado o efeito da administração subcutânea de ácido metilmalônico tamponado aos animais, sobre a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase. Nesse caso, o meio de incubação não continha MMA ou PA. Ratos controles receberam solução salina em igual volume.

A formação de NADH foi medida pelo aumento da absorbância a 340nm, sendo este aumento linear até 10 minutos após a adição do substrato (figura 11.12) quando o meio de incubação continha 120ug de proteína de cérebro ou 70ug de proteína de fígado.

A atividade enzimática foi expressa como  $\frac{\text{umol}}{\text{min}} \cdot \frac{\text{g}}{\text{g}}$  de tecido e calculada de acordo com uma curva padrão de NADH, realizada conforme descrito no item 11.2.6.2. pg 44.

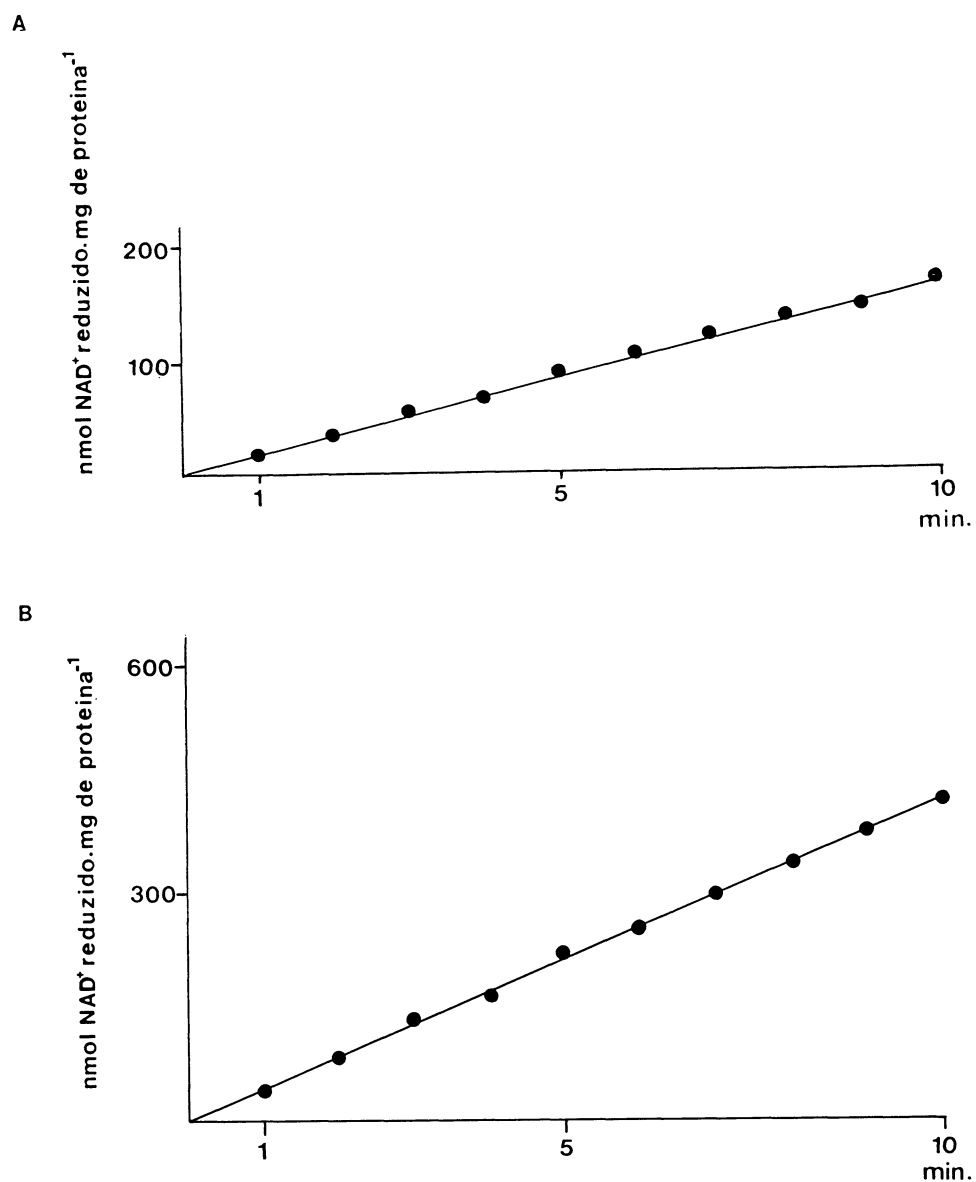


FIGURA 11.12 - LINEARIDADE DA REAÇÃO CATALIZADA PELA BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO (A) E FÍGADO (B) DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, EM FUNÇÃO DO TEMPO. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO NO ITEM 11.2.6.6.2. PG 57

#### 11.2.7. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas, para determinação da quantidade de material enzimático a ser adicionado ao meio de incubação e para expressar a atividade enzimática da succinato desidrogenase, foi realizada de acordo com o método de Lowry et al. (1951).

#### 11.2.8. Produção de $\text{CO}_2$ no cérebro a partir de substratos radioativos

##### 11.2.8.1. Produção de $\text{CO}_2$ a partir de glicose

A produção de  $\text{CO}_2$  a partir de glicose foi realizada de acordo com o método de Crane e Morgan (1983).

Prismas de cérebro (100mg) foram incubados em 1ml de tampão Krebs-Ringer III, pH 7,0 (item 11.1.2. pg 30) contendo 2,5mM de glicose fria e 0,1uCi de  $[2-^{14}\text{C}]$ glicose. Os frascos correspondentes aos grupos experimentais continham além do citado acima, MMA 5mM ou PA 5mM.

Após, os frascos foram gaseificados por 1min com uma mistura carbogênica (5%  $\text{CO}_2$  : 95%  $\text{O}_2$ ) e imediatamente vedados com rolhas de borracha previamente perfuradas e contendo no orifício um bastão de vidro com um poço na sua extremidade inferior, no qual previamente havia sido colocada uma tira de 6,5 x 0,5 cm de papel Whatmann 3M dobrada 3 vezes (figura 11.13).

Os frascos foram incubados em banho metabólico com agitação (90 oscilações por minuto) à 37 °C por 1 hora. Após a incubação, foram adicionados ao poço 0,15ml de hidróxido



de hiamina e 0,25ml de TCA 50% às paredes do frasco. Estas soluções foram colocadas com seringa e agulha de injeção de modo a perfurar o menos possível a rolha de borracha para evitar a entrada ou saída de gases. A adição de prótons (TCA) ao meio de incubação teve por finalidade produzir ácido carbônico e  $\text{CO}_2$  a partir de bicarbonato. O  $\text{CO}_2$  liberado foi então captado pela hiamina impregnada no papel de filtro.

Para a liberação completa do  $\text{CO}_2$ , os frascos foram deixados em repouso, em temperatura ambiente, durante meia hora ao final da qual o papel de filtro foi retirado com pinça e transferido para frascos contendo 10ml de líquido de cintilação e a radioatividade medida em um cintilador.

Os resultados foram expressos em  $\text{nmol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$  de cérebro.

#### 11.2.8.2. Produção de $\text{CO}_2$ a partir de acetato

Prismas de cérebro ( $100\text{mg}$ ) foram incubadas em 1ml de tampão Krebs-Ringer III, pH 7,0 (item 11.1.2. pg 30) contendo  $0,2\mu\text{Ci}$  de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ acetato, 5mM de acetato de sódio frio e 5mM de glicose fria. A produção de  $\text{CO}_2$  a partir de acetato seguiu o mesmo procedimento utilizado no item 11.2.7.1..

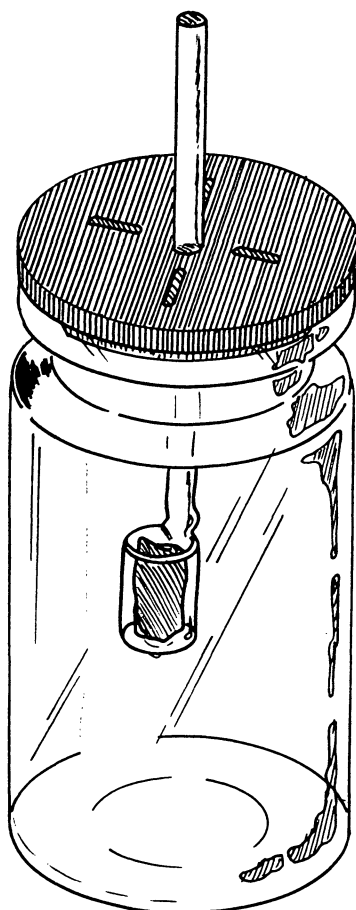


FIGURA 11.13 - FRASCO UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DE CO<sub>2</sub> A PARTIR DE SUBSTRATOS RADIOATIVOS

#### 11.2.9. Incorporação de substratos radioativos em lipídios

A medida da incorporação de  $[2-^{14}\text{C}]$ glicose e  $[U-^{14}\text{C}]$ acetato em lipídios pelo cérebro de ratos foi realizada de acordo com o método de Crane e Morgan (1983). A extração dos lipídios totais do cérebro procedeu-se de acordo com Folch et al. (1957).

Após a coleta do papel de filtro contendo o  $\text{CO}_2$  produzido a partir de  $[2-^{14}\text{C}]$ glicose ou  $[U-^{14}\text{C}]$ acetato, o meio de incubação (1ml) contendo 100mg de tecido foi retirado e processado para a extração de lipídios totais. O material foi homogeneizado com 3ml de clorofórmio e 2ml de metanol. Os homogeneizados foram transferidos para tubos de centrífuga e misturados em vortex. Foram então centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. Após à centrifugação, três fases foram obtidas: uma fase superior, contendo componentes polares (3:48:47 v/v), uma fase inferior contendo componentes apolares (86:14:1 v/v) e um precipitado protéico entre as duas fases. A fase inferior (lipídica) foi então transferida para outros tubos de centrífuga e lavada 3 vezes com uma mistura clorofórmio:metanol:água (3:48:47 v/v) sendo que entre cada lavagem os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 3 minutos e a fase superior desprezada.

O volume final da última fase inferior foi medido e 0,5ml deste foi transferido para frascos de contagem. Esta alíquota foi então evaporada à  $50^\circ\text{C}$  em banho maria. Aos frascos foram adicionados 5ml de líquido de cintilação e a radioatividade medida.

Para o cálculo da concentração final de substratos radioativos incorporados em lipídios, foi levado em consideração o volume total da última fase do extrato de lipídios. Os resultados foram expressos em  $\text{nmol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$  de cérebro.

#### 11.2.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A comparação entre mais de dois grupos foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan quando o valor de F foi significativo ( $p < 0.05$ ) (Bliss, 1967). Quando foram comparados dois grupos entre si utilizou-se o teste t de Student para amostras independentes ou dependentes conforme o caso (Levin, 1978).

Para estas análises foi utilizado o programa de estatística SPSS/PC-plus em um microcomputador IBM/PC-XT compatível.

Os cálculos de regressão linear para as representações gráficas de Lineweaver e Burk e de Dixon foram realizados em uma calculadora programável.

### III. RESULTADOS

#### III.1. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE A CAPTAÇÃO IN VITRO DE GLICOSE POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

##### III.1.1. Efeito do metilmalonato e propionato adicionados ao meio de incubação

Metilmalonato, quando adicionado ao meio de incubação, aumenta significativamente ( $F(3,28)=11,16$ ;  $p<0.001$ ) a incorporação de glicose por cérebro de ratos em jejum (tabela III.1), sendo este efeito significante a partir de 1mM de MMA adicionados ao meio. Propionato, por outro lado, (tabela III.1) não provocou nenhum efeito sobre a captação de glicose por cérebro de ratos ( $F(3,28)= 0,474$ ;  $p<0,70$ ).

##### III.1.2. Efeito da administração de metilmalonato sobre a captação in vitro de glicose

A tabela III.2 mostra a utilização de glicose pelo cérebro de ratos em jejum que receberam injeções subcutâneas de MMA. A incorporação de glicose por prismas de cérebro de ratos em jejum tratados com MMA foi significativamente maior quando comparada com o grupo controle ( $t=2,875$ ;  $p<0,01$ ).

TABELA III.1

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A CAPTAÇÃO IN VITRO DE GLICOSE POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| MMA        |                          |                         |                          |
|------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Controles  | 1mM                      | 2,5mM                   | 5mM                      |
| 21,0 ± 3,3 | 31.8 ± 4,4 <sup>**</sup> | 26,2 ± 3,9 <sup>*</sup> | 29,4 ± 3,8 <sup>**</sup> |

| PA         |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|
| Controles  | 2mM        | 5mM        | 10mM       |
| 21,1 ± 2,7 | 23,1 ± 6,2 | 23,2 ± 5,1 | 23,9 ± 5,3 |

Cada resultado representa a média de 8 experimentos independentes e estão expressos em  $\mu\text{mol de glicose captada.h}^{-1}\text{.g}^{-1}$  ± desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.3.1. pg 35. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram analisadas por ANOVA seguida pelo teste de Duncan quando o F foi significativa. Diferenças significantes quando comparadas com o grupo controle: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

TABELA III.2

CAPTAÇÃO IN VITRO DE GLICOSE POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, TRATADOS COM METILMALONATO (MMA) OU COM SOLUÇÃO SALINA

| Controles (salina) | MMA                     |
|--------------------|-------------------------|
| 19,5 ± 3,8         | 23,6 ± 2,8 <sup>*</sup> |

Cada resultado representa a média de 12 experimentos independentes e estão expressos em  $\mu\text{mol de glicose}$   $\text{captada.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$  ± desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.3.2. pg 36. As diferenças entre as médias do grupo controle e do grupo tratado com MMA (\*  $p < 0,05$ ) foram analisadas pelo teste "t" de Student para amostras independentes.

### III.2. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

#### III.2.1. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a atividade da hexoquinase de cérebro de ratos

Metilmalonato, quando adicionado ao meio de incubação, não interferiu na atividade da hexoquinase de cérebro de ratos (tabela III.3) em jejum ( $F(3,12)=0,6310$ ;  $p<0,61$ ). O mesmo pode ser observado em relação ao propionato ( $F(3,12)=0,047$ ;  $p<0,98$ ).

#### III.2.2. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a atividade da fosfofrutoquinase de cérebro de ratos

A tabela III.4 apresenta os resultados obtidos quando MMA ou PA foram adicionados ao meio de incubação de modo a observar-se seus efeitos sobre a fosfofrutoquinase de cérebro de ratos de 15 dias de vida. MMA ou PA não modificaram a atividade da enzima em cérebro de ratos em jejum (MMA -  $F(3,12)=0,117$ ;  $p<0,95$ ; PA -  $F(3,12)=0,068$ ;  $p<0,97$ ).



TABELA III.3

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A ATIVIDADE DA HEXOQUINASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| MMA         |             |             |             |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Controles   | 1mM         | 2,5mM       | 5mM         |
| 11,6 ± 0,64 | 11,3 ± 0,62 | 11,4 ± 0,52 | 11,1 ± 0,81 |

| PA          |             |             |             |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Controles   | 2mM         | 5mM         | 10mM        |
| 10,9 ± 0,87 | 11,2 ± 1,40 | 11,2 ± 1,35 | 11,0 ± 1,27 |

Cada resultado representa a média de 4 experimentos independentes e estão expressos em  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  ± desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos Item 11.2.6.1. pg 40.

TABELA III.4

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOQUINASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| MMA         |             |             |             |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Controles   | 1mM         | 2,5mM       | 5mM         |
| 28,1 ± 2,22 | 28,4 ± 3,53 | 27,6 ± 2,39 | 27,5 ± 1,81 |
| PA          |             |             |             |
| Controles   | 2mM         | 5mM         | 10mM        |
| 27,6 ± 2,38 | 28,4 ± 1,39 | 27,8 ± 3,10 | 27,9 ± 0,57 |

Cada resultado representa a média de 4 experiemtnos independentes e estão expressos por  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  ± desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.6.2. pg 44.

### III.2.3. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a atividade da piruvatoquinase de cérebro de ratos

MMA, quando adicionado ao meio de incubação, não afetou atividade da piruvatoquinase de cérebro de ratos com 15 dias de vida, em jejum ( $F(3,12)=0,094$ ;  $p<0,96$ ) (tabela III.5). Nesta tabela pode ser observado que a atividade desta enzima não foi alterada por PA ( $F(3,12)=0,214$ ;  $p<0,88$ ).

TABELA III.5

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A ATIVIDADE DA PIRUVATOQUINASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| MMA         |             |             |             |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Controles   | 1mM         | 2,5mM       | 5mM         |
| 23,9 ± 2,51 | 23,8 ± 2,74 | 23,9 ± 1,09 | 24,7 ± 2,13 |
| PA          |             |             |             |
| Controles   | 2mM         | 5mM         | 10mM        |
| 24,7 ± 3,31 | 23,6 ± 2,23 | 25,1 ± 1,19 | 24,2 ± 3,50 |

Cada resultado representa a média de 4 experimentos independentes e estão expressos em  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  ± desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item II.2.6.3. pg 46.

#### III.2.4. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase de cérebro de ratos

Na tabela III.6 pode ser observado que MMA, adicionado ao meio de incubação, não interferiu na atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase de cérebro de ratos de 15 dias de vida em jejum ( $F(3,12)=0,998$ ;  $p<0,43$ ). O mesmo pode ser observado com relação ao PA:  $F(3,12)=0,351$ ;  $p<0,79$ .

### III.3. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO IN VITRO A PARTIR DE GLICOSE POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

#### III.3.1. Efeito do metilmalonato e propionato adicionados ao meio de incubação

Lactato e glicose foram dosados no meio de incubação após os prismas de cérebro terem sido incubados com 5mM de glicose na presença de MMA ou PA. Os controles não continham estes metabólitos no meio de incubação. Os resultados referentes à captação de glicose já foram apresentados na tabela III.1.

Após a incubação do cérebro de animais em jejum com glicose, houve um aumento significativo na produção de lactato quando MMA estava presente no meio ( $F(3,28)=4,365$ ;  $p<0,01$ ) a partir de 2,5mM (tabela III.7).

TABELA III.6

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| MMA             |                 |                 |                 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Controles       | 1mM             | 2,5mM           | 5mM             |
| $1,86 \pm 0,09$ | $1,91 \pm 0,14$ | $1,93 \pm 0,12$ | $1,81 \pm 0,02$ |
| PA              |                 |                 |                 |
| Controles       | 2mM             | 5mM             | 10mM            |
| $1,90 \pm 0,04$ | $1,92 \pm 0,09$ | $1,91 \pm 0,18$ | $1,95 \pm 0,14$ |

Cada resultado representa a média de 4 experimentos independentes e estão expressos em  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$   $\pm$  desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.6.4. pg 50.

TABELA III.7

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A PRODUÇÃO IN VITRO DE LACTATO A PARTIR DE GLICOSE POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| MMA                |                    |                                  |                                  |
|--------------------|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Controles          | 1mM                | 2,5mM                            | 5mM                              |
| 4,39 ± 0,70<br>(8) | 5,24 ± 0,99<br>(8) | 5,72 ± 0,78 <sup>*</sup><br>(8)  | 5,83 ± 1,02 <sup>*</sup><br>(8)  |
| PA                 |                    |                                  |                                  |
| Controles          | 2mM                | 5mM                              | 10mM                             |
| 5,03 ± 0,26<br>(6) | 4,90 ± 0,26<br>(6) | 3,78 ± 0,31 <sup>**</sup><br>(6) | 3,67 ± 0,21 <sup>**</sup><br>(6) |

Cada resultado representa a média ± desvio padrão e está expresso em  $\mu\text{mol de lactato produzido.h}^{-1}\text{.g}^{-1}$ . Números entre parênteses representam o número de ratos. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.5.1. pg 39. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram analisadas por ANOVA seguida pelo teste de Duncan quando o F foi significante. Diferenças significantes quando comparadas com o grupo controle: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Pode ser observado na tabela III.7 que o PA, quando adicionado ao meio de incubação, diminuiu significativamente a produção de lactato a partir de glicose dos cérebros de ratos em jejum ( $F(3,20)=45,31$ ;  $p<0,001$ ).

### III.3.2. Efeito da administração de metilmalonato sobre a produção in vitro de lactato a partir de glicose

Como MMA produziu efeito sobre a produção de lactato por cérebro de animais em jejum, este metabólito foi administrado a um grupo de ratos de modo a observar-se seu efeito.

Na tabela III.8 observa-se que MMA não teve efeito sobre a produção de lactato a partir de glicose quando administrado a animais em jejum ( $t=0,459$ ;  $p<0,70$ ) quando comparado com animais injetados com NaCl 0,85% (controles).

TABELA III.8

PRODUÇÃO IN VITRO DE LACTATO A PARTIR DE GLICOSE POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, TRATADOS COM METILMALONATO (MMA) OU COM SOLUÇÃO SALINA

| Controles (salina) | MMA             |
|--------------------|-----------------|
| $4,12 \pm 0,98$    | $4,32 \pm 0,97$ |

Cada resultado representa a média de 10 experimentos independentes e estão expressos em  $\mu\text{mol}$  de lactato produzido.<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>  $\pm$  desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item II.2.5.2. pg 40.

#### III.4. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE

##### III.4.1. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a atividade da succinato desidrogenase de cérebro de ratos

Na tabela III.9 pode-se observar o efeito do MMA e PA quando adicionados ao meio de incubação sobre a atividade da succinato desidrogenase de cérebro de ratos de 15 dias de vida. Utilizaram-se altas concentrações dos metabólitos (20 e 40mM), considerando-se que a concentração do substrato succinato no ensaio era de 40mM.

MMA, nas concentrações de 20 e 40mM, inibiu significativamente a atividade enzimática de cérebro de ratos em jejum ( $F(4,24)=11,11$ ;  $p<0,001$ ).

Propionato, quando adicionado ao meio de incubação não produziu efeito significativo sobre a atividade da succinato desidrogenase cerebral ( $F(3,12)=0,015$ ;  $p<0,99$ ).



TABELA III.9

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| MMA       |        |        |                     |                     |
|-----------|--------|--------|---------------------|---------------------|
| Controles | 2,5mM  | 5mM    | 20mM                | 40mM                |
| 15,17     | 15,37  | 14,43  | 10,71 <sup>**</sup> | 10,43 <sup>**</sup> |
| ± 1,08    | ± 2,48 | ± 2,54 | ± 0,71              | ± 1,31              |
| (6)       | (6)    | (6)    | (6)                 | (6)                 |
| PA        |        |        |                     |                     |
| Controles | 5mM    | 20mM   | 40mM                |                     |
| 15,82     | 15,85  | 16,09  | 15,85               |                     |
| ± 3,68    | ± 3,46 | ± 3,32 | ± 3,59              |                     |
| (4)       | (4)    | (4)    | (4)                 |                     |

Cada resultado representa a média  $\pm$  desvio padrão e está expresso em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. Números entre parênteses representam o número de ratos. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos Item 11.2.6.5.2. pg 53. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram analisadas por ANOVA seguida pelo teste de Duncan quando o F foi significativa. Diferenças significantes quando comparadas com o grupo controle: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

#### III.4.2. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a atividade da succinato desidrogenase de fígado de ratos

Como MMA inibiu significativamente a atividade da succinato desidrogenase em cérebro de ratos de 15 dias de vida, foi investigado o efeito deste metabólito e do PA, adicionados ao meio de incubação, sobre a atividade da succinato desidrogenase de fígado de ratos já que o fígado é um órgão gliconeogênico e a hipoglicemia uma das características da metilmalonacidemia.

Para tanto, foi utilizada somente uma concentração de MMA e PA igual à concentração de substrato (succinato) utilizada no ensaio enzimático, ou seja, 40mM.

A atividade da succinato desidrogenase hepática foi significativamente inibida por esta concentração de MMA ( $t=4,903$ ;  $p<0,001$ ), como pode ser observado na tabela III.10.

O PA (tabela III.10) não teve efeito sobre a atividade enzimática hepática, assim como no cérebro de animais em jejum ( $t=0,198$ ;  $p<0,90$ ).

TABELA III.10

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| Controles           | MMA 40mM                          |
|---------------------|-----------------------------------|
| 16,39 ± 1,78<br>(8) | 10,50 ± 3,53 <sup>**</sup><br>(8) |
| Controles           | PA 40mM                           |
| 16,60 ± 2,41<br>(6) | 16,76 ± 3,59<br>(6)               |

Cada resultado representa a média ± desvio padrão e está expresso em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>. Números entre parênteses representam o número de ratos. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.6.5.2. pg 53. As diferenças entre as médias dos grupos controles e dos grupos experimentais (\*\* 0,001) foram analisadas pelo teste "t" de Student para amostras dependentes.

III.4.3. Efeito da administração de metilmalonato a ratos com 15 dias de vida, em jejum, sobre a atividade da succinato desidrogenase no cérebro

A medida da atividade enzimática em cérebro de ratos em jejum injetados subcutaneamente com MMA revelou que este metabólito inibe significativamente esta enzima ( $t=2,957$ ;  $p<0,02$ ) como pode ser visto pela tabela III.11.

TABELA III.11

ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, TRATADOS COM METILMALONATO (MMA) OU COM SOLUÇÃO SALINA

| Controles        | MMA                |
|------------------|--------------------|
| 14,20 $\pm$ 2,50 | 11,04 $\pm$ 1.32 * |

Cada resultado representa a média de 8 experimentos independentes e estão expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína  $\pm$  desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.6.5.2. pg 53. A diferença entre as médias do grupo controle e do grupo tratado com MMA (\*  $p<0,02$ ) foi analisada pelo teste "t" de Student para amostras independentes.

III.4.4. Efeito da administração de metilmalonato a ratos com 15 dias de vida, em jejum, sobre a atividade da succinato desidrogenase no fígado

Assim como em cérebro de ratos, MMA, administrado subcutaneamente aos animais, também produziu um efeito inibitório significativo ( $t=2,293; p<0,05$ ) sobre a atividade da succinato desidrogenase hepática (tabela III.12) de ratos com 15 dias de vida, em jejum.

TABELA III.12

ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, TRATADOS COM METILMALONATO (MMA) OU COM SOLUÇÃO SALINA

| Controles        | MMA                |
|------------------|--------------------|
| 15,50 $\pm$ 3,00 | 12,56 $\pm$ 0,93 * |

Cada resultado representa a média de 7 experimentos independentes e estão expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína  $\pm$  desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos Item 11.2.6.5.2. pg 53. A diferença entre as médias do grupo controle e do grupo tratado com MMA (\*  $p<0,05$ ) foi analisada pelo teste "t" de Student para amostras independentes.

#### III.4.5. Determinação do Km para succinato desidrogenase de ratos de 15 dias de vida

##### III.4.5.1. Determinação do Km para a succinato desidrogenase em cérebro de ratos

Desde que a inibição causada pelo MMA sobre a succinato desidrogenase de cérebro de ratos de 15 dias de vida em jejum foi significativa, seguiu-se a investigação no sentido de determinar-se o tipo de inibição causada por este metabólito.

O primeiro passo para isto foi a determinação do Km para a succinato desidrogenase em cérebro de ratos de 15 dias de vida.

Para determinação do Km utilizaram-se concentrações de succinato que variaram de 0,1 a 10mM (figura III.1.a). Todos os experimentos foram feitos em triplicatas.

Uma vez determinada a curva de substrato (figura III.1.a) foram escolhidas as seguintes concentrações para determinação do Km: 0,25mM - 0,4mM - 0,5mM - 0,75mM e 1,0mM.

Um experimento típico para a determinação do Km está representado de acordo com Lineweaver e Burk na figura III.1.b, sendo que o Km para esta enzima em cérebro de ratos de 15 dias de vida foi determinada como sendo 0,45mM e a velocidade máxima calculada em  $18,20 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ .

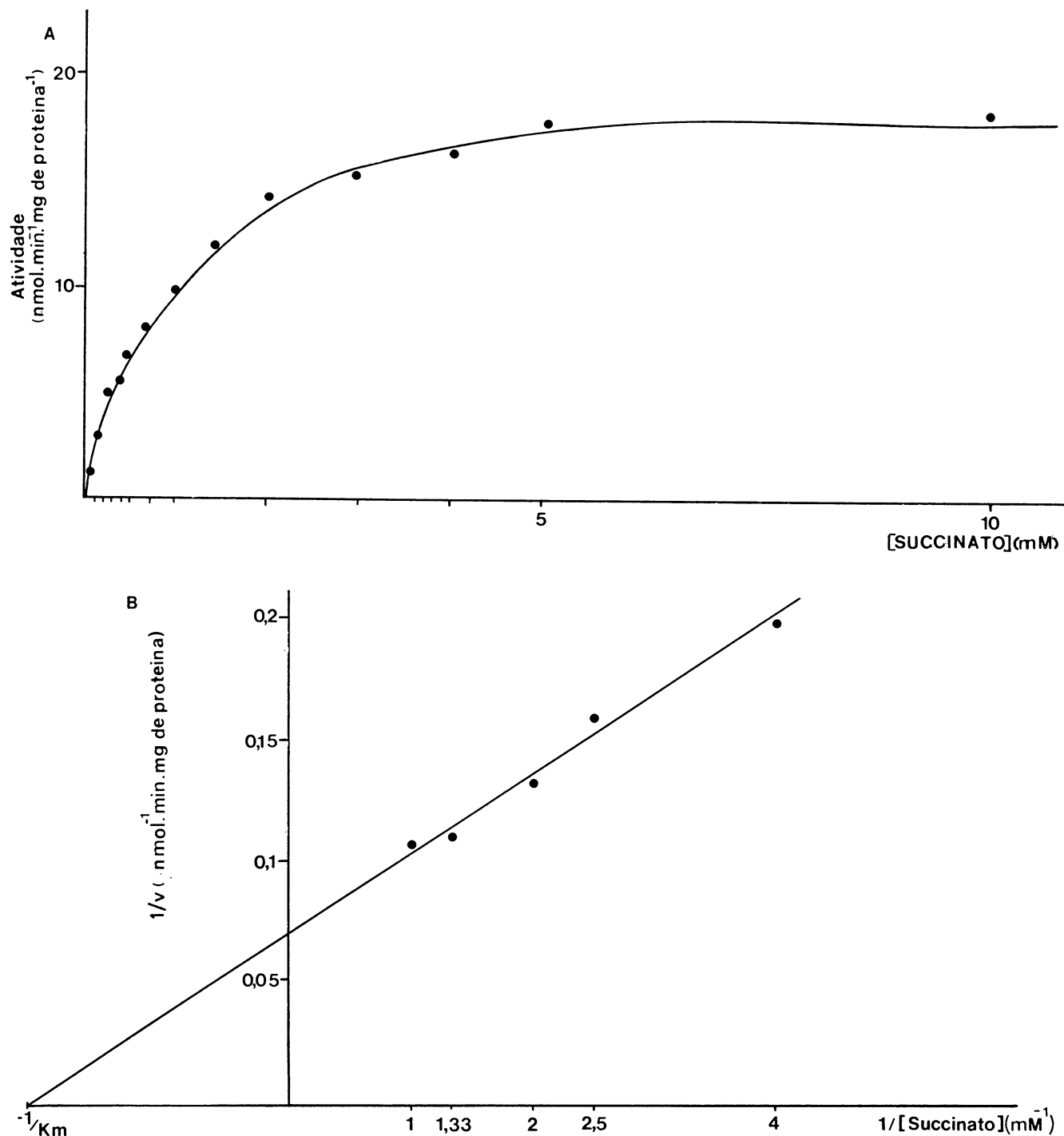


FIGURA III.1 - DETERMINAÇÃO DO K<sub>m</sub> PARA A SUCCINATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. (A) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE MICHAELIS-MENTEN. (B) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS ITEM 11.2.6.5.2. PG 53

#### III.4.5.2. Determinação do $K_m$ para a succinato desidrogenase em fígado de ratos

O metilmalonato mostrou-se também um importante inibidor para a succinato desidrogenase de fígado de ratos de 15 dias de vida em jejum. Como para a succinato desidrogenase de cérebro de ratos, seguiu-se a investigação no sentido de determinar-se o tipo de inibição causada por este metabólito.

A determinação do  $K_m$  para succinato desidrogenase hepática foi feita utilizando-se concentrações de succinato de 0,1 a 10mM (figura III.2.a) e todos os experimentos foram realizados em triplicata, sem a adição de MMA ao meio de incubação.

Uma vez determinada a faixa de linearidade na curva de substrato (figura III.2.a) foram escolhidas as seguintes concentrações de succinato para determinação do  $K_m$ : 0,2mM - 0,3mM - 0,4mM - 0,5mM e 0,75mM.

Um experimento típico para determinação do  $K_m$  está representado, de acordo com Lineweaver e Burk, na figura III.2.b, sendo que o  $K_m$  para esta enzima em fígado de ratos de 15 dias de vida foi de 0,34mM e a velocidade máxima calculada em  $18,20 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .



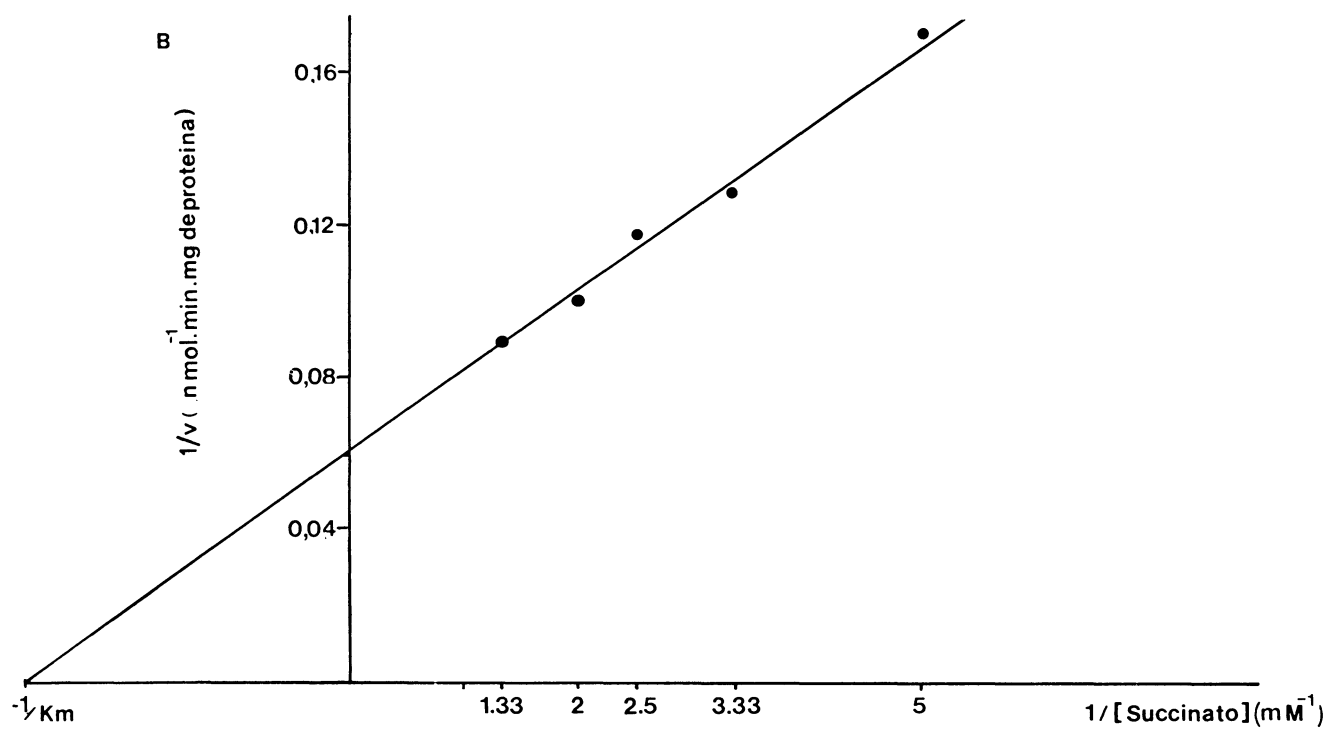
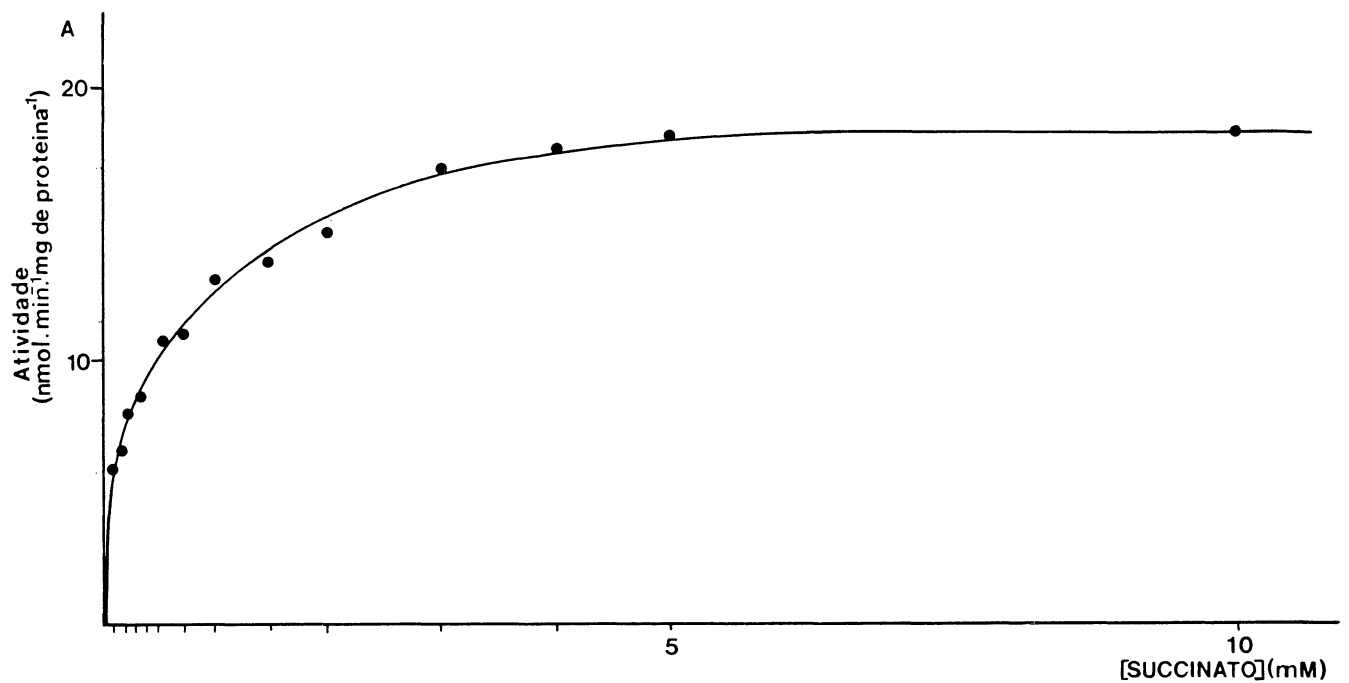


FIGURA 111.2 - DETERMINAÇÃO DO  $K_m$  PARA A SUCCINATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. (A) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE MICHAELIS-MENTEN. (B) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS ITEM 11.2.6.5.2. PG 53

#### III.4.6. Determinação do tipo de inibição causada pelo metilmalonato sobre a succinato desidrogenase

##### III.4.6.1. Determinação do tipo de inibição da succinato desidrogenase em cérebro de ratos

Uma vez determinado o  $K_m$  para a succinato desidrogenase de cérebro de ratos de 15 dias de vida, partiu-se para a identificação do tipo de inibição causada pelo MMA sobre esta enzima.

Foram utilizadas três concentrações de MMA: 1mM - 5mM e 7,5mM e cinco concentrações de succinato: 0,25mM - 0,4mM - 0,5mM - 0,75mM e 1mM. Foi realizada uma curva para cada concentração de MMA e uma curva controle (sem MMA) com todas as concentrações de succinato citadas anteriormente. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

MMA mostrou-se um inibidor competitivo para a succinato desidrogenase de cérebro de ratos como pode ser visto pela curva de Lineweaver e Burk na figura III.3 que representa um experimento típico realizado levando em consideração cada curva de MMA e a curva controle.

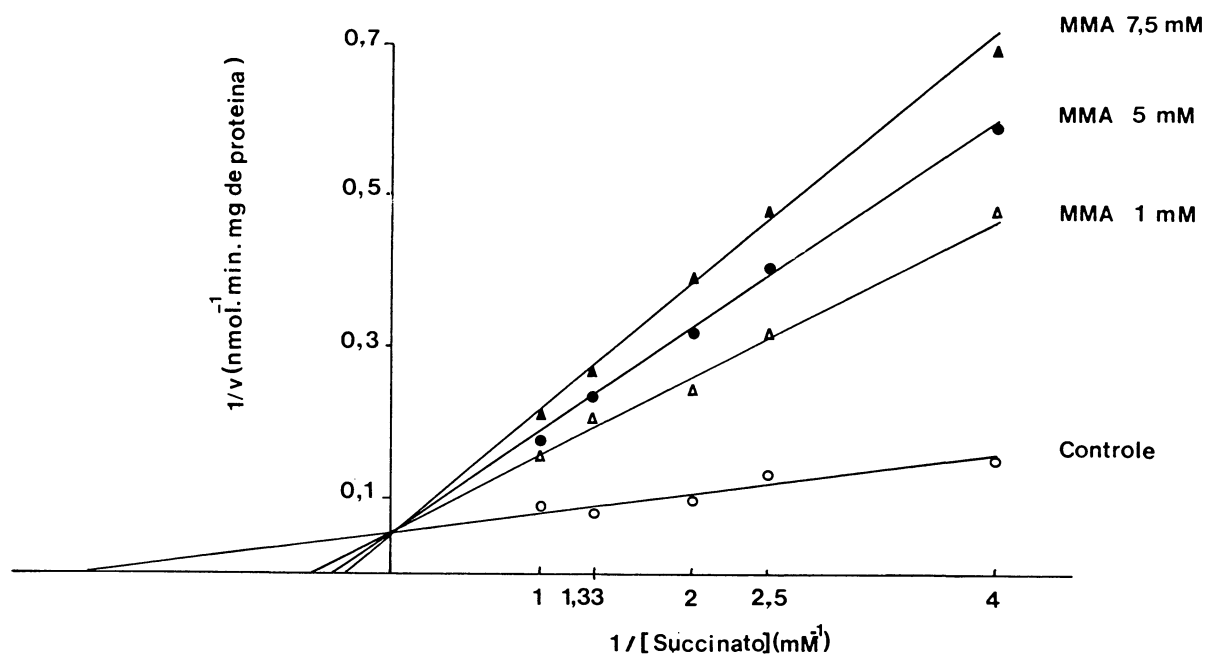


FIGURA III.3 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO DE INIBIÇÃO CAUSADA PELO MMA SOBRE A SUCCINATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS ITEM 11.2.6.5.2. PG 53

#### III.4.6.2. Determinação do tipo de inibição da succinato desidrogenase em fígado de ratos

Assim como para o cérebro, após ter sido determinado o  $K_m$  para a succinato desidrogenase de fígado de ratos de 15 dias de vida, partiu-se para a determinação do tipo de inibição causada pelo MMA sobre esta enzima.

Foram utilizadas três concentrações de MMA: 2,5mM - 5mM e 7,5mM e cinco concentrações de succinato: 0,2mM - 0,3mM - 0,4mM - 0,5mM e 0,75mM.

Para cada concentração de MMA foi feita uma curva utilizando-se as concentrações de substrato citadas acima. O mesmo ocorreu com a curva controle, onde MMA não foi adicionado ao meio de incubação. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Um experimento típico está demonstrado na figura III.4 onde pode-se observar, de acordo com a representação gráfica de Lineweaver e Burk, que a inibição provocada pelo MMA sobre a succinato desidrogenase de fígado de ratos de 15 dias de vida é do tipo competitiva.

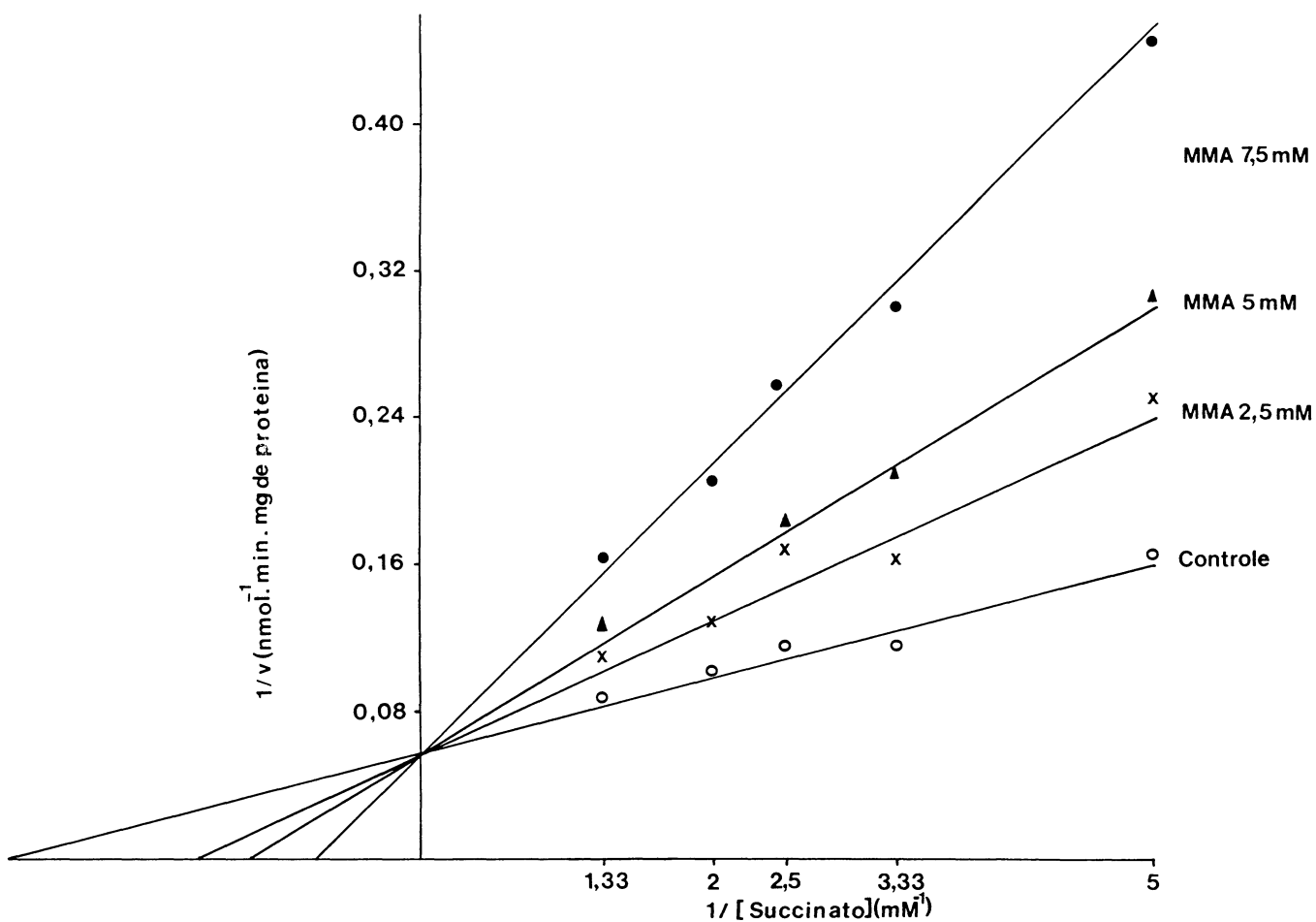


FIGURA 111.4 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO DE INIBIÇÃO CAUSADA PELO MMA SOBRE A SUCCINATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS ITEM 11.2.6.5.2. PG 53

#### III.4.7. Determinação do $K_i$ do metilmalonato para a succinato desidrogenase

##### III.4.7.1. Determinação do $K_i$ para a succinato desidrogenase em cérebro de ratos

A constante de inibição ( $K_i$ ) para o MMA em relação à succinato desidrogenase de cérebro de ratos de 15 dias de vida foi determinada utilizando-se os mesmos dados empregados para a determinação do tipo de inibição causada pelo MMA sobre esta enzima.

O  $K_i$ , de acordo com a representação gráfica de Dixon, foi calculado como sendo 4,5mM e a figura III.5 representa um experimento típico realizado em triplicata.

##### III.4.7.2. Determinação do $K_i$ para a succinato desidrogenase em fígado de ratos

No fígado a constante de inibição ( $K_i$ ) para o MMA em relação à succinato desidrogenase de ratos de 15 dias de vida foi calculada como sendo 2,3mM.

Os dados para a representação gráfica de Dixon representados na figura III.6 foram os mesmos utilizados para os experimentos onde foi determinado o tipo de inibição causada pelo MMA sobre a succinato desidrogenase hepática. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e a figura III.6 representa um experimento típico.

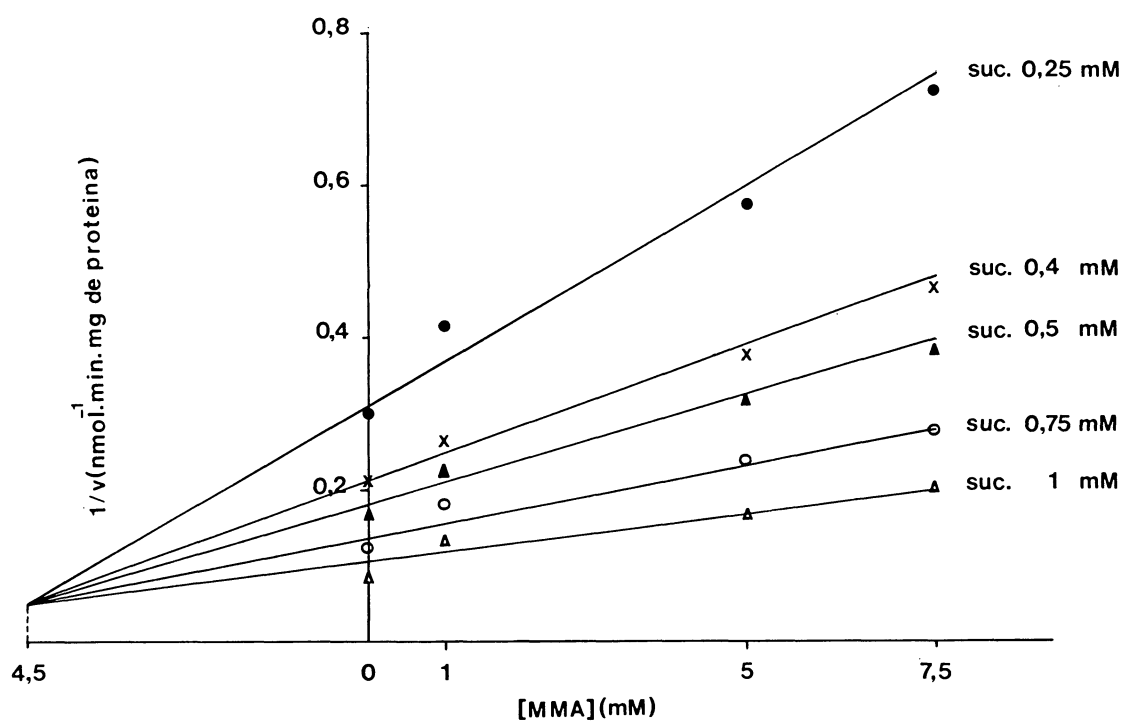


FIGURA 11.5 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE DIXON PARA DETERMINAÇÃO DO  $K_i$  PARA O MMA SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. SUC = SUCCINATO. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS ITEM 11.2.6.5.2. PG 53

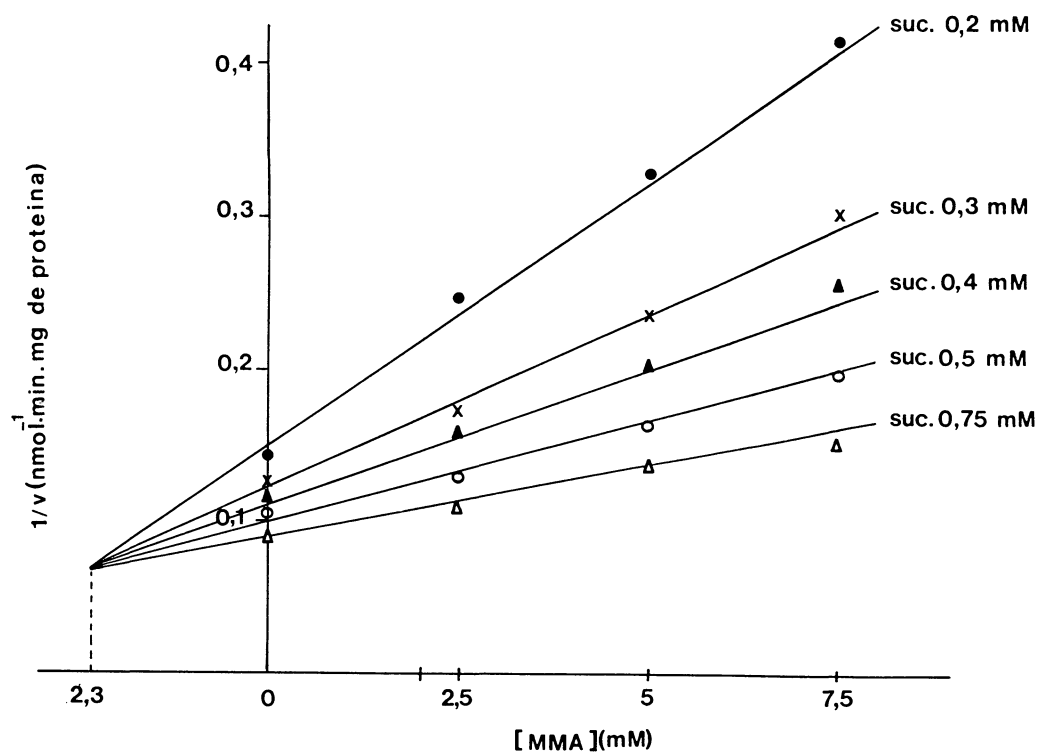


FIGURA III.6 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE DIXON PARA DETERMINAÇÃO DO  $K_i$  PARA O MMA SOBRE A ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. SUC = SUCCINATO. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS ITEM 11.2.6.5.2. PG 53



III.5. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE A  
PRODUÇÃO DE CO<sub>2</sub> A PARTIR DE SUBSTRATOS RADIOATIVOS  
POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

III.5.1. Produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose

Prismas de cérebro de ratos de 15 dias de vida incubados na presença de [2-<sup>14</sup>C]glicose e MMA 5mM, produziram significativamente menos CO<sub>2</sub> que prismas de cérebro de ratos incubados sem a presença do metabólito (controle) - tabela III.13. Este efeito foi observado em cérebro de ratos em jejum ( $t=2,729$ ;  $p<0,05$ ).

Na mesma tabela pode ser observado que quando PA é adicionado ao meio de incubação contendo [2-<sup>14</sup>C]glicose não houve diferença na produção de CO<sub>2</sub> pelos prismas de cérebro de ratos em jejum ( $t=0,276$ ;  $p<0,80$ ) quando comparados com o grupo controle (sem adição de metabólito ao meio de incubação).

III.5.2. Produção de CO<sub>2</sub> a partir de acetato

Metilmalonato, quando adicionado ao meio de incubação contendo [U-<sup>14</sup>C]acetato (tabela III.14), diminuiu significativamente a produção de CO<sub>2</sub> a partir deste composto por prismas de cérebro de ratos em jejum ( $t=12,87$ ;  $p<0,01$ ).

Na tabela III.14 também pode-se observar que, quando PA foi adicionado ao meio, ocorreu uma diminuição significativa da produção de CO<sub>2</sub> a partir de acetato marcado por prismas de cérebro de ratos em jejum ( $t=14,85$ ;  $p<0,005$ ).

TABELA III.13

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A  
 PRODUÇÃO DE  $\text{CO}_2$  A PARTIR DE [2-<sup>14</sup>C]GLICOSE POR CÉREBRO DE  
 RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| Controles  | MMA 5mM                 | PA 5mM     |
|------------|-------------------------|------------|
| 381 ± 73,4 | 305 ± 33,9 <sup>*</sup> | 394 ± 89,7 |

Cada resultado representa a média de 7 experimentos independentes e estão expressos em nmol de  $\text{CO}_2$  produzidos.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> ± desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.8.1. pg 61. As diferenças entre as médias do grupo controle e dos grupos experimentais (\* p<0,05) foram analisadas pelo teste "t" de Student para amostras dependentes.

TABELA III.14

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A  
 PRODUÇÃO DE  $\text{CO}_2$  A PARTIR DE  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  ACETATO POR CÉREBRO DE  
 RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| Controles  | MMA 5mM      | PA 5mM       |
|------------|--------------|--------------|
| 110 ± 17,4 | 73 ± 13,6 ** | 62 ± 13,2 ** |

Cada resultado representa a média de 4 experimentos independentes e estão expressos em nmol de  $\text{CO}_2$  produzidos.

$10^{-1}$  ± desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos Item 11.2.8.2. pg 62. As diferenças entre as médias do grupo controle e dos grupos experimentais (\*\*  $p < 0,01$ ) foram analisadas pelo teste "t" de Student para amostras dependentes.

### III.6. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE A BIOSSÍNTESE DE LIPÍDIOS A PARTIR DE SUBSTRATOS RADIOATIVOS POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

#### III.6.1. Biossíntese de lipídios a partir de glicose

A biossíntese de lipídios por prismas de cérebro de ratos em jejum a partir de glicose marcada não sofreu influência significativa (tabela III.15) da presença de 5mM de MMA no meio de incubação ( $t=0,196$ ;  $p<0,90$ ).

O propionato não teve efeito significante sobre a biossíntese de lipídios a partir de glicose marcada, quando foi adicionado ao meio de incubação contendo prismas de cérebro de ratos em jejum ( $t=1,576$ ;  $p<0,20$ ) o que pode ser observado na tabela III.15.

#### III.6.2. Biossíntese de lipídios a partir de acetato

A incorporação de [ $^{14}$ C]acetato em lipídios por prismas de cérebro de ratos em jejum foi significativamente inibida por MMA (tabela III.16) -  $t=5,872$ ;  $p<0,01$ .

Na tabela III.16 também pode ser observado que prismas de cérebro de ratos em jejum, na presença de PA, tiveram a sua biossíntese de lipídios a partir de acetato marcado diminuída significativamente ( $t=9,010$ ;  $p<0,005$ ).

TABELA III.15

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A  
 BIOSSÍNTESE DE LIPÍDIOS A PARTIR DE [2-<sup>14</sup>C]GLICOSE POR  
 CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| Controles  | MMA 5mM    | PA 5mM     |
|------------|------------|------------|
| 134 ± 22,0 | 131 ± 25,3 | 145 ± 34,5 |

Cada resultado representa a média de 7 experimentos independentes e estão expressos em nmol de lipídios sintetizados.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> ± desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.9. pg 64.

TABELA III.16

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA)  
 SOBRE A BIOSSÍNTESE DE LIPÍDIOS A PARTIR DE  
<sup>14</sup>C- ACETATO POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM  
 JEJUM

| Controles  | MMA 5mM       | PA 5mM       |
|------------|---------------|--------------|
| 185 ± 35,5 | 129 ± 20,9 ** | 23 ± 4,17 ** |

Cada resultado representa a média de 4 experimentos independentes e estão expressos em nmol de lipídios sintetizados.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> ± desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.9. pg 64. As diferenças entre as médias do grupo controle e dos grupos experimentais (\*\* p<0,01) foram analisadas pelo teste "t" de Student para amostras dependentes.

### III.7. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE A CAPTAÇÃO IN VITRO DE CORPOS CETÔNICOS POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

#### III.7.1. Efeito do metilmalonato e propionato adicionados ao meio de incubação sobre a captação de acetoacetato

A administração de MMA ao meio de incubação não produziu efeito significativo sobre a captação de acetoacetato por prismas de cérebro de animais em jejum ( $F(3,24)=0,064$  ;  $p<0,98$ ) como pode ser observado na tabela III.17.

Quando PA foi adicionado ao meio de incubação contendo acetoacetato, foi verificada uma inibição significativa da captação deste corpo cetônico (tabela III.17) por prismas de cérebro de ratos em jejum ( $F(3,12)=9,908$ ;  $p<0,001$ ).

#### III.7.2. Efeito do metilmalonato e propionato adicionados ao meio de incubação sobre a captação de beta-hidroxibutirato

Na tabela III.18 pode ser observado que MMA, quando adicionado ao meio de incubação, inibiu significativamente a captação de beta-hidroxibutirato por prismas de cérebro de ratos em jejum ( $F(3,28)=4,565$ ;  $p<0,01$ ). O mesmo ocorreu com o PA que inibiu a captação de beta-hidroxibutirato por cérebro de ratos em jejum ( $F(3,24)=7,527$ ;  $p<0,001$ ).

TABELA III.17

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A CAPTAÇÃO IN VITRO DE ACETOACETATO POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| MMA             |                 |                 |                 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Controles       | 1mM             | 2,5mM           | 5mM             |
| $3,08 \pm 0,56$ | $3,08 \pm 0,44$ | $3,10 \pm 0,34$ | $3,18 \pm 0,24$ |
| (7)             | (7)             | (7)             | (7)             |
| PA              |                 |                 |                 |
| Controles       | 2mM             | 5mM             | 10mM            |
| $2,34 \pm 0,12$ | $1,93 \pm 0,12$ | $1,76 \pm 0,22$ | $1,69 \pm 0,25$ |
| (4)             | (4)             | (4)             | (4)             |

Cada resultado representa a média  $\pm$  desvio padrão e está expresso em  $\mu\text{mol}$  de acetoacetato captado.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>. Números entre parênteses representam o número de ratos. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item II.2.4.1. pg 36. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram analisadas por ANOVA seguida pelo teste de Duncan quando o F foi significante.. Diferenças significantes quando comparadas com o grupo controle: \*\* p<0,01.



TABELA III.18

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A CAPTAÇÃO IN VITRO DE BETA-HIDROXIBUTIRATO POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| MMA         |                |                |                |  |
|-------------|----------------|----------------|----------------|--|
| Controles   | 1mM            | 2,5mM          | 5mM            |  |
| 2,62 ± 0,22 | 2,50 ± 0,32    | 2,28 ± 0,22 *  | 2,20 ± 0,20 ** |  |
| (8)         | (8)            | (8)            | (8)            |  |
| PA          |                |                |                |  |
| Controles   | 2mM            | 5mM            | 10mM           |  |
| 2,50 ± 0,46 | 1,92 ± 0,38 ** | 1,64 ± 0,28 ** | 1,66 ± 0,34 ** |  |
| (7)         | (7)            | (7)            | (7)            |  |

Cada resultado representa a média ± desvio padrão e está expresso em  $\mu\text{mol de beta-hidroxibutirato captado.h}^{-1}\text{.g}^{-1}$ . Números entre parênteses representam o número de ratos. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.4.2.1. pg 37. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram analisadas por ANOVA seguida pelo teste de Duncan quando o F foi significativa. Diferenças significantes quando comparadas com o grupo controle: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

### III.7.3. Efeito da administração de metilmalonato a ratos com 15 dias de vida, em jejum, sobre a captação de beta-hidroxibutirato

Como o MMA, adicionado ao meio de incubação, diminuiu significativamente a captação de beta-hidroxibutirato por prismas de cérebro de ratos em jejum, resolveu-se injetar um grupo de ratos em jejum com solução de MMA tamponado de modo a observar-se o efeito deste ácido, quando administrado ao rato, sobre a captação *in vitro* de beta-hidroxibutirato.

MMA administrado subcutaneamente não teve nenhum efeito sobre a captação de beta-hidroxibutirato por cérebro de ratos de 15 dias de vida em jejum ( $t=0,138$ ;  $p<0,80$ ) como pode ser observado na tabela III.19.

### III.7.4. Efeito da administração de metilmalonato a ratos com 15 dias de vida, em jejum, sobre os níveis sanguíneos de beta-hidroxibutirato

Do mesmo grupo de ratos em jejum, injetado subcutaneamente com MMA, cujo cérebro foi retirado e utilizado para captação de beta-hidroxibutirato, colheu-se o sangue para dosagem de beta-hidroxibutirato.

Como pode ser visto na tabela III.20., os animais tratados com MMA apresentaram um nível significativamente menor de beta-hidroxibutirato no sangue ( $t=3,765$ ;  $p<0,01$ ) quando comparados com os animais controles.

TABELA III.19

CAPTAÇÃO IN VITRO DE BETA-HIDROXIBUTIRATO POR CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, TRATADOS COM METILMALONATO (MMA) OU SOLUÇÃO SALINA

| Controles (salina) | MMA             |
|--------------------|-----------------|
| $2,41 \pm 0,30$    | $2,44 \pm 0,49$ |

Cada resultado representa a média de 8 experimentos independentes e estão expressos em  $\mu\text{mol de beta-hidroxibutirato captado.h}^{-1}\text{.g}^{-1} \pm$  desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.4.2.2. pg 38.

TABELA III.20

NÍVEIS SANGUÍNEOS DE BETA-HIDROXIBUTIRATO EM  
RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, TRATADOS COM  
METILMALONATO (MMA) OU COM SOLUÇÃO SALINA

| Controles (salina)   | MMA                                |
|----------------------|------------------------------------|
| 0,119 ± 0,042<br>(6) | 0,067 ± 0,029 <sup>**</sup><br>(7) |

Cada resultado representa a média ± desvio padrão e está expresso em  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Números entre parênteses representam o número de ratos. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.4.2.1. pg 37. A diferença entre o grupo controle e o grupo tratado com MMA (\*\*  $p < 0,01$ ) foi calculada pelo teste "t" de Student para amostras independentes.

### III.8. EFEITO DO METILMALONATO E PROPIONATO SOBRE A ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE

#### III.8.1. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro de ratos

Tendo em vista que o MMA inibiu a utilização de beta-hidroxibutirato por cérebro de ratos, mas não teve efeito sobre a utilização de acetoacetato, decidiu-se investigar o efeito do MMA e PA sobre a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase.

A atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro de ratos de 15 dias de vida em jejum foi significativamente inibida por MMA adicionado ao meio de incubação ( $F(3,20)=9,480$ ;  $p<0,004$ ) como pode ser observado na tabela III.21.

Propionato, quando adicionado ao meio de incubação, não interferiu com a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro de ratos de 15 dias de vida (tabela III.21) -  $F(3,12)=1,116$ ;  $p<0,39$ .

#### III.8.2. Efeito do metilmalonato e propionato sobre a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase de fígado de ratos

Metilmalonato, quando adicionado ao meio de incubação, inibiu significativamente a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase de fígado de ratos de 15 dias de vida em jejum ( $F(3,12)=8,354$ ;  $p<0,003$ ) - tabela III.22.

TABELA 111.21

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO DEIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| MMA         |             |               |                |  |
|-------------|-------------|---------------|----------------|--|
| Controles   | 1mM         | 2,5mM         | 5mM            |  |
| 1,32 ± 0,13 | 1,21 ± 0,15 | 1,08 ± 0,23 * | 0,84 ± 0,12 ** |  |
| (6)         | (6)         | (6)           | (6)            |  |
| PA          |             |               |                |  |
| Controles   | 2mM         | 5mM           | 10mM           |  |
| 1,24 ± 0,04 | 1,37 ± 0,12 | 1,27 ± 0,10   | 1,22 ± 0,13    |  |
| (4)         | (4)         | (4)           | (4)            |  |

Cada resultado representa a média ± desvio padrão e está expresso em  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ . Números entre parênteses representam o número de ratos. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.6.6.2. pg 57. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram analisadas por ANOVA seguida pelo teste de Duncan quando o F foi significativa. Diferenças significantes quando comparadas com o grupo controle: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

TABELA 111.22

EFEITO DO METILMALONATO (MMA) E PROPIONATO (PA) SOBRE A ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM

| MMA         |               |               |                |
|-------------|---------------|---------------|----------------|
| Controles   | 1mM           | 2,5mM         | 5mM            |
| 23,2 ± 0,63 | 19,7 ± 2,52 * | 20,1 ± 0,50 * | 17,7 ± 1,70 ** |

| PA          |             |             |             |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Controles   | 2mM         | 5mM         | 10mM        |
| 23,7 ± 2,11 | 22,9 ± 2,67 | 22,0 ± 2,40 | 19,8 ± 1,76 |

Cada resultado representa a média de 4 experimentos independentes e estão expressos em  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  ± desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.6.6.2. pg 57. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram analisadas por ANOVA seguida pelo teste de Duncan quando o F foi significativo. Diferenças significantes quando comparadas com o grupo controle: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Assim como no cérebro, o propionato não teve efeito sobre a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase de fígado de ratos em jejum ( $F(3,12)=2,196$ ;  $p<0,14$ ), o que pode ser observado na tabela III.22.

#### III.8.3. Efeito da administração de metilmalonato a ratos com 15 dias de vida, em jejum, sobre a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase em cérebro de ratos

Como MMA adicionado ao meio de incubação apresentou efeito inibitório sobre a beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro de ratos de 15 dias de vida em jejum, administrou-se este metabólito subcutaneamente aos animais de modo a testar seu efeito *in vivo* sobre a enzima.

Como pode ser visto na tabela III.23, a administração de MMA inibe a beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro de ratos em jejum ( $t=2,246$ ;  $p<0,05$ ).

#### III.8.4. Efeito da administração de metilmalonato sobre a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase em fígado de ratos

A adição de MMA ao meio de incubação teve efeito inibitório significativo sobre a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase de fígado de ratos em jejum. Deste modo, administrou-se MMA subcutaneamente a um grupo de ratos em jejum verificando-se assim seu efeito sobre a enzima.



TABELA 111.23

ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO  
DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, TRATADOS COM MMA  
OU SOLUÇÃO SALINA

| Controles (salina) | MMA                       |
|--------------------|---------------------------|
| 1,28 ± 0,130       | 1,05 ± 0,230 <sup>*</sup> |
| (8)                | (7)                       |

Cada resultado representa a média ± desvio padrão e está expresso em  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ . Números entre parênteses representam o número de ratos. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.6.6.2. pg 57. A diferença entre as médias do grupo controle e do grupo tratado com MMA (\*  $p < 0,05$ ) foi analisada pelo teste "t" de Student para amostras independentes.

Conforme a tabela III.24 verificou-se que a administração de MMA aos animais em jejum inibe significativamente a beta-hidroxibutirato desidrogenase hepática destes animais ( $t=2,848$ ;  $p<0,01$ ).

TABELA III.24

ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM, TRATADOS COM MMA OU SOLUÇÃO SALINA

| Controles (salina) | MMA                |
|--------------------|--------------------|
| $25,2 \pm 3,50$    | $20,7 \pm 3,90$ ** |

Cada resultado representa a média de 11 experimentos independentes e estão expressos em  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$   $\pm$  desvio padrão. Condições experimentais conforme descrito em Material e Métodos item 11.2.6.6.2. pg 57. A diferença entre as médias do grupo controle e do grupo tratado com MMA (\*\*  $p<0,001$ ) foi analisada pelo teste "t" de Student para amostras independentes.

### III.8.5. Determinação do Km para a beta-hidroxibutirato desidrogenase de ratos de 15 dias de vida

#### III.8.5.1. Determinação do Km para a beta-hidroxibutirato desidrogenase em cérebro de ratos

Após observada a inibição da beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro de ratos de 15 dias de vida pelo MMA, seguiu-se a investigação no sentido de se identificar o tipo de inibição exercida por este metabólito sobre a enzima.

Em primeiro lugar foi determinada o Km para a enzima em cérebro de ratos de 15 dias de vida. Para isto, foram utilizadas concentrações de beta-hidroxibutirato que variaram de 0,5mM a 20mM (figura III.7.a) sendo que todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Após determinada a curva de substrato (figura III.7.a) foram escolhidas as seguintes concentrações de beta-hidroxibutirato para determinação do Km: 0,75mM - 1,0mM - 1,5mM e 3,0mM.

A figura III.7.b apresenta, de acordo com a representação gráfica de Lineweaver e Burk, um experimento típico realizado em triplicata. O Km para a beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro de ratos de 15 dias de vida foi calculada em 1,26mM e a velocidade máxima em  $2 \times 10^{-1} \text{ umol.min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ .

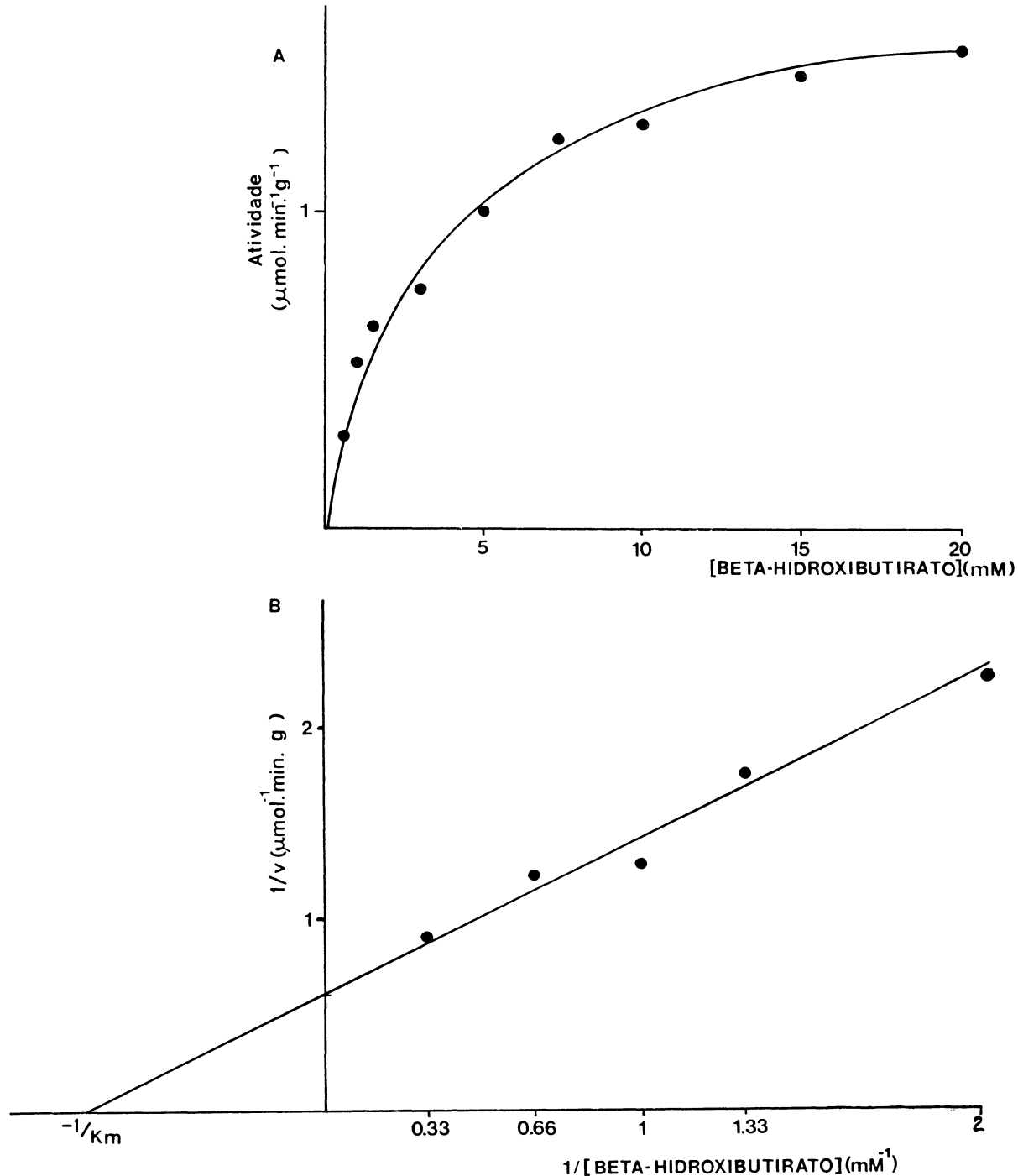


FIGURA 111.7 - DETERMINAÇÃO DO  $K_m$  PARA A BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. (A) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE MICHAELIS-MENTEN. (B) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS ITEM 11.2.6.6.2. PG 57

### III.8.5.2. Determinação do Km para a beta-hidroxibutirato desidrogenase em fígado de ratos

Como no fígado MMA inibiu a beta-hidroxibutirato desidrogenase de ratos em jejum, iniciou-se pela determinação do Km desta enzima neste órgão de modo a prosseguir-se na identificação do tipo de inibição causada por este metabólito.

Para a determinação da curva de substrato da beta-hidroxibutirato desidrogenase de fígado de ratos de 15 dias de vida, foram utilizadas concentrações de beta-hidroxibutirato que variaram de 0,1mM a 20mM (figura III.8.a). Para a determinação do Km foram escolhidas as seguintes concentrações de substrato: 0,2mM - 0,3mM - 0,5mM - 0,75mM e 1mM. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

O Km, de acordo com a representação gráfica de Lineweaver e Burk (figura III.8.b), foi calculada em 0,36mM e a velocidade máxima da reação em  $15,0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ . A figura III.8 a e b representa o melhor de três experimentos realizados em triplicata para determinação do Km.

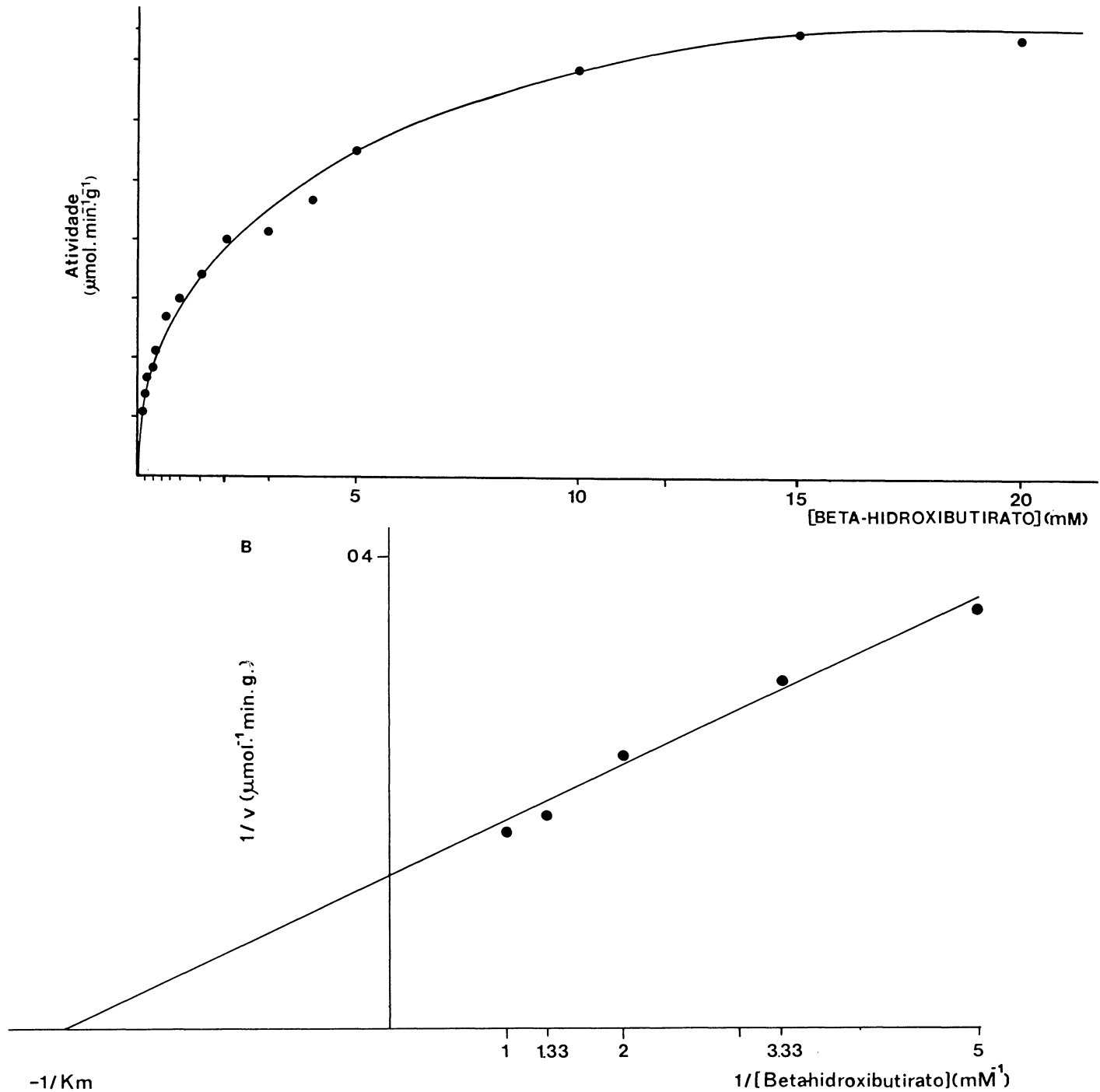


FIGURA III.8 - DETERMINAÇÃO DO  $K_m$  PARA A BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. (A) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE MICHAELIS-MENTEN. (B) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS ITEM II.2.6.6.2. PG 57

### III.8.6. Determinação do tipo de inibição causada pelo metilmalonato sobre a beta-hidroxibutirato desidrogenase

#### III.8.6.1. Determinação do tipo de inibição da beta-hidroxibutirato desidrogenase em cérebro de ratos

De acordo com a representação gráfica de Lineweaver e Burk (figura III.9), MMA inibe competitivamente a beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro de ratos de 15 dias de vida.

Para determinação do tipo de inibição causada pelo MMA, foram utilizadas as concentrações de 0,75mM, 1mM, 1,5mM e 3,0mM de beta-hidroxibutirato que foram testados na presença de MMA 0,5mM, 0,75mM e 1mM de MMA ou sem MMA (curva controle). Para cada concentração de MMA e para o controle foi feito uma curva. Assim como nas demais determinações, todos os experimentos foram realizados em triplicata e um experimento típico realizado foi representado na figura III.9.

#### III.8.6.2. Determinação do tipo de inibição da beta-hidroxibutirato desidrogenase em fígado de ratos

Assim como para o cérebro, também foi investigado o tipo de inibição causada pelo MMA sobre a beta-hidroxibutirato desidrogenase no fígado de ratos de 15 dias de vida.

De acordo com a representação gráfica de Lineweaver e Burk (figura III.10) nota-se que o MMA inibiu competitivamente esta enzima.

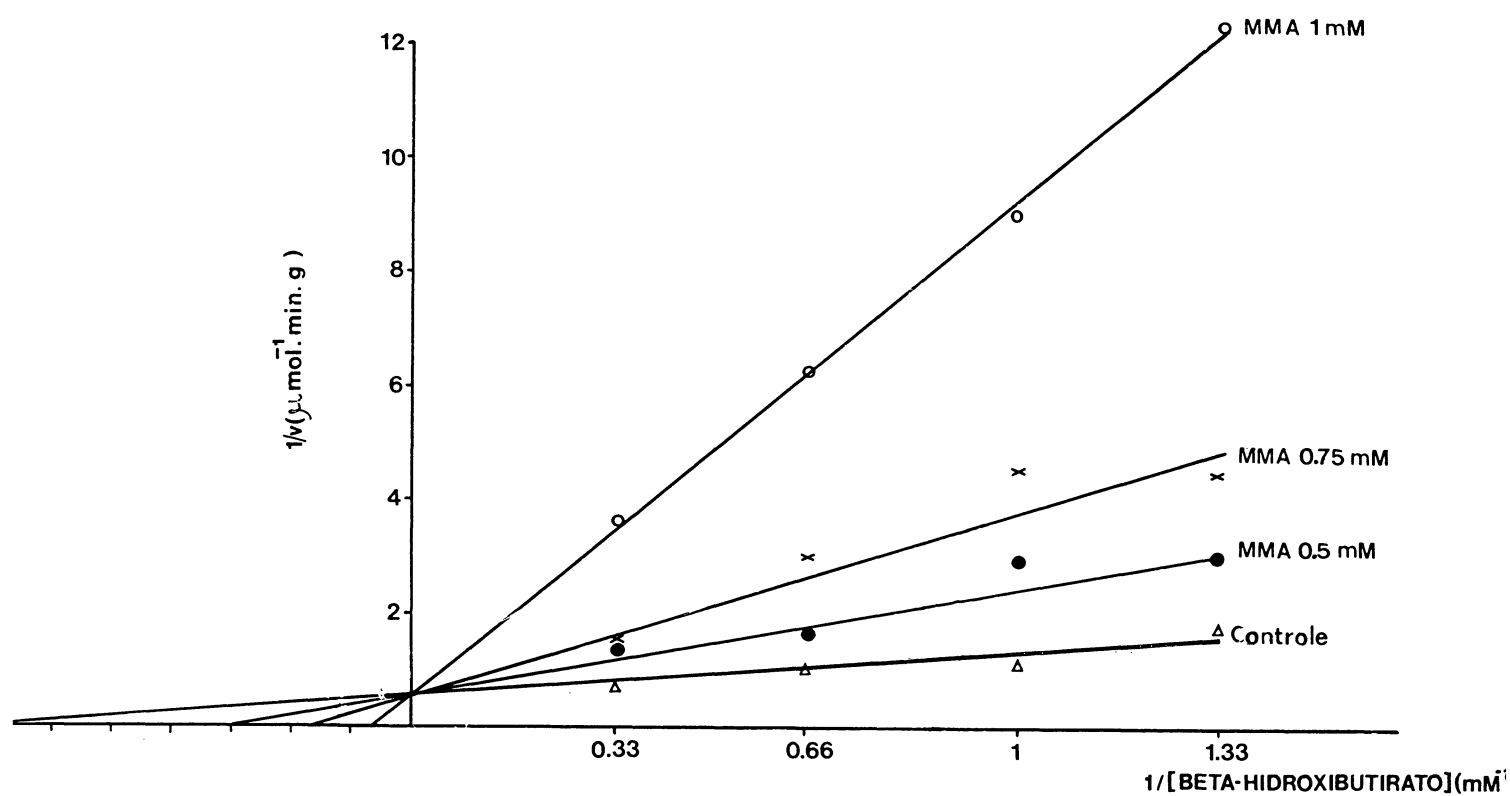


FIGURA 111.9 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO DE INIBIÇÃO CAUSADA PELO MMA SOBRE A BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS ITEM 11.2.6.6.2. PG 57



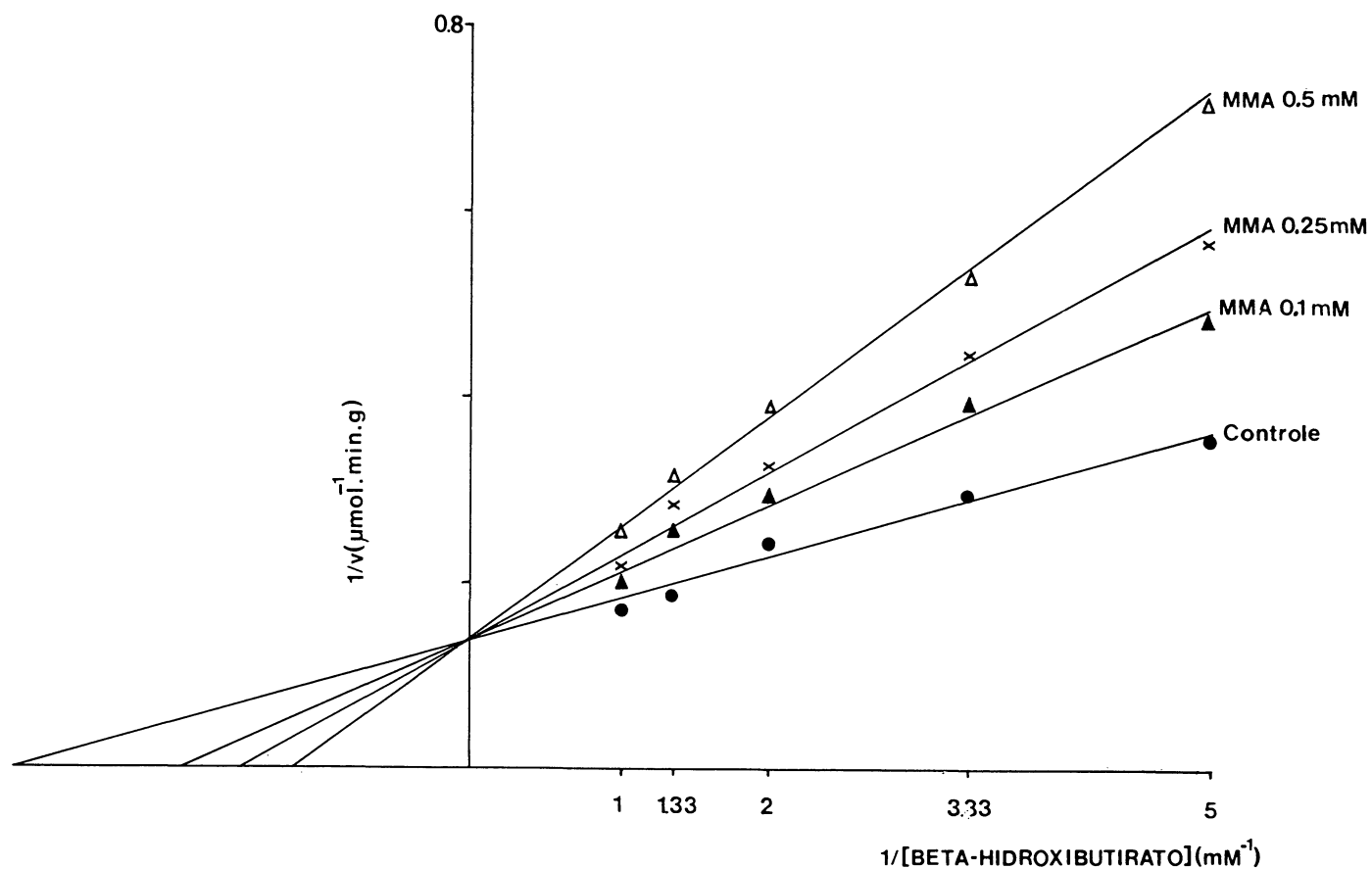


FIGURA III.10 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER E BURK PARA DETERMINAÇÃO DO TIPO DE INIBIÇÃO CAUSADA PELO MMA SOBRE A BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS ITEM 11.2.6.6.2. PG 57

MMA foi utilizado nas concentrações de 0,1mM - 0,25mM e 0,5mM e as concentrações de substrato utilizadas para cada curva de MMA e para a curva controle foram: 0,2mM - 0,3mM - 0,5mM - 0,75mM e 1mM. Foram feitas uma curva controle e uma curva para cada concentração de MMA, todas realizadas em triplicata. O melhor de três experimentos está representado na figura III.10.

#### III.8.7. Determinação do $K_i$ do metilmalonato para a beta-hidroxibutirato desidrogenase

##### III.8.7.1. Determinação do $K_i$ para a beta-hidroxibutirato desidrogenase em cérebro de ratos

De acordo com a representação gráfica de Dixon, a constante de inibição ( $K_i$ ) para o MMA em relação à beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro de ratos de 15 dias de vida foi calculada em 0,015mM (figura III.11).

Os dados para o cálculo do  $K_i$  foram retirados dos experimentos realizados para determinação do tipo de inibição causada pelo MMA sobre a enzima de cérebro e um experimento típico realizado em triplicata é o que está representado na figura III.11.

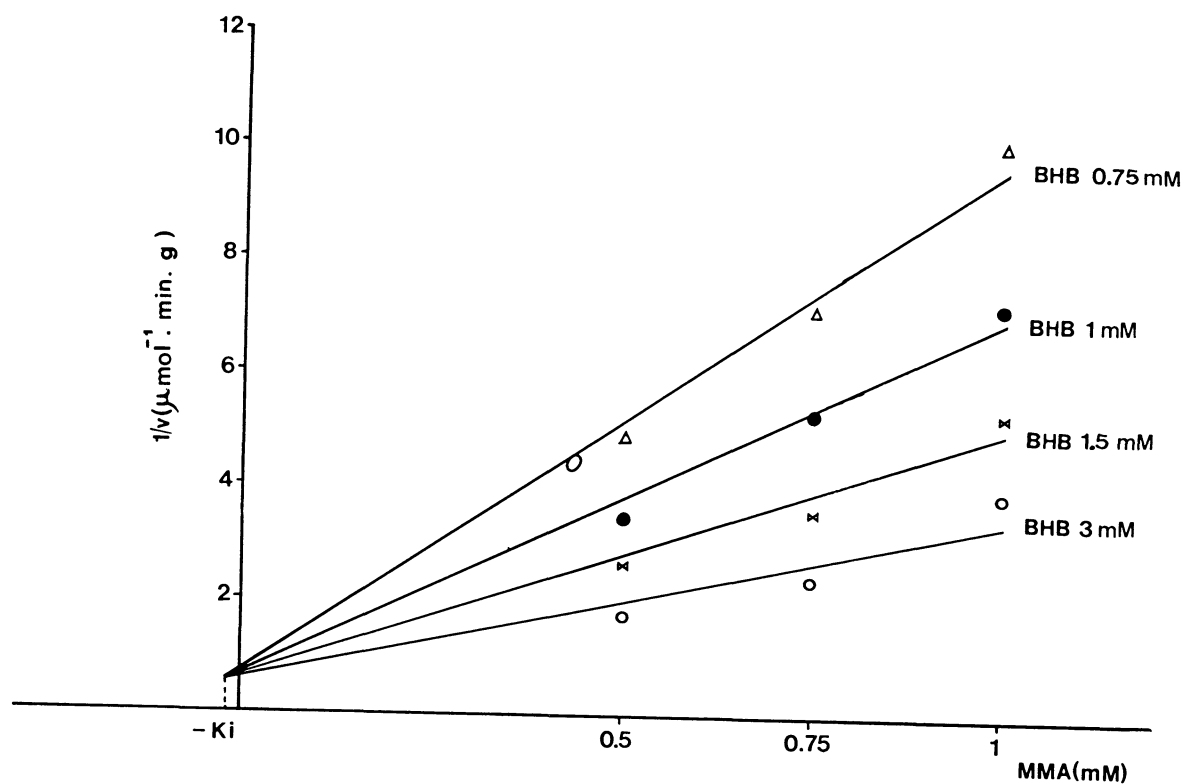


FIGURA III.11 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE DIXON PARA DETERMINAÇÃO DO  $K_i$  PARA O MMA SOBRE A ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE CÉREBRO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. BHB = BETA-HIDROXIBUTIRATO. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS ITEM 11.2.6.6.2. PG 57

#### III.8.7.2. Determinação do $K_i$ para a beta-hidroxibutirato desidrogenase em fígado de ratos

O MMA possui uma constante de inibição ( $K_i$ ) para a beta-hidroxibutirato desidrogenase de fígado de ratos de 15 dias de vida, calculada de acordo com a representação gráfica de Dixon, de 0,275mM.

A figura III.12 apresenta a representação gráfica de Dixon de um experimento típico realizado em triplicata. Estes cálculos foram feitos com os mesmos dados utilizados para a determinação do tipo de inibição causada pelo MMA sobre a beta-hidroxibutirato desidrogenase hepática.

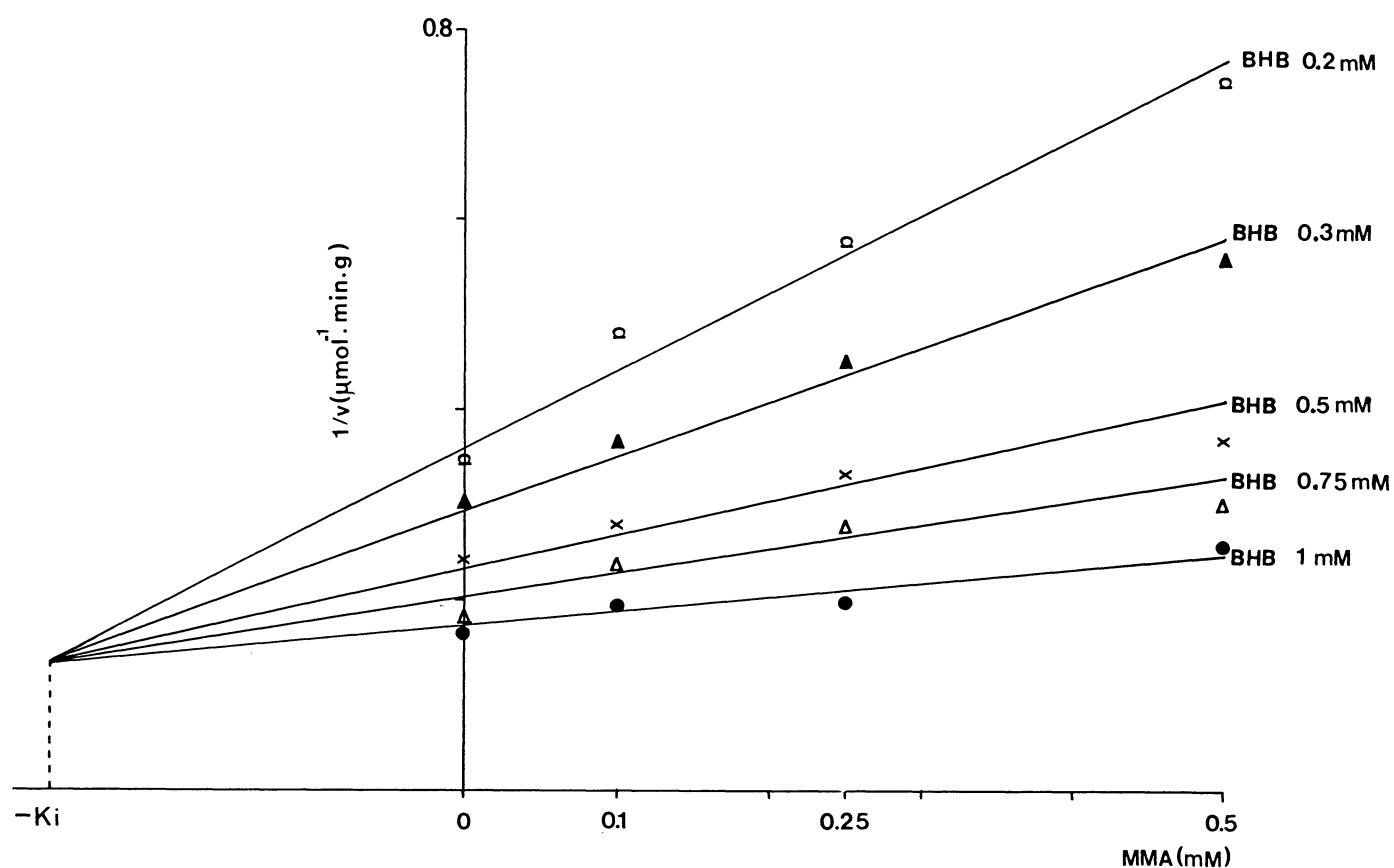


FIGURA III.12 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE DIXON PARA DETERMINAÇÃO DO  $K_i$  PARA O MMA SOBRE A ATIVIDADE DA BETA-HIDROXIBUTIRATO DESIDROGENASE DE FÍGADO DE RATOS COM 15 DIAS DE VIDA, EM JEJUM. BHB = BETAHIDROXIBUTIRATO. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS CONFORME DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS ITEM 11.2.6.6.2. PG 57

#### IV. DISCUSSÃO

O desenvolvimento do sistema nervoso central do rato se inicia antes do nascimento e se completa durante o período pós-natal. A maior parte do processo de maturação ocorre entre o 6<sup>o</sup> e o 29<sup>o</sup> dia de vida, envolvendo a diferenciação dos neurônios e a proliferação de dendritos, axônios e sinapses (Spence e Wolfe, 1967). Como o sistema nervoso central é composto por vários órgãos, cada um com diferentes tipos de células, as quais possuem funções distintas, o padrão de desenvolvimento é específico para cada região (Winick, 1970).

A proliferação neuronal acontece principalmente durante a última semana de gestação do rato, estando a neurogênese praticamente completa no segundo dia de vida pós-natal (Dobbing, 1968; Dobbing e Sands, 1973). Nos seres humanos esta proliferação atinge um pico máximo ao redor da 26<sup>a</sup> semana de gestação sendo seguida pela proliferação das células gliais cujo pico se dá ao nascer (Dobbing e Sands, 1973). Após o nascimento a proliferação celular nos seres humanos continua em velocidade lenta e cessa aproximadamente aos 6 meses de idade. Já a proliferação das células gliais no rato ocorre paralelamente à síntese de mielina, que se dá durante o primeiro mês de vida (Robain e Ponsot, 1978), iniciando-se dos 10 aos 15 dias (Winick, 1970) e atingindo um pico de velocidade de síntese ao redor dos 20 dias de vida (Norton e Poduslo, 1973). Este processo é comparável à

síntese de mielina que ocorre no cérebro humano ao redor do nascimento e se estende até os dois anos de idade (Zamenhof et al., 1968).

O processo de transmissão nervosa se dá através de sinapses entre os neurônios. A sinaptogênese, no cérebro do rato, também acontece pós-natalmente. Aghajanian e Bloom (1967) demonstraram que este processo ocorre principalmente entre a 2a. e a 4a. semana de vida e que o cérebro do rato recém nascido contém menos de 10% dos contatos sinápticos do adulto. A eficiência deste processo parece estar intimamente relacionada com o desempenho mental (Cragg, 1972).

A escolha de ratos de 15 dias de idade para esse estudo deveu-se a diversos fatores. É sabido que animais jovens possuem a barreira hematoencefálica mais permeável a metabólitos que se acumulam nos tecidos dos pacientes afetados por vários EIM e que provocam lesões neurológicas em fase precoce do desenvolvimento pós-natal. Tal asserção tem sido utilizada no tratamento o mais precocemente possível destas doenças (Hommes et al., 1982). Como o objetivo principal desta investigação foi estudar o efeito do MMA e do PA, que se acumulam na metilmalonicacidemia, sobre alguns passos do metabolismo intermediário cerebral, tal estudo seria mais adequadamente realizado em animais jovens em pleno desenvolvimento de seu sistema nervoso central.

Além disso, como o cérebro de ratos de 15 dias de idade utiliza quantidades aproximadamente iguais de glicose

e de corpos cetônicos para suas necessidades energéticas e de biossíntese (Gremer e Heath, 1974) a investigação foi iniciada pelo estudo da utilização desses compostos pelo tecido cerebral.

Os parâmetros bioquímicos foram analisados em ratos em jejum, uma vez que crianças com metilmalonicacidemia não se alimentam adequadamente, pois a acidose metabólica provoca anorexia, náuseas e vômitos e isso se torna mais evidente durante as agudizações dessa doença. Dessa forma, o estudo em ratos em jejum, aproxima-se mais das características metabólicas encontradas na metilmalonicacidemia humana.

Foi estudada inicialmente a utilização de glicose por prismas de cérebros. A glicose atravessa as membranas celulares através de um sistema de transporte exclusivo para hexoses (Oldendorf, 1980). Sua captação é o primeiro passo para que ela seja utilizada dentro do cérebro de modo a produzir energia ou entrar em outras rotas metabólicas.

A maioria (80 a 90%) da glicose consumida pelo cérebro é utilizada como combustível energético (Sokoloff, 1989). Os outros 10 a 20% captados por este órgão podem seguir outras rotas metabólicas como o Ciclo das Pentoses (cerca de 2 a 3% da glicose consumida) que está com sua velocidade reduzida no cérebro de um rato adulto. Em cérebros de ratos em desenvolvimento, esta via está com sua velocidade aumentada, atingindo um pico durante a mielinização, de modo a produzir NADPH para a síntese de lipídios (Seisjo, 1978). A glicose também pode seguir outros caminhos no cérebro, mas a sua contribuição exata para estas vias ainda não está bem



definida. Já foi demonstrado por Bradford (1986) que a quantidade de glicose marcada incorporada em  $^{14}\text{CO}_2$  é bem menor do que o esperado, pois uma grande parte deste composto é transferido para aminoácidos relacionados ao Ciclo de Krebs e para outros constituintes químicos do cérebro. Grandes "pools" de glutamato, aspartato, ácido gama aminobutírico (GABA), glutamina e alanina são formados a partir de glicose como resultado da alta atividade das transaminases (Bradford, 1986).

O MMA adicionado ao meio de incubação aumentou significativamente a captação de glicose pelo cérebro de ratos em jejum. Este efeito foi também verificado quando o metabólito era administrado subcutaneamente aos animais e não foi verificado quando PA foi adicionado ao meio de incubação demonstrando ser um efeito específico do MMA.

Como o MMA não utiliza o mesmo sistema de carreadores que a glicose (Halperin et al., 1971), o efeito não poderia estar ligado à entrada de glicose no cérebro, mas sim a uma influência do mesmo sobre o metabolismo da glicose. A glicose que entra no cérebro é utilizada, principalmente, para produção de energia, ou seja, cerca de 80 a 90% da glicose captada é oxidada pela via glicolítica até  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  e outros 10% a 20% utilizados em outras rotas, incluindo o Ciclo das Pentoses, produção de lipídios, etc (Sokoloff, 1989). O fato do MMA estar aumentando a captação de glicose por cérebro de ratos em jejum poderia estar relacionado, portanto, com uma ou mais das seguintes hipóteses: (a) há

uma necessidade maior de energia e o MMA está ativando a via glicolítica aumentando assim o influxo de substrato (glicose); (b) MMA está ativando o Ciclo das Pentoses aumentando o influxo de glicose para o mesmo; (c) MMA está ativando a glicólise anaeróbica e inibindo a aeróbica, aumentando assim a taxa de formação de lactato, o que justificaria um maior influxo de glicose para o cérebro para compensar a baixa produção de energia dessa via; (d) o MMA está ativando a biossíntese de lipídios a partir de glicose e (e) o MMA está ativando outras rotas alternativas (síntese de aminoácidos, neurotransmissores, etc).

É pouco provável que a ativação de rotas alternativas pelo MMA iria se refletir em um aumento considerável do consumo de glicose pelo cérebro por nós detectado, uma vez que tais vias consomem uma percentagem muito baixa de glicose.

Para testar a hipótese (a), verificamos o efeito do MMA e PA sobre as seguintes enzimas regulatórias da glicólise: hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvatoquinase e para verificar a hipótese (b), foi investigado o efeito dos metabólitos sobre a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase pertencente ao Ciclo das Pentoses.

Verificamos que o MMA não interfere na atividade de nenhuma das enzimas acima mencionadas, o que sugere que o metabólito não ativa a via glicolítica e o Ciclo das Pentoses, pelo menos a nível destas quatro enzimas. O PA também não teve qualquer efeito sobre as enzimas estudadas.

Para verificar o efeito do MMA e PA sobre a glicólise anaeróbica, estudamos a produção de lactato a partir de glicose adicionando ou não os metabólitos ao meio de incubação.

Nossos resultados mostraram que a taxa de produção de lactato a partir de glicose por cérebro de rato está de acordo com o descrito na literatura, isto é, que o tecido cerebral mesmo quando em repouso e bem oxigenado produz lactato que é removido do sangue numa taxa de 5 a 13% do piruvato produzido pela glicólise (Clarke et al., 1989).

Podemos observar, segundo os resultados obtidos, que o MMA aumenta significativamente, em um padrão dose-dependente, a produção de lactato pelo cérebro. O PA, por outro lado, quando adicionado ao meio de incubação, diminui significativamente a liberação de lactato por este órgão.

O PA utiliza como sistema de transporte transmembrana o carreador para ácidos monocarboxílicos, o mesmo utilizado pelo lactato e o piruvato (Steele, 1986). Portanto, é bem possível que tenha havido uma competição entre o PA e o lactato produzido pelo cérebro por sua saída através do carreador dos ácidos monocarboxílicos, o que explicaria as baixas concentrações de lactato no meio de incubação. Conclui-se, então, que o efeito do PA ocorre, muito provavelmente, sobre a liberação de lactato pelo cérebro, uma vez que não modificou a captação de glicose. Já o MMA não age sobre o transporte de lactato, uma vez que este não utiliza o mesmo sistema de transporte que o lactato, mas sim o sistema de transporte para ácidos di e tricarboxílicos

(Halperin et al., 1971) que já está bem desenvolvido no cérebro de ratos jovens (Cremer et al., 1979). Conclui-se que o efeito do MMA detectado nos experimentos deveu-se ao aumento da produção de lactato, refletindo um aumento da glicólise anaeróbica e/ou uma diminuição da glicólise aeróbica o que vem a princípio a favor da hipótese (c).

De posse desses resultados poder-se-ia supor duas alternativas: a primeira em que ambas as vias glicolíticas, aeróbica e anaeróbica, estariam ativadas pelo MMA e a segunda que a via glicolítica aeróbica estivesse inibida e a anaeróbica ativada como reflexo da diminuição de produção de energia.

A glicólise anaeróbica provavelmente não está diretamente ativada, já que as enzimas marcapassos hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvatoquinase não aumentaram sua atividade na presença de MMA. Portanto, a ativação da via glicolítica anaeróbica seria indireta como resultado da inibição de alguma enzima do Ciclo de Krebs ou da própria cadeia respiratória por MMA.

O MMA é um composto análogo ao succinato e ao malonato, este último sabidamente um inibidor competitivo da succinato desidrogenase (Thorn, 1953), considerado como exemplo clássico deste tipo de inibição. Considerando a semelhança estrutural entre estes três compostos, decidiu-se testar o efeito do MMA sobre esta enzima.

Os dados indicaram, em cérebro de ratos em jejum, uma inibição significativa *in vitro* da atividade da succinato

desidrogenase por MMA, mas não por PA. Estes dados foram reforçados quando MMA foi administrado subcutaneamente aos animais.

A inibição específica *in vitro* e *in vivo* da atividade da succinato desidrogenase de cérebro de ratos causada por MMA vem ao encontro dos resultados anteriores, reforçando a hipótese de que a velocidade do Ciclo de Krebs possa estar diminuída por efeito deste metabólito.

O PA não exerceu efeito sobre a succinato desidrogenase de cérebro de ratos em jejum o que está de acordo com os resultados sobre a captação de glicose.

A inibição da succinato desidrogenase por malonato é do tipo competitivo e o mesmo tipo de inibição foi verificado para o MMA com um valor de  $K_i$  de 4,5mM. Os níveis de MMA encontrados no cérebro pós-morte e no líquido céfalo-raquidiano de crianças com metilmalonicacidemia são aproximadamente da ordem de 1 mM (Patel et al., 1976) e 2,5 mM (Rosenberg e Fenton 1989), respectivamente. Considerando que os níveis cerebrais de succinato e MMA são da mesma ordem de magnitude (Goldberg et al., 1966) e que 1 mM de MMA provoca uma inibição significativa na atividade da succinato desidrogenase cerebral (53%) *in vitro*, pode-se inferir que a ação inibitória do MMA encontrada neste trabalho pode ser de importância fisiológica, podendo trazer sérias consequências para o metabolismo energético deste tecido.

Foi estudado ainda o efeito do MMA e PA sobre a atividade da succinato desidrogenase hepática para se

verificar se o efeito do MMA identificado no cérebro, também ocorria em outro tecido onde a enzima apresenta alta atividade. Desta forma poder-se-ia distinguir um efeito específico do tecido nervoso de um mais abrangente.

A succinato desidrogenase de fígado de animais em jejum também mostrou-se inibida por MMA quando este metabólito foi adicionado ao meio de incubação ou quando foi administrado aos animais. O PA, assim como no cérebro, não teve nenhum efeito sobre a atividade dessa enzima. O tipo de inibição causada pelo MMA na enzima hepática também foi competitivo. Portanto, também nesse órgão foi detectado um efeito específico do MMA, similar aquele verificado no tecido cerebral.

A hipoglicemia encontrada nos pacientes com metilmalonicacidemia tem sido explicada em função de um decréscimo na gliconeogênese devido à inibição da piruvato carboxilase por MMCoA, precursor do MMA (Utter, 1970), e pela inibição do transporte de malato pela membrana mitocondrial (Halperin et al., 1971). Os resultados presentes mostram que concentrações de 2,5 mM de MMA já causam uma inibição substancial e significativa (20%) da atividade da succinato desidrogenase hepática. Tendo por base esse achado, propõe-se uma explicação adicional para a hipoglicemia da metilmalonicacidemia, ou seja, que o bloqueio parcial da conversão de succinato a fumarato pelo MMA no fígado pode reduzir a formação de glicose pela diminuição de ATP e de intermediários do Ciclo de Krebs para

a gliconeogênese.

A importante inibição na atividade da succinato desidrogenase causada pelo MMA (bloqueio do Ciclo de Krebs) poderia explicar as elevadas taxas de lactato produzidas nos experimentos. Entretanto, existem outras alternativas, não testadas neste trabalho, que também poderiam explicar o aumento na produção de lactato, como um aumento na atividade da lactato desidrogenase ou uma inibição da atividade da piruvato desidrogenase por MMA.

A etapa seguinte constituiu-se na verificação da ação do MMA sobre a produção de  $\text{CO}_2$  a partir de glicose e acetato radioativos, considerando-se que caso a inibição causada pelo MMA sobre a succinato desidrogenase fosse significativamente importante, uma das consequências seria a diminuição da formação de  $\text{CO}_2$  pelo Ciclo de Krebs.

Quando foram incubados prismas de cérebro de ratos em jejum com glicose e acetato marcado na presença de MMA, foi verificada uma diminuição significativa na formação de  $\text{CO}_2$  marcado a partir dos dois substratos, mas com um efeito mais marcante a partir de acetato. Essa observação reforça a hipótese de que o MMA provoca uma inibição do Ciclo de Krebs e está de acordo com os dados obtidos anteriormente. Em outras palavras, uma parcela maior do piruvato é convertida a lactato, não sendo oxidada no Ciclo de Krebs.

O propionato, quando incubado em um meio contendo glicose marcada não teve efeito sobre a formação de  $\text{CO}_2$  a partir deste composto, confirmando os dados anteriores, mas quando acetato marcado foi adicionado ao meio de incubação,

houve uma diminuição significativa na formação de  $\text{CO}_2$  por prismas de cérebro de ratos em jejum. O mesmo foi observado nos experimentos de Patel et al. (1976) quando incubaram cérebro de ratos de 7 dias de vida alimentados em um meio contendo PA e acetato marcado. Uma vez que acetato e PA utilizam o mesmo sistema de transporte de membranas (carreador de ácidos monocarboxílicos), a inibição da entrada de acetato marcado nas células nervosas pelo PA por competição poderia explicar os níveis mais baixos de  $\text{CO}_2$  marcado formado pelos prismas de cérebro. Uma outra possibilidade seria a formação de PCoA a partir de PA, reduzindo assim a disponibilidade de coenzima A para a síntese de acetil-CoA a partir de acetato. É bastante provável que tal fato não ocorra com o MMA, pois não há nenhuma evidência na literatura demonstrando a transformação de MMA em MMCoA em seres vivos.

Os dados até aqui discutidos permitem concluir que o MMA possui um efeito inibitório sobre a enzima succinato desidrogenase, diminuindo, portanto, a velocidade do Ciclo de Krebs, afetando indiretamente a oxidação total da glicose e aumentando sua captação. Já o PA poderia competir com outros ácidos monocarboxílicos como o acetato e o lactato, pela entrada no neurônio ou alternativamente reduzir a disponibilidade de coenzima A, afetando a produção de energia a partir daqueles compostos. Ambos os efeitos poderiam ter sérias consequências sobre a produção de energia para a célula nervosa.



O próximo passo na investigação foi dirigido para o estudo do efeito dos metabólitos, MMA e PA, sobre a biossíntese de lipídios cerebrais a partir de glicose ou acetato em cérebro de ratos em jejum.

O PA não teve efeito sobre a síntese de lipídios quando glicose marcada foi adicionada ao meio de incubação, mas o mesmo não ocorreu quando o composto radioativo foi o acetato. Provavelmente por um efeito de competição com o acetato pelo carreador de membrana o PA inibe a síntese de lipídios a partir deste composto no cérebro de ratos em jejum. Estes resultados confirmam os de Patel et al. (1976) com cérebro de ratos de 7 dias de vida quando incubados com PA e acetato marcado.

O MMA, adicionado ao meio de incubação, por outro lado, provocou a redução da síntese de lipídios totais a partir de acetato por cérebro de ratos em jejum.

A inibição da biossíntese de lipídios por MMA no cérebro de ratos a partir de acetato marcado observada no presente trabalho não foi verificada por Patel et al. (1976) com cérebro de ratos de 7 dias de vida alimentados. Entretanto, vários trabalhos demonstraram que metabólitos acumulados na metilmalonicacidemia afetam a síntese lipídica. Em 1970, Cardinale et al., demonstraram que MMCoA inibe a incorporação de acetil-CoA e malonil-CoA em ácidos graxos de fígado de ratos e que MMCoA pode ser incorporada nas posições não terminais dos ácidos graxos resultando em ácidos graxos saturados e ramificados. Frenkel et al. (1973) demonstraram que MMCoA inibe a acetil-CoA carboxilase e a

ácido graxo sintase de fígado e tecido nervoso de ratos e mais tarde Wahle et al. (1984) verificaram a inibição da ácido graxo sintase por MMCoA em glândula mamária de bovinos. Portanto, é possível que resultados presentes, demonstrando um efeito inibitório evidente do MMA sobre a síntese de lipídios cerebrais, possam ser explicados em termos de efeitos análogos do MMA aos da MMCoA descritos anteriormente. É possível que outros fatores sejam responsáveis pela redução da síntese lipídica provocada pelo MMA, tais como inibição do transporte de citrato através da mitocôndria por competição com MMA, diminuição na formação de citrato e disponibilidade reduzida de ATP devida ao bloqueio no Ciclo de Krebs provocado pelo MMA, para a produção de ácidos graxos.

A diminuição da síntese de lipídios cerebrais pelo MMA pode estar interferindo com o processo de mielinização, que inicia, no rato, entre os 10 e 15 dias de vida (Norton e Poduslo, 1973). Como, na criança, este processo ocorre até aproximadamente os 8 anos de idade, um aumento considerável dos metabólitos acumulados na metilmalonicacidemia durante este período poderia estar prejudicando determinadas funções cerebrais.

Durante o período de amamentação os ratos recebem grande quantidade de lipídios do leite materno, os quais são oxidados a corpos cetônicos aumentando assim a cetonemia. A grande disponibilidade de corpos cetônicos para o cérebro do rato, como combustível energético, gera uma maior

capacidade do cérebro dos animais em desenvolvimento para metabolizar estes substratos quando comparado com o cérebro de animais adultos (Hawkins et al., 1971; Itoh e Quastel, 1970).

O estudo da influência do MMA e do PA sobre a captação e oxidação dos corpos cetônicos pelo cérebro de ratos de 15 dias de vida, que utilizam igualmente glicose e corpos cetônicos para o seu metabolismo, torna-se, portanto, importante.

O MMA quando adicionado ao meio de incubação contendo prismas de cérebro de rato, não provocou efeito sobre a captação de acetoacetato, enquanto o efeito do PA foi evidente, inibindo a utilização deste substrato. Já que PA e corpos cetônicos utilizam o mesmo sistema de transporte pela membrana celular, é provável que a redução na incorporação do acetoacetato seja devida à competição entre acetoacetato e PA pelo mesmo carreador de membrana (Steele, 1986). Por outro lado, a falta de ação do MMA sobre a utilização desse substrato reforça o conceito de que o MMA não utiliza o carreador de membrana para ácidos monocarboxílicos.

Já a captação de beta-hidroxibutirato diminui significativamente devido à presença do MMA e do PA adicionados ao meio de incubação. A inibição na captação de beta-hidroxibutirato pelo MMA não é devida à competição pelo carreador de membrana, uma vez que os dois ácidos possuem sistemas de transporte diferentes.

Uma explicação para tal achado pode estar relacionada com uma taxa reduzida de utilização do beta-hidroxibutirato

pelo cérebro para suas necessidades metabólicas. Patel et al. (1976), incubando cérebro de ratos de 7 dias de vida com beta-hidroxibutirato marcado e MMA observaram uma considerável diminuição na formação de  $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ , o mesmo não ocorrendo quando o composto marcado foi o acetoacetato. Os pesquisadores sugeriram que poderia estar havendo uma inibição na conversão de beta-hidroxibutirato a acetoacetato diminuindo assim sua oxidação até  $\text{CO}_2$ . A hipótese não pode ser confirmada pois os autores não estudaram o metabolismo do beta-hidroxibutirato no cérebro destes animais.

Um efeito inibitório do MMA sobre a enzima beta-hidroxibutirato desidrogenase foi detectado em preparação mitocondrial de fígado de porco e coração de rato, porco e boi, em 1975 por Tan et al.. Este achado indica que a hipótese de Patel et al. (1976) sobre uma possível inibição da conversão de beta-hidroxibutirato a acetoacetato é correta. Para verificar, entretanto, a veracidade desta hipótese, mediu-se a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase na presença de MMA ou PA, em cérebro e fígado de ratos.

Quanto à ação do MMA e PA sobre a enzima propriamente dita, foi observado que, por um lado, o PA não inibe a enzima em nenhum dos dois órgãos, mas o mesmo não ocorre com o MMA. Este último, quando adicionado ao meio de incubação, inibe significativamente a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro e fígado de ratos em jejum. Quando administrado aos animais, o efeito inibitório do MMA sobre a

enzima foi confirmado tanto no cérebro como no fígado. Portanto, demonstramos pela primeira vez uma inibição *in vitro* e *in vivo* da enzima beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro de ratos causada pelo principal metabólito que se acumula na metilmalonicacidemia.

O próximo passo da investigação foi determinar o tipo de inibição causado pelo MMA.

Verificou-se que a inibição da beta-hidroxibutirato desidrogenase pelo MMA é do tipo competitivo em ambos os órgãos analisados, o que está de acordo com os dados de Tan et al. (1975) que também demonstraram que o MMA inibe competitivamente a beta-hidroxibutirato desidrogenase de fígado de porco e coração de rato, porco e boi. O  $K_m$  encontrado para a beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro (1,26mM) está de acordo com o verificado por Benavides et al. (1976) para o mesmo órgão, 1,20mM. Esta inibição causada pelo MMA explica, portanto, a diminuição da captação de beta-hidroxibutirato pelo cérebro na presença de MMA. A inibição da enzima hepática explica os níveis mais baixos de beta-hidroxibutirato no sangue dos mesmos animais tratados com MMA. Tais achados estão de acordo com os estudos de Kolvraa et al. (1980) que observaram que durante as crises, em pacientes com metilmalonicacidemia os níveis elevados de corpos cetônicos decrescem simultaneamente com o aumento dos níveis de MMA, sugerindo portanto, uma inibição da beta-hidroxibutirato desidrogenase hepática pelo metabólito.

Outro dado relevante no trabalho foi a quantidade de

acetoacetato e beta-hidroxibutirato captada pelo cérebro. Ambos os corpos cetônicos foram igualmente incorporados, demonstrando que o cérebro, na ausência da barreira hematoencefálica que se perde na preparação dos prismas, não possui preferência por qualquer destes substratos. Wiener et al. (1971) e Pearson et al. (1972) mostraram que o acetoacetato entra mais livremente no cérebro intacto, isto é, com a barreira, do que o beta-hidroxibutirato. Como isto não ocorreu no presente trabalho, é possível que a taxa de extração dos corpos cetônicos do sangue seja controlada pela barreira hematoencefálica.

Estes achados vêm mais uma vez reforçar que o metabolismo cerebral está prejudicado na presença de MMA ou PA em ratos de 15 dias de vida. Caso a extrapolação dos dados para os seres humanos seja válida, pode-se deduzir que o efeito destes metabólitos sobre o metabolismo cerebral em uma fase onde predomina o desenvolvimento acelerado do sistema nervoso central, possivelmente poderá levar a graves danos neurológicos como os encontrados por Shuman et al. (1978), Korf et al. (1986), Heidenreich et al. (1988), Lindenbaum et al. (1988), de Sousa et al. (1989) e Roodhooft et al. (1990) na metilmalonicacidemia humana.

As concentrações de MMA encontradas no sangue e no líquido céfalo-raquidiano, 2,5 mM (Rosenberg e Fenton, 1989) e no cérebro pós-móten, aproximadamente 1mM (Patel et al., 1976) dos pacientes com metilmalonicacidemia e a concentração plasmática de PA, 5,4 mM, dos pacientes com

propionicacidemia (Rosenberg e Fenton, 1989), foram, as mesmas utilizadas no presente estudo e todas produziram algum efeito significativo sobre a captação, seja por competição com o carreador (PA) ou não (MMA), ou sobre a oxidação de um importante nutriente energético do cérebro. Em vista disto, é provável que os resultados presentes possam ser relevantes ao entendimento das alterações bioquímicas que levam à disfunção neurológica na metilmalonicacidemia e também na propionicacidemia, bem como possam contribuir para o entendimento das alterações que levam à hipoglicemia na metilmalonicacidemia.

## V. CONCLUSÕES

1. O MMA aumenta a captação de glicose em cérebro de ratos com 15 dias de vida, em jejum enquanto o PA não afeta a mesma.

2. Tanto o MMA quanto o PA não interferem na atividade das enzimas hexoquinase, fosfofrutoquinase, piruvato quinase e glicose-6-fosfato desidrogenase de cérebro de ratos com 15 dias de vida, em jejum.

3. O MMA aumenta enquanto o PA diminui a produção de lactato por cérebro de ratos com 15 dias de vida, em jejum.

4. O MMA inibe competitivamente a succinato desidrogenase de cérebro e fígado de ratos com 15 dias de vida, em jejum, enquanto o PA não exerce efeito sobre a atividade desta enzima.

5. O MMA diminui a produção de  $\text{CO}_2$  tanto a partir de glicose quanto de acetato por cérebro de ratos com 15 dias de vida, em jejum, enquanto o PA diminui somente a partir de acetato.

6. O MMA e o PA diminuem a síntese de lipídios por cérebro de ratos com 15 dias de vida, em jejum.

7. O MMA diminui a captação de beta-hidroxibutirato por cérebro de ratos com 15 dias de vida, em jejum, mas não a de acetoacetato, enquanto o PA diminui a captação de ambos corpos cetônicos.



8. O MMA inibe competitivamente a atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase de cérebro e fígado de ratos com 15 dias de vida, em jejum, enquanto o PA não exerce efeito significativo sobre a atividade desta enzima.

9. Os resultados expostos neste trabalho pressupõem uma reduzida oxidação dos nutrientes essenciais para o metabolismo energético cerebral (glicose e corpos cetônicos) e diminuição na síntese lipídica causados por MMA ou PA durante a fase de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central, o que poderia acarretar danos irreparáveis a este tecido.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABHAJANIAN, G.K. ; BLOOM, F.E. The formation of synaptic junctions in developing rat brain: a quantitative electron microscopic study. Brain Res., Amsterdam, v.6, p. 716-726, 1967.
2. ANDO, T. et ali. Isolation and identification of methylcitrate, a major metabolic product of propionate in patients with propionic acidemia. J. Biol. Chem., Baltimore, v.247, p. 2200-2204, 1972.
3. ARINZE, I.J.; WATERS, D.; DONALDSON, M.K. Effect of methylmalonic acid on gluconeogenesis in isolated rat and guinea-pig hepatocytes. Biochem. J., London, v.184, p. 717-719, 1979.
4. ARIZMENDI, C. ; MEDINA, J.M. Lactate as an oxidizable substrate for rat brain in vitro during de perinatal period. Biochem. J., London, v.214, p. 633-635, 1983.
5. BAILEY, L.B. et al. Streptozotocin-induced diabetes is not a model for methylmalonic acidemia. J. Inherited Metab. Dis., Lancaster, v.12, p. 429-435, 1989.
6. BARNES, L.A.; YOUNG, D.G.; NOCHO, R. Methylmalonate excretion in vitamin B<sub>12</sub> deficiency. Science, Washington DC, v.140, p. 76-77, 1963.

7. BEADLE, G.W. ; TATUM, E.L. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Washington DC, v.27, p. 499-503, 1941.
8. BEAUDET, A.L. et al. Genetics and biochemistry of variant human phenotypes. In: SCRIVER, C.R. et al., eds. The metabolic basis of inherited disease. 6. ed. New York: McGraw-Hill, 1989. p. 3-53.
9. BENAVIDES, J. et al. Effect of phenylalanine metabolites on the activities of enzymes of ketone-body utilization in brain of suckling rats. Biochem. J., London, v.160, p. 217-222, 1976.
10. BENSON, P.F. ; FENSOM, A.H. Genetic biochemical disorders. Oxford: Oxford University Press, 1985. 692 p.
11. BHATT, H.R. ; LINNEL, J.C. Induction of methylmalonic aciduria with streptozotocin: a possible experimental model for the study of methylmalonic acidemia. J. Inherited Metab. Dis., Lancaster, v.6, p. 119-120, 1983.
12. BLISS, C.I. Statistics in biology. Statistical methods for research in the natural sciences. New York: McGraw-Hill, 1967. v.1.
13. BREMER, T. ; BREMER, J. Propionylcarnitine. Physiological variations in vivo. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v.152, p. 559-567, 1968.

14. BOOTH, R.F.G.; PATEL, T.B.; CLARK, J.B. The development of enzymes of energy metabolism in the brain of a precocial (guinea pig) and non-precocial (rat) species. J. Neurochem., New York, v.34, p. 17-25, 1980.
15. BRADFORD, H.F. chemical neurobiology: an introduction to neurochemistry. New York: W.F. Freeman and Company, 1986. 507 p.
16. BRASS, E.P. et al. Effect of hydroxycobalamin[ $\gamma$ -lactam] on propionate and carnitine metabolism in the rat. Biochem. J., London, v.266, p. 809-815, 1990.
17. CARDINALE, G.J. et al. Experimental vitamin B<sub>12</sub> coenzyme levels and on the metabolism of methylmalonyl-CoA. Arch. Biochem. Biophys., Duluth, MN, v.131, p. 92-99, 1969.
18. CARDINALE, G.J.; CARTY, T.J.; ABELES, R.H. Effect of methylmalonyl coenzyme A, a metabolite which accumulates in vitamin B<sub>12</sub> deficiency, on fatty acid synthesis. J. Biol. Chem., Baltimore, v.245, p. 3771-3775, 1970.
19. CHALMERS, R.A. et al. Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. J. Inherited Metab. Dis., Lancaster, v.3, p. 27-44, 1980.

20. CHALMERS, R.A. ; LAWSON, A.M. Organic acids in man, Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias. London: Chapman & Hall, 1982. 523 p.
21. CHEMA-DADHLI, S.; LEZNOFF, C.C.; HALPERIN, M.L. Effect of 2-methylcitrate on citrate metabolism: implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic aciduria. Pediatr. Res., Baltimore, v.9, p. 905-908, 1975.
22. CLARKE, D.D.; LAJTHA, A.L.; MAKER, H.S. Intermediary metabolism. In: SIEGEL, G. et al., eds. Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. 4 ed. New York: Raven Press, 1989. p. 541-564.
23. COTMAN, C.W. ; PETERSON, C. Aging in the nervous system. In: SIEGEL, G. et al., eds. Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. 4 ed. New York: Raven Press, 1989. p. 523-540.
24. COUDE, F.X.; SWEETMAN, L.; NYHAN, W.L. Inhibition by propionyl-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. J. Clin. Invest., New York, v.64, p. 1544-1551, 1979.
25. CRAGG, B.G. The developmental of cortical synapses during starvation in the rat. Brain, Eynsham, v.95, p. 143-50, 1972.

26. CRANE, S.C. ; MORGAN, B.L.G. The effect of alterations in ketone body availability on the utilization of hydroxybutyrate by developing rat brain. J. Nutr., Bethesda, MD, v.113, p. 1063-1072, 1983.
27. CREMER, J.E. Nutrients for the brain: problems in supply. Early Hum. Dev., Limeriki, v.5., p. 117-132, 1981.
28. CREMER, J.E. ; HEATH, D.F. The estimation of rates of utilization of glucose and ketone bodies in the brain of the suckling rat using compartmental analysis of isotopic data. Biochem. J., London, v.142, p. 527-544, 1974.
29. CREMER, J.E. et al. Kinetics of blood-brain barrier transport of pyruvate, lactate and glucose in suckling, weanling and adult rats. J. Neurochem., New York, v.33, p. 439-445, 1979.
30. CUEZVA, J.M. et al. Prematurity in the rat. I. Fuels and gluconeogenic enzymes. Biol. Neonate, Basel, v.37, p.88-95, 1980.
31. De SOUZA, C. et al. Focal changes in the globi pallidi associated with neurological dysfunction in methylmalonic acidemia. Neuropediatrics, Louvain, v.20, p. 199-201, 1989.
32. DI DONATO, S. et al. Propionylcarnitine excretion in propionic and methylmalonic acidurias: a cause of carnitine deficiency. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, v.139, p.13-21, 1984.

33. DYMZA, H.A.; CZAJKA, D.M.; MILLER, S.A. Influence of artificial diet on weight gain and body composition of neonatal rat. J. Nutr., Bethesda, MD, v.84, p.100-106, 1964.
34. DOBBING, J. The influence of early nutrition on the development and myelination of the brain. Proc. R. Soc. London, v.159, p.503-509, 1964.
35. DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: DAVISON, A.N. ; DOBBING, J., eds. Applied neurochemistry. Oxford: Blackwell, 1968. p. 287-316.
36. DOBBING, J. ; SANDS, J. Quantitative growth and developing of human brain. Arch. Dis. Child., London, v.48, p.757-767, 1973.
37. DUTRA, J.C. Efeito da administração crônica de metilmalonato no período pós-natal sobre o comportamento de ratos adultos submetidos a testes aversivos e não aversivos. Porto Alegre, 1987. 102 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do rio grande do Sul.
38. DUTRA, J.C. et al. Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. Braz. J. Med. Biol. Res., São Paulo, v.24, p. 595-605, 1991.
39. ESCRIVÁ, F.; RODRÍGUEZ, C.; PASCUAL-LEONE, A.M. Glycemia, ketonemia and brain enzymes of ketone body utilization in suckling and adult rats undernourished from intrauterine life. J. Neurochem., New York, v.44, p.1358-1362, 1985.

40. FENSOM, A.H. et al. Experience with prenatal diagnosis of propionic acidemia and methylmalonic acidemia. J. Inherited Metab. Dis., Lancaster, v.7, p. 127-128, 1984.
41. FERNANDEZ, E. ; MEDINA, J.M. Lactate utilization by the neonatal rat brain in vitro. Competition with glucose and 3-hydroxybutyrate. Biochem. J., London, v.234, p.489-492, 1986.
42. FERNANDEZ, E. et al. Postnatal hypoglycaemia and gluconeogenesis in the newborn rat. Delayed onset of gluconeogenesis in prematurely delivered newborns. Biochem. J., London, v.214, p. 525-532, 1983.
43. FOLCH, J. et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., Baltimore, v.22, p.497-509, 1957.
44. FRENKEL, E.P.; KITCHENS, R.L.; JOHNSTON, J.M. The effect of vitamin B<sub>12</sub> deprivation on the enzymes of fatty acid synthesis. J. Biol. Chem., Baltimore, v.248, p. 7540-7546, 1973.
45. GARROD, A.E. Inborn errors of metabolism (cronian lectures). Lancet, Boston, v.2, p. 1, 73, 142, 214, 1908.
46. GERHARDT, M. et al. Methylmalonic aciduria presenting in an adult. J. Inherited Metab. Dis., Lancaster, v.14, p. 113, 1991.
47. GLASGOW, A.M. ; CHASE, H.P. Effect of propionic acid on fatty acid oxidation and ureagenesis. Pediatr. Res., Baltimore. v.10, p. 683-686, 1976.



48. GOLDBERG, N.D.; PASSONEAU, J.V.; LOWRY, O.H. Effects of changes in brain metabolism on the levels of citric acid cycle intermediates. J. Biol. Chem., Baltimore, v.241, p.3997-4003, 1966.
49. GUTMANN, I. ; WAHLEFELD, A.W. L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: BERGMEYER, H.U., ed. Methods of enzymatic analysis. 2 ed. New York: Verlag Chemie Weinheim Acad. Press, 1974. v.3, p. 1464-1468.
50. HALPERIN, M.L.; SCHILLER, C.M.; FRITZ, I.B. The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. J. Clin. Invest., New York, v.50, p. 2276-2282, 1971.
51. HAYASAKA, K. et al. Comparision of cytosolic and mitochondrial enzyme alterations in the livers of propionic or methylmalonic acidemia: a reduction of cytochrome oxidase activity. Iohoku J. Exp. Med., Sendai, v.137, p. 329-334, 1982.
52. HAWKINS, R.A.; WILLIAMSON, D.H.; KREBS, H.A. Ketone body utilization by adult and suckling rat brain in vitro. Biochem. J., London, v.122, p. 13-18, 1971.
53. HEINDENREICH, R. et al. Acute extrapyramidal syndrome in methylmalonic acidemia: "metabolic stroke" involving the globus pallidus. J. Pediatr., St. Louis, v.113, p. 1022-1027, 1988.

54. HERSCHKOWITZ, N. Inborn errors of metabolism affecting brain development. Introduction. In: COCKBURN, F. ; GITZELMANN, R., eds. Inborn errors of metabolism in humans. Lancaster: MTP Pres, 1982. p. 157-160.
55. HERTZ, L. et al. Metabolic relationship between glutamine, glutamate and GABA in the central nervous system. New York: Alan R. Liss, 1983. p. 415-430.
56. HILLMAN, R.E. ; OTTO, E.F. Inhibition of glycine-serine interconversion in cultured human fibroblasts by products of isoleucine catabolism. Pediatr. Res., Baltimore, v.8, p. 941-945, 1974.
57. HOMMES, F.A.; ELLER, A.G.; TAYLOR, E.H. Turnover of the fast component of myelin and myelin protein in experimental hyperphenylalaninemia. Relevance to termination of dietary treatment in human PKU. J. Inherited Metab. Dis., Lancaster, v.5, p. 21-27, 1982.
58. ITOH, T. ; QUASTEL, J.H. Acetoacetate metabolism in infant and adult rat brain in vitro. Biochem. J., London, v.116, p. 641-655, 1970.
59. JONES, C.T. Biochemical development of the fetus and neonate. Amsterdam: Elsevier, 1982. p. 517-551.
60. KOLVRAA, S. et al. Excretion pattern of branched-chain amino acid metabolites during the course of acute infections in a patient with methylmalonic acidemia. J. Inherited Metab. Dis., Lancaster, v.3, p. 63-66, 1980.

61. KORF, B.; WALLMAN, J.K.; LEVY, H. Bilateral lucency of the globus pallidus complicating methylmalonic acidemia. Ann. Neurol., Boston, v.20, p. 364-366, 1986.
62. LAND, J.M. et al. Development of mitochondrial energy metabolism in rat brain. Biochem. J., London, v.164, p. 339-348, 1977.
63. LEDLEY, F.D. et al. Benign methylmalonic aciduria. N. Engl. J. Med., Boston, v.311, p. 1015-1018, 1984.
64. LEONG, S.F. ; CLARK, J.B. Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. Biochem. J., London, v.218, p. 131-138, 1984a
65. LEONG, S.F. ; CLARK, J.B. Regional enzyme development in rat brain. Enzymes of energy metabolism. Biochem. J., London, v.218, p. 139-145, 1984b.
66. LEONG, S.F. et al. Energy metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats. J. Neurochem., New York, v.37, p. 1548-1556, 1981.
67. LEVIN, J. Estatística aplicada a ciências humanas. 2 ed. São Paulo: Harper & Row, 1978. 310 p.
68. LINDENBAUM, J. et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. N. Engl. J. Med., Boston, v.318, p. 1720-1728, 1988.
69. LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., Baltimore, v.193, p. 265-275, 1951.

70. LUBS, H.A. Frequency of genetic disease. In: LUBS, H.A. ; De La CRUZ, F., eds. Genetic counseling. New York: Raven Press, 1977. 502 p.
71. MacDONNELL, P.C. ; GREENGARD, O. Enzymes in intracellular organelles of adult and developing rat brain. Arch. Biochem. Biophys., Duluth, MD, v.163, p. 644-655, 1974.
72. McKUSICK, V.A. Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes. 9 ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1990. 2028 p.
73. MEDINA, J.M.; CUEZVA; J.M.; MAYOR, F. Non-gluconeogenic fate of lactate during the early neonatal period in the rat. Febs Let., Amsterdam, v.114, p. 132-134, 1980.
74. MELLANBY, J. ; WILLIANSO, D.H. Acetoacetate. In: BERGMAYER, H.U., ed. Methods of enzymatic analysis. 2a. ed. New York: Verlag Chemie Weinheim Acad. Press, 1974. v. 4, p. 1840-1843.
75. MILLER, A.L. et al. Interactions between glucose and ketone body use by developing brain. Dev. Brain Res., Amsterdam, v.4, p. 443-450, 1982.
76. NAGY, A.K.; SHUSTER, T.A.; DELGADO-ESCUETA, A.V. Ecto-ATPase of mammalian synaptosomes: identification and enzymic characterization. J. Neurochem., New York, v.47, p. 976-986, 1986.

77. NORTON, W.T. ; PODUSLO, S.E. Myelinization in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. J. Neurochem., New York, v.21, p. 759-773, 1973.
78. OBERHOLZER, V.G. et al. Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. Arch. Dis. Child., London, v.42, p. 492-504, 1967.
79. OLDENDORF, W.H. Blood-brain barrier transport of metabolic substrates. In: PASSONEAU, J.V. et al., eds. Cerebral metabolism and neural function. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. p. 127-132.
80. ORLANDO, M.; FIORI, A.; COSTA, M. Methylmalonic aciduria and vitamin B<sub>12</sub> deficiency in the rat. J. Nutr. Sci. Vitaminol., Bunkyo-ku, v.19, p. 383-388, 1973.
81. PAGE, M.A.; KREBS, H.A.; WILLIAMSON, D.H. Activities of enzymes of ketone-body utilization in brain and other tissues of suckling rats. Biochem. J., London, v.121, p. 49-53, 1971.
82. PATEL, T.B. ; CLARK, J.B. Acetoacetate metabolism in rat brain. Development of acetoacetyl-coenzyme A deacylase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase. Biochem. J., London, v.176, p. 951-958, 1978.

83. PATEL, M.S.; OWEN, O.E.; RAEFSKY, G. Effect of methylmalonate in developing rat brain. Life Sci., Elmsford, v.19, p. 41-48, 1976.
84. PATEL, T.B.; De BUYSERE, M.S.; OLSON, M.S. The effect of propionate on the regulation of the pyruvate dehydrogenase complex in the rat liver. Arch. Biochem. Biophys., Duluth, MD, v.220, p. 405-414, 1983.
85. PEARSON, B.; SETTERGREN, G.; DAHLQUIST, G. Cerebral arteriovenous difference of acetoacetate and D-beta-hydroxybutyrate in children. Acta Paediatr. Scand., v.61, p. 273-278, 1972.
86. ROBAIN, O. ; PONSOT, S. Effect of undernutrition on glial maturation. Brain Res., Amsterdam, v.149, p. 379-397, 1978.
87. ROSENBERG, L.E. ; FENTON, W.A. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: SCRIVER, C.R. et al., eds. The metabolic basis of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 1989. p. 821-844.
88. ROODHOOFT, A.M. et al. Symmetrical necrosis of the basal ganglia in methylmalonic acidemia. Eur. J. Paediatr., Heidelberg, v.149, p. 582-584, 1990.
89. SEISJO, B.K. Brain energy metabolism. Chichester: Wiley, 1978. 607 p.

90. SHUMAN, R.M.; LEECH, R.W.; SCOTT, C.R. The neuropathology of the nonketotic and ketotic hyperglycinemias: three cases. Neurology, Cleveland, v.28, p. 139-46, 1978.
91. SNELL, K. ; WALKER, D.G. Glucose metabolism in the newborn rat. Biochem. J., London, v.132, p. 739-752, 1973.
92. SOBOTKA, T.J.; COOK, M.P.; BRODIE, R.E. Neonatal malnutrition neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. Brain Res., Amsterdam, v.65, p. 443-457, 1974.
93. SOKOLOFF, L. Circulation and energy metabolism of the brain. In: SIEGEL, G.J. et al., eds. Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. 4 ed. New York: Raven Press, 1989. p. 565-590.
94. SORENSEN, R.G. ; MAHLER, H.R. Localization of endogenous ATPases at the nerve terminal. J. Bioenerg. Biomembr., New York, v.14, p. 527-547, 1982.
95. SPENCE, M.W. ; WOLFE, L.S. Gangliosides in developing rat brain. Isolation and comparison of sub-cellular membranes enriched. Can. J. Biochem., Ottawa, v.45, p. 671-688, 1967.
96. STEELE, R.D. Blood-brain barrier transport of the alfa-keto acid analogs of amino acids. Fed. Proc., Bethesda, v.45, p. 2060-2064, 1986.

97. STEWART, P.M. ; WALSER, M. Failure of the normal ureagenic response to amino acids in organic acid loaded rats. Proposed mechanism for the hiperamonemia of propionic and methylmalonic acidemia. J. Clin. Invest., New York, v.66, p. 484-492, 1980.
98. STORKE, O. et al. Methylmalonic aciduria: a new inborn error of metabolism which may cause fatal acidosis in the neonatal period. Scand. J. Clin. Lab. Invest., Oxford, v.20, p. 313-328, 1967.
99. SUGIYAMA, N. et al. Biochemical evidence of carnitine effect on propionate elimination. J. Inherited. Metab. Dis., Lancaster, v.7, p. 137-138, 1984.
100. SWEETMAN, L. et al. Prenatal diagnosis of propionic and methylmalonic acidemia by stable isotope dilution analysis of methylcitric and methylmalonic acids in amniotic fluid. In: SCHMIDT, H.L.; FORSTEL, H.; HEINZINGER, K., eds. Stable isotopes. Amsterdam: Elsevier, 1982. p. 287-293.
101. TAN, A. et al. Inhibition of D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase by malonate analogues. Arch. Biochem. Biophys., Duluth, MD, v.166, p. 164-172, 1975.
102. THORN, M.B. Inhibition by malonate of succinic dehydrogenase in heart-muscle preparations. Biochem. J., London, v.54, p. 540-547, 1953.



103. TRINDER, P.A. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. J. Clin. Pathol., London, v.22, p. 158-161, 1969.
104. UTTER, M.S. Metabolism regulation and enzyme action. FEBS Proc. Meet., Aberdeen, v.19, p. 91-98, 1970.
105. VANNUCCI, R.C. et al. Lactic acid as an energy source in perinatal brain. In: PASSONEAU, J.V. et al., eds. Cerebral metabolism and neural function. Baltimore: William & Wilkins, 1980. p. 264-270.
106. WAHLE, K.W.J. et al. Inhibition in vitro of lipogenic enzymes from bovine (*Bos taurus*) mammary tissue by methylmalonyl-coenzyme A and coenzyme A. Comp. Biochem. Physiol., Oxford, v.78, p. 93-97, 1984.
107. WAJNER, M. et al. Diminished concentrations of ganglioside N-acetylneuraminic acid (G-NeuAc) in cerebellum of young rats receiving chronic administration of methylmalonic acid. J. Neurol. Sci., Amsterdam, v.85, p. 233-238, 1988.
108. WEIDEMANN, M.J. ; KREBS, H.A. Acceleration of gluconeogenesis from propionate by DL-carnitine in the rat kidney cortex. Biochem. J., London, v.111, p. 69-81, 1969.
109. WEIDEMANN, M.J. et al. Gluconeogenesis from propionate in kidney and liver of the vitamin B<sub>12</sub> deficient rat. Biochem. J., London, v.117, p. 177-181, 1970.

110. WIENER, R.; HIRSCH, H.J.; SPITZER, J.J. Cerebral extraction of ketones and their penetration into CSF in the dog. Am. J. Physiol., Bethesda, v.220, p. 1542-1546, 1971.
111. WILLIAM, D.L. et al. Dietary depletion of vitamin B<sup>12</sup> and the excretion of methylmalonic acid in the rat. Br. J. Nutr., Cambridge, v.23, p. 343-352, 1969.
112. WILLIAMSON, D.H. ; MELLANBY, J.D. D-(-)-3-Hydroxybutyrate. In: BERGMEYER, H.U., ed. Methods of enzymatic analysis. 2 ed. New York: Verlag Chemie Weinheim Acad. Press, 1974. v.4, p. 1836-1839.
113. WILLIAMSON, J.R.; ANDERSON, J.; BROWNING, E.T. Inhibition of gluconeogenesis by butylmalonate in perfused rat liver. J. Biol. Chem., Baltimore, v.245, p. 1717-1726, 1970.
114. WINICK, M. Nutrition and nerve cell growth. Fed. Proc., Bethesda, v.29, p. 1510-1515, 1970.
115. ZAMENHOF, S.; van MARTHENS, E.; MARGOLIS, F.L. DNA (cell number) and protein in neonatal brain: alteration by maternal dietary protein restriction. Science, Washington, DC, v.160, p. 322-323, 1968.
116. ZIVIN, J.A. ; SNARR, J.F. Glucose and D-(-)-3-hydroxybutyrate uptake by isolated perfused rat brain. J. Appl. Physiol., Bethesda, MD, v.32, p. 664-668, 1972.

## ANEXOS

Os seguintes trabalhos foram publicados durante a realização desta tese com dados parciais:

1. WAJNER, M.; DUTRA, J.C.; WANNMACHER, C.M.D. Chemically induced methylmalonic acidaemia for neurochemical and behavioural studies in rats. Bloc. Soc. Trans., 17:571-2, 1989.
2. DUTRA, J.C.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.F.; WANNMACHER, C.M.D. Methylmalonate increases glucose uptake in vitro by brain of young rats. Bloc. Soc. Trans., 17:572-3, 1989.
3. DUTRA, J.C., WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S.; WANNMACHER, C.F.; WANNMACHER, C.M.D. Influence of methylmalonate on the uptake of ketone bodies in vitro by brain of young rats. Bloc. Soc. Trans., 18:421-2, 1990.
4. DUTRA, J.C.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.F., DUTRA-FILHO, C.S.; WANNMACHER, C.M.D. Effects of methylmalonate and propionate on uptake of glucose and ketone bodies in vitro by brain of developing rats. Biochem. Med. Metab. Biol., 45:56-64, 1991.
5. DUTRA, J.C.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WANNMACHER, L.E.; PIRES, R.F.; ROSA-Jr, A. Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. Braz. J. Med. Biol. Res., 24:595-605, 1991.
6. WAJNER, M.; DUTRA, J.C.; CARDOSO, S.E.; WANNMACHER, C.M.D.; MOTTA, E.R. Effect of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. J. Inher. Metab. Dis., 14, 1991, in press.

between these two preparations, in the heterogeneous cerebral cortical slice, release of other neurotransmitters could be occurring in conjunction with a direct activation of PLC by raised intracellular calcium.

- Baird, J. G. & Nahorski, S. R. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 1130-1137  
 Baird, J. G. & Nahorski, S. R. (1988) *Br. J. Pharmacol.* **94**, 395P  
 Eberhard, D. A. & Holz, R. W. (1988) *Trends Neurosci.* **11**, 517-526

- Fisher, S. K. & Snider, R. M. (1987) *Mol. Pharmacol.* **32**, 81-90  
 Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450  
 Kendall, D. A. & Nahorski, S. R. (1984) *J. Neurochem.* **42**, 1388-1394  
 Kendall, D. A. & Nahorski, S. R. (1985) *Eur. J. Pharmacol.* **115**, 31-36

Received 29 November 1988

## Chemically induced methylmalonic acidemia for neurochemical and behavioural studies in rats

M. WAJNER, J. C. DUTRA and C. M. D. WANNMACHER  
*Department of Biochemistry, Institute of Biosciences,  
 U.F.R.G.S., Porto Alegre, Brazil*

Methylmalonic acidemia is an inherited disorder of organic acid metabolism caused by a deficiency of L-methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) activity. Essentially methylmalonate (MMA) and secondarily other metabolites accumulate in tissues of affected individuals. It is manifested clinically by acidosis and prominent neurological dysfunction. Patients usually die early in life. Those who survive longer present a variable degree of mental retardation (Rosemberg, 1983).

Vitamin B12 deprivation from the diet increases MMA excretion in urine and has been used as a chronic experimental model of methylmalonic acidemia (Barnes *et al.*, 1963). However, this model causes other metabolic alterations secondary to the blockage of reactions where vitamin B12 is the cofactor, and this may interfere in neurochemical and behavioural investigation.

We have produced sustained serum levels of MMA in Wistar rats comparable to those encountered in human methylmalonic acidemia (1.0-2.5 mM) by injecting subcutaneously buffered MMA, pH 7.2, twice a day with an interval of 8 h from the 5th until the 25th day of life. To achieve these levels, injections were of increasing concentrations according to age (0.76-1.69  $\mu\text{mol/g}$  body weight). Rats were killed by decapitation at 5, 10, 15, 20 and 25 days of age, their brains rapidly removed and homogenized. Some animals were left undisturbed in their cages until 60 days of age, when they were submitted to behavioural sessions. MMA was determined in brain homogenates and in plasma by the *p*-nitroaniline reaction (Giorgio & Plaut, 1965) and

this was confirmed by gas chromatography. Brain MMA levels were in the range of 5.0-35.0  $\mu\text{mol/g}$  wet tissue and decreased as age advanced. Thirty minutes after injection MMA brain/plasma ratio was 0.16 in 5-day-old rats, 0.09 in 10-day-old rats and less than 0.02 in rats of 15 or more days of age, which indicates a decreasing permeability of the blood-brain barrier to MMA. To our knowledge there is no data in the literature about brain MMA levels in methylmalonic acidemia.

This model allowed us to investigate the specific action of MMA on certain neurochemical parameters and also on rat behaviour. We observed that the cerebellum of 25-day-old MMA-treated rats (experimental group) contained less ganglioside *N*-acetylneuraminic acid compared with rats receiving saline (controls) (Table 1). Gangliosides were extracted according to Roukema & Heijeman (1970) and determined by the method described by Warren (1959). Brain DNA, RNA and protein were not affected by chronic MMA administration. In addition, we identified a deficit in the performance of 60-day-old rats of the experimental group in the open field task which was evidenced by a lack of habituation (Table 1). At present it is difficult to correlate learning deficits with biochemical defects. However, in view of previous publications showing that an increase in brain ganglioside *N*-acetylneuraminic acid is associated with improved behavioural performance in the open field (Morgan & Winick, 1980a, b) and in other tasks (Savaki & Levis, 1977), and since gangliosides very probably participate in neural transmission (Rahmann *et al.*, 1976), it is possible that our results on neurochemical and behavioural alterations may be linked.

- Barnes, L. R., Young, D. G. & Nocho, R. (1963) *Science* **140**, 76-77  
 Giorgio, A. J. & Plaut, G. W. E. (1965) *J. Lab. Clin. Med.* **66**, 667-676  
 Morgan, B. L. G. & Winick, M. (1980a) *J. Nutr.* **110**, 416-424

Abbreviation used: MMA, methylmalonate.

Table 1. *Effect of chronic postnatal MMA administration on ganglioside cerebellum content and on behaviour of rats submitted to the open field task*

Significant differences between means of control and experimental group calculated by Student's *t*-test (\* $P < 0.05$ ); significant differences between means of test and training rearing responses calculated by *F*-test for simple effect (\*\* $P < 0.005$ ). Results are mean  $\pm$  S.E.M. (number of rats).

| Group  | Cerebellum G-NeuAc<br>( $\mu\text{g}/100$ mg tissue) | Rearing responses |                         |
|--------|------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------|
|        |                                                      | Training          | Test                    |
| Saline | 119.1 $\pm$ 20.4 (12)                                | 13.31 $\pm$ 0.63  | 10.45 $\pm$ 0.76 (29)** |
| MMA    | 102.6 $\pm$ 17.3 (13)*                               | 11.26 $\pm$ 0.85  | 11.04 $\pm$ 0.89 (27)   |

- Morgan, B. L. G. & Winick, M. (1980*a*) *J. Nutr.* **110**, 416-424  
Morgan, B. L. G. & Winick, M. (1980*b*) *J. Nutr.* **110**, 425-432  
Rahmann, H., Rosner, H. & Breer, H. (1976) *J. Theor. Biol.* **57**, 231-237  
Rosemberg, L. E. (1983) in *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Stambury, J. B., Wingaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L. & Brown, C., eds.), 5th edn, pp. 474-497  
Roukema, P. R. & Heijeman, J. (1970) *J. Neurochem.* **17**, 773-780  
Savaki, H. E. & Levis, G. M. (1977) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **7**, 7-12  
Warren, L. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 1971-1975
- 

Received 11 November 1988

- Morgan, B. L. G. & Winick, M. (1980a) *J. Nutr.* **110**, 416-424  
 Morgan, B. L. G. & Winick, M. (1980b) *J. Nutr.* **110**, 425-432  
 Rahmann, H., Rosner, H. & Breer, H. (1976) *J. Theor. Biol.* **57**, 231-237  
 Rosemberg, L. E. (1983) in *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Stambury, J. B., Wingaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L. & Brown, C., eds.), 5th edn, pp. 474-497

- Roukema, P. R. & Heijeman, J. (1970) *J. Neurochem.* **17**, 773-780  
 Savaki, H. E. & Levis, G. M. (1977) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **7**, 7-12  
 Warren, L. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 1971-1975

Received 11 November 1988

## Methylmalonate increases glucose uptake *in vitro* by brain of young rats

J. C. DUTRA, M. WAJNER, C. F. WANNMACHER and C. M. D. WANNMACHER

*Department of Biochemistry, Institute of Biosciences, U.F.R.G.S., Porto Alegre, Brazil*

Methylmalonic acidemia is an inherited metabolic disorder generally associated with severe clinical features. Those who survive the first months present a variable degree of mental retardation (Rosemberg, 1983). Methylmalonate (MMA) is the major metabolite which accumulates in tissues of methylmalonic acidemic patients. To our knowledge, only two studies have been done on the effects of MMA on brain metabolism (Frenkel *et al.*, 1973; Patel *et al.*, 1976). Since glucose is the major substrate that throughout life supports the energy requirements of the brain, we studied the effects of MMA on glucose uptake in rat brain *in vitro*.

Wistar rats bred in our laboratory were used in this study. Free water and a 20% (w/w) protein commercial chow were provided. The mother and eight pups were kept per cage. Half of the animals were left fasting 24 h before the experiments. The rats were killed by decapitation without anaesthesia at 15 days of age, their brains were rapidly removed. The olfactory bulbs, cerebellum and pons/medulla were discarded. The rest of the brain (cerebrum) was cut in two perpendicular directions with a McIlwain chopper into prisms of 40  $\mu$ m width. Brain prisms from fed and fasting animals were incubated under O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (19:1) mixture at 37°C for 30 min in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.0 (100 mg of tissue/ml of buffer) containing: glucose 5.0 mM and one of the three concentrations of MMA, 1.0, 2.5 and 5.0 mM. Control experiments did not contain MMA in the incubation medium. Glucose was measured by the glucose oxidase method (Trinder, 1969) and the uptake determined by subtracting the amount found after the incubation from the total amount placed in the medium.

It can be seen in Table 1 that MMA had no effect on glucose incorporation by brain prisms of fed rats, but, surprisingly, it increased glucose uptake by brain prisms of fast-

ing rats at levels as low as 1.0 mM. Further assays revealed that MMA doses of 0.5 mM also produced such an effect. On the other hand, propionate in doses up to 10.0 mM did not affect glucose incorporation (results not shown), ruling out a possible non-specific effect due to an acidic component added to the incubation medium. Both MMA and propionate in the doses used did not change the buffer pH. It can also be seen in the Table that the brains of fasting rats incorporated less glucose in the control experiments (incubation medium free from MMA).

In another experiment, we applied three subcutaneous injections of buffered MMA, pH 7.2, with an interval of 90 min between them, to 15-day-old fed and 24 h fasting rats in such doses (10.5 mg of MMA/100 g body weight) that the animals achieved MMA serum levels of around 2.5 mM (concentration found in methylmalonic acidemic patients at crises). Control animals received saline in the same volumes. Ninety minutes after the last injection animals were decapitated and the brain processed as before, excepting for the presence of MMA in the incubation medium. Again we observed that only brain prisms from fasting rats incorporated significantly more glucose than the controls: saline-treated rats incorporated  $19.5 \pm 3.84$   $\mu$ mol/h per g ( $n=12$ ), whereas the experimental group incorporated  $23.6 \pm 2.75$   $\mu$ mol/h per g ( $n=12$ ),  $P<0.01$ , by the Student's *t*-test, thus confirming our results using MMA in the incubation medium.

To test whether MMA, an analogue of succinate, inhibits the Krebs cycle through the succinate dehydrogenase step, deviating glucose degradation to lactate and thus increasing its needs, we measured succinate dehydrogenase activity in the brains of 24 h fasting rats of 15 days of age in the presence of various amounts of MMA (Sorensen & Mahler, 1982). We found that the acid inhibits the enzyme in a dose-response way (inhibitions were 17.6, 33.8 and 54.9% for MMA concentrations of 1.0, 2.5 and 5.0 mM, respectively), whereas propionate in concentrations up to 10.0 mM did not cause any inhibition. Therefore, it is quite possible that a competitive inhibition of succinate dehydrogenase by MMA may, at least partly, explain our results on glucose uptake by the brains of fasting young rats.

Abbreviation used: MMA, methylmalonate.

Table 1. *Effect of MMA on glucose incorporation by cerebrum of 15-day-old fed and fasting rats in vitro*

Significant differences compared with controls: \* $P<0.001$ ; † $P<0.01$ ; compared with fed rats: ‡ $P<0.001$ . Differences between means of the various groups calculated by ANOVA, followed by the Duncan multiple range test. Results are mean  $\pm$  s.d. (number of cases) and expressed as  $\mu$ mol of glucose uptake/h per g of brain.

|                   | Saline<br>(controls)          | MMA (mM)                      |                               |                               |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                   |                               | 1.0                           | 2.5                           | 5.0                           |
| Fed rats          | 26.5 $\pm$ 4.79<br>( $n=7$ )  | 26.7 $\pm$ 4.71<br>( $n=7$ )  | 24.4 $\pm$ 7.61<br>( $n=7$ )  | 24.9 $\pm$ 7.59<br>( $n=7$ )  |
| 24-h fasting rats | 20.9 $\pm$ 3.34‡<br>( $n=9$ ) | 32.2 $\pm$ 4.36*<br>( $n=9$ ) | 27.7 $\pm$ 3.76†<br>( $n=9$ ) | 29.3 $\pm$ 3.84*<br>( $n=9$ ) |

Frenkel, E. P., Kitchens, R. I. & Johnson, J. M. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 7540-7546  
 Patel, M. S., Owen, Q. E. & Raefsky, C. (1976) *Life Sci.* **19**, 41-48  
 Rosemberg, L. E. (1983) in *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Stambury, J. B., Wingaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L. & Brown, C., eds.), 5th edn, pp. 474-497

Sorensen, R. G. & Mahler, H. R. (1982) *J. Bioenerg. Biomembr.* **14**, 527-547

Trinder, P. A. (1969) *J. Clin. Pathol.* **22**, 158-161

Received 11 November 1988

## Structural similarity but pharmacological heterogeneity among calcitonin gene related peptide receptors

STEVEN M. FOORD,\* LAURIAN MALONE† and  
 ROGER K. CRAIG‡

\*Medical Molecular Biology Unit, Middlesex and University  
 College School of Medicine, Cleveland Street, London  
 W1P 6PN, U.K.

Three forms of calcitonin gene related peptide (CGRP) have been discovered so far.  $\alpha$ -CGRP (CGRP1) is produced by differential splicing of the initial transcript of the calcitonin gene [1].  $\beta$ -CGRP (CGRP2) is a similar protein encoded by a second gene [1].  $\gamma$ -CGRP (Amylin) was identified as a major component of islet amyloid, its origin is unknown [2]. Immunohistochemical studies using antisera raised against synthetic CGRP peptides have revealed CGRP-like material in discrete areas of the brain and in extensive networks of sensory nerves, in particular supplying the vasculature [1, 3].

Present address: \*Glaxo Group Research, Greenford, Middlesex, U.K. and †Roche Pharmaceuticals, Welwyn Garden City, Hertfordshire, U.K. and ‡I.C.I. Pharmaceuticals, Alderley Edge, Cheshire, U.K.

Abbreviations used: CGRP, calcitonin gene related peptide; SC, spinal cord; RA, right auricle; SM, skeletal muscle; c, canine; h, human; SDS/PAGE, SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis.

CGRP peptides have activity upon vascular endothelium, gastric and pancreatic secretion, muscle cells and skeletal muscle [1, 2]. Receptors with a high affinity for  $\alpha$ - and  $\beta$ -CGRP have been identified most easily in the central nervous system. We have demonstrated that the CGRP receptor in the human placenta is a glycoprotein of  $M_r$  260 000 made up of four subunits of  $M_r$  62 000-68 000. The receptor was purified from plasma membranes after solubilization in Triton-X-100 and sequential lectin and ligand affinity chromatography [4].

In this study we have tried to determine whether CGRP receptors are the same in different tissues. We have examined the pharmacology of CGRP receptors in human and canine spinal cord (SC), canine right auricle (RA) and human skeletal muscle (SM). Furthermore, we have purified the receptor from canine SC and RA to homogeneity.

Fig. 1 illustrates the ability of CGRP and related compounds to compete for iodinated  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -CGRP in plasma membrane preparations. The data demonstrate the specificity of CGRP receptor binding in each of the tissues, that tissues have different affinities for  $\alpha$ -CGRP and suggest that CGRP receptors differentiate between  $\alpha$ - and  $\beta$ -CGRP. Construction of adsorption isotherms and subsequent Scatchard analysis demonstrated that the order of affinity of the receptors for  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -CGRP was hSC, 0.83 nM = cSC, 1.16

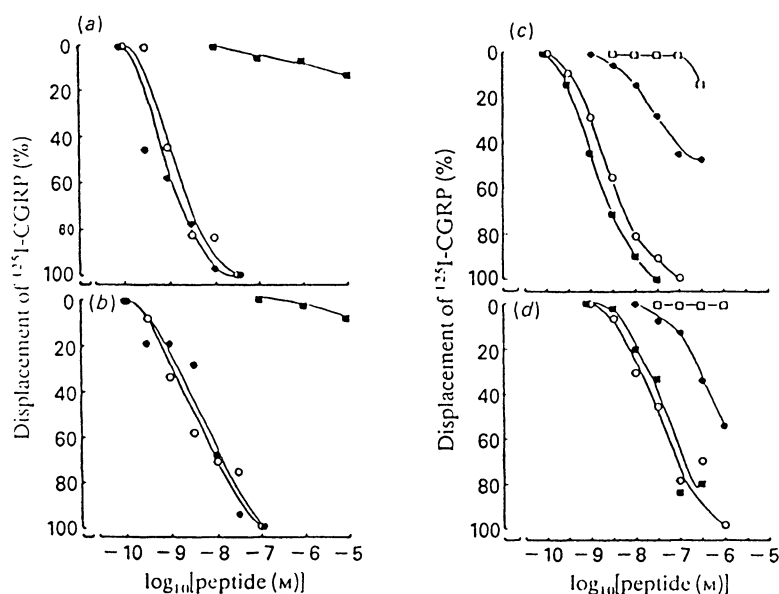


Fig. 1. The ability of  $\alpha$ - and  $\beta$ -CGRP, human and salmon calcitonin to compete for  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -CGRP binding to plasma membrane preparations of frozen human and canine tissues

(a) hSC membranes: ●,  $\alpha$ -CGRP; ○,  $\beta$ -CGRP; ■, calcitonin. (b) hSM membranes: ●,  $\alpha$ -CGRP; ○,  $\beta$ -CGRP. (c) cSC membranes: ■,  $\beta$ -CGRP; ○,  $\alpha$ -CGRP; ●, salmon calcitonin; □, human calcitonin. (d) cRA, symbols as for (c). Data are expressed as percentage total binding.



# Influence of methylmalonate on the uptake of ketone bodies *in vitro* by the brain of young rats

J. C. DUTRA, M. WAJNER\*, C. S. DUTRA-FILHO,  
C. F. MANNMACHER, and C. M. D. WANNMACHER

Department of Biochemistry, Institute of Biosciences, UFRGS,  
90050 Porto Alegre, Brazil

Methylmalonate (MMA) is the principal metabolite which accumulates in tissues of patients affected by methylmalonic acidemia. The disorder is caused by an inherited deficiency of L-methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) activity and is clinically characterized by severe acidosis and neurological dysfunction. Those who survive the earliest stages of the disease present a variable degree of mental retardation [1]. Since ketone bodies are important substrates for brain metabolism in young humans and rats and since their use increases after starvation [2], we studied the influence of MMA on the uptake of ketone bodies *in vitro* by the brain of fed and fasting rats.

Wistar rats were used in this study. Free water and a 20% (w/w) protein chow were provided. A mother and eight pups were kept per cage. Half of the animals were fasted for 30 h before the experiments. The rats were killed by decapitation without anaesthesia at 15 days of age. The brain was rapidly removed, and the olfactory bulbs, cerebellum and pons/medulla were discarded. The rest of brain (cerebrum) was cut with a McIlwain's chopper into prisms of 40  $\mu$ m width. Brain prisms from fed and fasted animals were incubated under a O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (19:1) mixture at 37°C for 30 min in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.0 (100 mg of tissue/ml of buffer) containing either 2.0 mM- $\beta$ -hydroxybutyrate (HBA) or 5.0 mM-acetoacetate and one of the three concentrations

of MMA (1.0, 2.5 or 5.0 mM). Controls did not contain MMA in the incubation medium. HBA and acetoacetate were determined at the beginning and at the end of incubation by the methods of Williamson & Mellanby [3] and Mellanby & Williamson [4], respectively. The uptake was achieved by subtracting the amounts found after the incubation from the total amount found\* before the incubation. MMA in the doses used did not alter the buffer pH.

Table 1 shows that MMA had no influence on acetoacetate uptake in brain taken from fed and fasting rats. However, MMA significantly diminished brain incorporation of HBA, the effect being more evident in brain prisms of fasting animals.

Since the uptake of HBA, but not of acetoacetate, was affected by the presence of MMA in the incubation medium, we tested whether  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH) activity could be inhibited by MMA. Cerebrum was homogenized in a chilled solution of 0.25 M-sucrose (1.0 ml/g of fresh brain) using a Potter-Elvehjem homogenizer for 30 s at 2–4°C. The homogenates were submitted to three cycles of freezing and thawing with liquid nitrogen. The HBDH activity was assayed in the preparations according to Leong *et al.* [5] by measuring NADH formation. We found that MMA, in doses of 1.0 mM and higher, inhibited significantly HBDH activity in brain of fed and fasting rats. The effect was more pronounced in fasting animals. Percentages of inhibition relatively to controls (homogenates incubated without MMA) with MMA concentrations of 1.0 mM, 2.5 mM and 5.0 mM were respectively 12, 17 and 19% for brain homogenates of fed rats ( $n=7$ ) and 10, 19 and 37% for homogenates of fasting animals ( $n=6$ ). Analysis of variance showed that these inhibitions were all significant. Our results, therefore, demonstrate that the activity of HBDH is inhibited by MMA in concentrations similar to those encountered in

Abbreviations used: MMA, methylmalonate; HBA,  $\beta$ -hydroxybutyrate; HBDH,  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase.

\*To whom correspondence should be addressed.

Table 1. Effect of MMA on the uptake of ketone bodies by cerebrum of 15-day-old fed and fasting rats *in vitro*

Statistical significance: \* $P < 0.05$ , † $P < 0.01$  compared with controls. Differences between means of the various groups were calculated by analysis of variance followed by the Duncan's multiple range test. Results are means  $\pm$  s.d.. (a) Uptake of acetoacetate; (b) uptake of HBA.

|                            | Ketone body uptake ( $\mu$ mol/min per g of brain) |                |                 |                 |
|----------------------------|----------------------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                            | Controls                                           | 1.0 mM-MMA     | 2.5 mM-MMA      | 5.0 mM-MMA      |
| (a)                        |                                                    |                |                 |                 |
| Fed rats ( $n=7$ )         | 40.2 $\pm$ 8.8                                     | 35.7 $\pm$ 8.2 | 37.7 $\pm$ 8.0  | 35.7 $\pm$ 10.7 |
| 30-h fasted rats ( $n=7$ ) | 51.5 $\pm$ 9.3                                     | 51.5 $\pm$ 9.0 | 51.8 $\pm$ 5.6  | 53.0 $\pm$ 4.2  |
| (b)                        |                                                    |                |                 |                 |
| Fed rats ( $n=7$ )         | 44.3 $\pm$ 7.0                                     | 46.0 $\pm$ 7.7 | 41.0 $\pm$ 8.7  | 34.0 $\pm$ 4.3† |
| 30-h fasted rats ( $n=8$ ) | 43.7 $\pm$ 3.7                                     | 41.2 $\pm$ 5.3 | 38.0 $\pm$ 3.7* | 36.7 $\pm$ 3.3† |

tissues of patients with methylmalonic acidemia. To our knowledge this is the first report of a suppression of brain HBDH activity by MMA, even though similar inhibition had been previously observed in liver and heart of various species [6].

Infants can use ketone bodies besides glucose for their brain metabolic needs. Hypoglycaemia and ketosis are usually found in children with methylmalonic acidemia during crises. Since HBA is the predominant ketone body in blood, an impairment of its utilization during crises may affect normal brain metabolism. So, it is possible that the neurological dysfunction encountered in patients affected by methylmalonic acidemia may be partly due to altered metabolism of brain ketone bodies in early development.

1. Rosenberg, L. E. & Fenton, W. A. (1989) in *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. & Valle, D., eds.), 6th edn, vol. 1, pp. 821-844, McGraw-Hill, New York
2. Zivin, J. A. & Snarr, J. F. (1972) *J. Appl. Physiol.* **32**, 664-668
3. Williamson, D. H. & Mellanby, J. (1974) *Methods Enzyme Anal.* **4**, 1840-1843.
4. Mellanby, J. & Williamson, D. H. (1974) *Methods Enzyme Anal.* **4**, 1836-1839
5. Leong, S. F., Lai, J. C. K., Lim, L. & Clark, J. B. (1981) *J. Neurochem.* **37**, 1548-1556
6. Tan, A. W. H., Smith, C. M., Aogaichi, T. & Plaut, G. W. E. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* **166**, 164-173

---

Received 25 September 1989

## Effects of Methylmalonate and Propionate on Uptake of Glucose and Ketone Bodies *in Vitro* by Brain of Developing Rats

J. C. DUTRA, M. WAJNER, C. F. WANNMACHER, C. S. DUTRA-FILHO,  
AND C. M. D. WANNMACHER

*Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90050,  
Rio Grande do Sul, Brazil*

Received June 12, 1990

Adult mammalian brain normally uses glucose and oxygen as substrates for its energy metabolism (1). Glucose enters brain through the blood-brain barrier by facilitated diffusion. The activity of the highly specific carrier permits transport of two to three times more glucose than is normally metabolized by brain. In special circumstances adult brain may use other substances as energy sources if they are available in the blood at a sufficiently high level. Principal among these are ketones, during starvation, which cross the blood-brain barrier by facilitated transport via the monocarboxylic acid carrier system (2). On the other hand, immature mammalian brain uses both ketone bodies and glucose for its energy needs, probably owing to the high levels of ketone bodies in blood secondary to the considerable high content of lipids in milk, the primary nutrition of very young mammals (3,4). In the 15-day-old rat, approximately equal contributions are made by glucose and ketone bodies to carbon influx into the tricarboxylic acid cycle (5).

Organic acidemias are inherited disorders of metabolism biochemically characterized by tissue accumulation of one or more organic acids. Neurological dysfunction is one of the most characteristic features of organic acidemias, and this may be related to the higher permeability of immature brain to organic acids compared to adult brain. One of the most frequent organic acidemias is methylmalonic acidemia, in which predominantly methylmalonate (MMA) and secondarily propionate and other metabolites accumulate in blood and in other tissues due to severe deficiency of L-methylmalonyl-CoA mutase activity (EC 5.4.99.2). A large percentage of affected infants die early. Those who survive longer present a variable degree of mental retardation (6).

Very little information exists on the effect of MMA on brain metabolism. As brain of developing rats uses glucose and ketone bodies for its metabolism, in the present work we studied the effect of MMA and propionate on uptake of glucose and ketone bodies by brain of 15-day-old rats. We also investigated

MMA and propionate action on  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH) (EC 1.1.1.30) activities in brain and liver homogenate.

## METHODS

### *Animals*

Male and female 15-day-old Wistar rats, bred in our laboratory, were used in this study. The birth dates of all litters were carefully recorded after daily inspection and litters were culled to eight pups. Mothers and pups had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. They were kept in a temperature-controlled room (22°C) with a 12-hr light–dark cycle. Thirty hours before death, weight-matched animals were divided into two groups: group A continued to be fed *ad libitum*, group B was fasted.

### *Preparation of Brain Tissue*

Rats were killed by decapitation without anesthesia and brains were immediately removed onto an ice-cooled glass plate. Olfactory bulbs, cerebellum, and pons/medulla were discarded. The rest of the brain (cerebrum) was cut in two perpendicular directions with a McIlwain chopper into prisms 40  $\mu$ m wide. Prisms were pooled and 50 mg samples used for the uptake studies.

For the enzyme assays, cerebrum and liver fragments were homogenized in a chilled solution of 0.25 M sucrose.

### *Treatment of Rats*

For the *in vivo* studies, some litters were used. Half of these animals, chosen randomly from the litters, were injected subcutaneously with saline solution 0.85% (controls) and the other half with MMA buffered solution, pH 7.2–7.4 (1.5%). Three injections were applied at intervals of 90 min. The first MMA dose was 0.7 ml/100 g body wt, whereas the second and third doses were half the first one. Ninety minutes after the last injection, animals were decapitated and their brains prepared as described. In some experiments liver was excised and homogenized and blood was collected from the saline and MMA-treated animals straight into heparinized bottles already containing 10% PCA solution for further  $\beta$ -hydroxybutyrate (HBA) quantitation.

### *Glucose Uptake Studies*

Brain prisms from fed and 30-hour-fasted animals were incubated in a O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (19:1) mixture at 37°C for 30 min in Krebs–Ringer bicarbonate buffer, pH 7.0 (100 mg of tissue/ml of buffer) containing 5.0 mM glucose and MMA or propionate. Control experiments contained only glucose in the incubation medium. Glucose was measured by the glucose oxidase method (7) and the uptake determined by subtracting the amount found after the incubation from the total amount measured before the incubation. MMA and propionate in the doses used did not alter the buffer pH.

### *Ketone Body Uptake Studies*

Brain prisms from fed and 30-hour-fasted animals were incubated under  $O_2/CO_2$  (19:1) mixture at 37°C for 30 min in Krebs–Ringer bicarbonate buffer, pH 7.0 (100 mg of tissue/ml of buffer) containing either 2.0 mM HBA or 5.0 mM acetoacetate (AcAc) and MMA or propionate. Controls contained only HBA or AcAc in the incubation medium. HBA and AcAc were determined at the beginning and at the end of incubation according to Williamson and Mellanby (8) and Mellanby and Williamson (9), respectively. The uptake was achieved by subtracting the amounts found after the incubation from the total amount found before the incubation. MMA and propionate in the doses used did not alter the buffer pH.

### *Enzyme Assays*

Brain from fed and 30-hour-fasted animals was homogenized in a chilled solution of 0.25 M sucrose using a Potter–Elvehjem homogenizer for 30 sec at 2 to 4°C to give a 1:10 (w/v) homogenate. This homogenate was submitted to three cycles of freezing and thawing with liquid nitrogen. The procedure for liver preparations was the same, except that homogenates were 10 times more diluted.

HBDH activity was determined in the preparations according to Leong *et al.* (10). Briefly, the assay system contained, in a final volume of 1 ml, 100 mM Tris–HCl, pH 8.5, 400 mM hydrazine hydrate, 10 mM  $MgSO_4$ , 5 mM  $K^+$ -EDTA, 10 mM  $NAD^+$ , 1  $\mu$ M rotenone, and homogenate (40  $\mu$ l). The reaction was initiated by adding 20 mM DL- $\beta$ -hydroxybutyrate. NADH formation was measured as the increase in absorbance at 340 nm in a Beckman UV-recording spectrophotometer. As a routine, activities were determined within 4 hr of sample preparation.

## RESULTS

### *Effect of Methylmalonate and Propionate on in Vitro Glucose Incorporation by Brain*

The *in vitro* rates of glucose utilization by brain prisms of 15-day-old fed and fasted rats are displayed in Table 1. In controls, fed rats utilized more glucose than fasted animals ( $t = 2.743$ ,  $P < 0.05$ ). Also evident from Table 1 is the increased utilization of glucose by brain of fasting animals caused by MMA [ $F(2, 16) = 11.16$ ,  $P < 0.001$ ]. Propionate had no effect on brain glucose uptake.

Table 2 shows glucose uptake in brain taken from fed and fasting rats receiving MMA injections prior to death. Again it is seen that in controls brain prisms from fed animals utilized more glucose than those of fasted rats ( $t = 3.809$ ,  $P < 0.01$ ) and also that glucose uptake is greater in fasted MMA-treated rats ( $t = 2.875$ ,  $P < 0.01$ ). Therefore it seems that MMA provokes an increase in glucose uptake by brain of fasted developing rats.

### *Effect of Methylmalonate and Propionate on in Vitro Ketone Body Incorporation by Brain*

Acetoacetate uptake by brain prisms of fed and fasted 15-day-old animals was not affected by the presence of MMA in the incubation medium (Table 3).

TABLE 1  
Effect of Methylmalonate (MMA) and Propionate on *in Vitro* Glucose Uptake ( $\mu\text{mole hr}^{-1} \text{g}^{-1}$ )  
by Brain of 15-Day-Old Rats

|             | Controls                 | MMA                    |                         |
|-------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
|             |                          | 2.5 mM                 | 5 mM                    |
| Fed rats    | 27.3 $\pm$ 5.1<br>(8)    | 24.3 $\pm$ 7.7<br>(8)  | 27.0 $\pm$ 8.3<br>(8)   |
| Fasted rats | 21.0 $\pm$ 3.3***<br>(8) | 26.2 $\pm$ 3.8*<br>(8) | 29.4 $\pm$ 3.8**<br>(8) |
|             | Controls                 | Propionate             |                         |
|             |                          | 2 mM                   | 5 mM                    |
| Fed rats    | 26.8 $\pm$ 5.3<br>(8)    | 25.8 $\pm$ 7.7<br>(8)  | 24.7 $\pm$ 3.4<br>(8)   |
| Fasted rats | 21.1 $\pm$ 2.7***<br>(8) | 23.1 $\pm$ 6.2<br>(8)  | 23.2 $\pm$ 5.1<br>(8)   |

Note. Results are means  $\pm$  SD (number of rats). Differences between means of the various groups were calculated by ANOVA followed by the Duncan multiple range test when necessary. Significant differences compared with controls: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Significant difference from fed rats calculated by Student's *t* test for unpaired samples: \*\*\* $P < 0.05$ .

Furthermore, MMA diminished uptake of HBA by brain of fed [ $F(2, 16) = 3.726$ ,  $P < 0.02$ ] and fasted [ $F(2, 16) = 4.565$ ,  $P < 0.01$ ] 15-day-old rats. When propionate was added to the medium, both HBA [fed:  $F(2, 14) = 15.23$ ,  $P < 0.001$ ; fasting:  $F(2, 14) = 7.53$ ,  $P < 0.001$ ] and AcAc [fed:  $F(2, 8) = 4.977$ ,  $P < 0.02$ ; fasting:  $F(2, 8) = 9.908$ ,  $P < 0.001$ ] brain uptake declined (Table 4).

#### *Effect of Methylmalonate and Propionate on Brain and Liver $\beta$ -hydroxybutyrate Dehydrogenase Activity*

The effect of MMA on HBDH activity in brain was investigated, since MMA seemed to slow down HBA, but not AcAc, incorporation by brain.

TABLE 2  
Effect of Methylmalonate (MMA) Administration on *in Vitro* Glucose Uptake ( $\mu\text{mole hr}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) by  
Brain of 15-Day-Old Rats

|             | Controls (saline)        | MMA                     |
|-------------|--------------------------|-------------------------|
| Fed rats    | 28.7 $\pm$ 5.7<br>(6)    | 29.6 $\pm$ 4.5<br>(6)   |
| Fasted rats | 19.5 $\pm$ 3.8**<br>(12) | 23.6 $\pm$ 2.8*<br>(12) |

Note. Three injections of MMA were administered at 90-min intervals, the last injection being given 90 min before death. Results are means  $\pm$  SD (number of rats). Differences between MMA group and controls (\* $P < 0.01$ ) and between fed and fasted rats (\*\* $P < 0.01$ ), calculated by Student's *t* test for unpaired samples.

TABLE 3  
Effect of Methylmalonate (MMA) on *in Vitro* Acetoacetate and  $\beta$ -Hydroxybutyrate Uptake ( $\mu\text{mole hr}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) by Brain of 15-Day-Old Rats

|                   |                    | MMA                 |                      |
|-------------------|--------------------|---------------------|----------------------|
|                   | Controls           | 2.5 mM              | 5 mM                 |
| Acetoacetate      |                    |                     |                      |
| Fed rats          | 2.40 ± 0.52<br>(7) | 2.26 ± 0.48<br>(7)  | 2.14 ± 0.64<br>(7)   |
| Fasted rats       | 3.08 ± 0.56<br>(7) | 3.10 ± 0.34<br>(7)  | 3.18 ± 0.24<br>(7)   |
| β-Hydroxybutyrate |                    |                     |                      |
| Fed rats          | 2.76 ± 0.48<br>(8) | 2.36 ± 0.38<br>(8)  | 2.12 ± 0.30**<br>(8) |
| Fasted rats       | 2.62 ± 0.22<br>(8) | 2.28 ± 0.22*<br>(8) | 2.20 ± 0.20**<br>(8) |

Note. Results are means  $\pm$  SD (number of rats). Differences between means of the various groups were calculated by ANOVA followed by the Duncan multiple range test when necessary. Significant differences compared with controls: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Table 5 demonstrates that MMA significantly inhibited HBDH activity *in vitro* in brain of fed [ $F(2, 14) = 5.652$ ,  $P < 0.004$ ] and fasting [ $F(2, 14) = 9.480$ ,  $P < 0.001$ ] rats. Propionate, on the other hand, had no effect on *in vitro* brain HBDH activity. The influence of *in vivo* administration of MMA to rats on enzyme activity was also studied. Only brains from fasting animals were used in these experiments, since both groups (fasted and fed rats) behaved similarly in the *in vitro* enzyme studies. Rats receiving MMA presented a significant reduction ( $t = 2.246$ ,  $P < 0.05$ ) of brain HBDH activity ( $0.64 \pm 0.14 \mu\text{mole min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ,

TABLE 4  
Effect of Propionate on *in Vitro* Acetoacetate and  $\beta$ -Hydroxybutyrate Uptake ( $\mu\text{mole hr}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) by Brain of 15-Day-Old Rats

|                   |                    | Propionate           |                      |
|-------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
|                   | Controls           | 2 mM                 | 5 mM                 |
| Acetoacetate      |                    |                      |                      |
| Fed rats          | 2.32 ± 0.17<br>(4) | 1.83 ± 0.35**<br>(4) | 1.98 ± 0.06*<br>(4)  |
| Fasted rats       | 2.34 ± 0.12<br>(4) | 1.93 ± 0.12**<br>(4) | 1.76 ± 0.22**<br>(4) |
| β-Hydroxybutyrate |                    |                      |                      |
| Fed rats          | 2.40 ± 0.26<br>(7) | 1.72 ± 0.26**<br>(7) | 1.44 ± 0.34**<br>(7) |
| Fasted rats       | 2.50 ± 0.48<br>(7) | 1.92 ± 0.38**<br>(7) | 1.64 ± 0.28**<br>(7) |

Note. See note to Table 3.

TABLE 5  
Effects of Methylmalonate (MMA) and Propionate on *in Vitro*  $\beta$ -Hydroxybutyrate Dehydrogenase Activity ( $\mu\text{mole min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) in Brain of 15-Day-Old Rats

|             | Controls               | MMA                      |                          |
|-------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
|             |                        | 2.5 mM                   | 5 mM                     |
| Fed rats    | 1.25 $\pm$ 0.12<br>(7) | 1.04 $\pm$ 0.06**<br>(7) | 1.01 $\pm$ 0.16**<br>(7) |
| Fasted rats | 1.32 $\pm$ 0.13<br>(6) | 1.08 $\pm$ 0.23*<br>(6)  | 0.84 $\pm$ 0.12**<br>(6) |
|             | Controls               | Propionate               |                          |
|             |                        | 2 mM                     | 5 mM                     |
| Fed rats    | 1.12 $\pm$ 0.18<br>(4) | 1.26 $\pm$ 0.09<br>(4)   | 1.08 $\pm$ 0.101<br>(4)  |
| Fasted rats | 1.24 $\pm$ 0.04<br>(4) | 1.37 $\pm$ 0.12<br>(4)   | 1.27 $\pm$ 0.103<br>(4)  |

Note. See note to Table 3.

$n = 7$ ) compared to saline-treated rats ( $0.78 \pm 0.08 \mu\text{mole min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ,  $n = 8$ ), confirming our *in vitro* studies.

$\beta$ -Hydroxybutyrate levels ( $\mu\text{mole/ml}$ ) in blood of saline- and MMA-treated rats were also measured after a 30-hour fast; means and standard deviations were respectively  $0.119 \pm 0.042$ ,  $n = 14$ , and  $0.067 \pm 0.029$ ,  $n = 15$ , showing a significant difference ( $t = 3.765$ ,  $P < 0.01$ ). In an attempt to understand the diminished levels of HBA in blood of MMA-treated rats, we determined HBDH activity in liver of 30-hour fasted rats. We observed a significant *in vitro* inhibition of liver enzyme activity [ $F(2, 8) = 8.354$ ,  $P < 0.003$ ] provoked by MMA, but not by propionate (Table 6). It can be seen in the table that liver enzyme activity

TABLE 6  
Effect of Methylmalonate (MMA) and Propionate on *in Vitro*  $\beta$ -Hydroxybutyrate Dehydrogenase Activity ( $\mu\text{mole min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) in Liver of 15-Day-Old 30-hr-Fasting Rats

| Controls               | MMA                     |                          |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                        | 2.5 mM                  | 5 mM                     |
| 23.2 $\pm$ 0.63<br>(4) | 20.1 $\pm$ 0.50*<br>(4) | 17.7 $\pm$ 1.70**<br>(4) |
|                        | Propionate              |                          |
|                        | 2 mM                    | 5 mM                     |
| 23.7 $\pm$ 2.11<br>(4) | 22.9 $\pm$ 2.67<br>(4)  | 22.0 $\pm$ 2.4<br>(4)    |

Note. See note to Table 3.



is at least 10 times higher than that of brain. The influence of *in vivo* administration of MMA on this activity was also studied in fasting animals. MMA induced a significant ( $t = 2.848$ ,  $P < 0.01$ ) reduction in liver activity ( $20.7 \pm 3.9 \mu\text{mole min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ,  $n = 11$ ), compared to saline-injected rats ( $25.2 \pm 3.5 \mu\text{mole min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ,  $n = 11$ ), thus confirming the inhibition found in the *in vitro* studies.

## DISCUSSION

The main purpose of this study was to investigate the effects of methylmalonate and propionate on uptake of brain glucose and ketone bodies in developing rats. In the first few experiments, we observed that brain of fasting rats utilizes less glucose than brain of fed rats (Table 1, see controls). These results were expected since ketonemia decreases the rate of glucose utilization by brain of developing rats, probably as a result of the inhibition of phosphofructokinase and pyruvate dehydrogenase activities (11,12). In addition, we demonstrated that MMA augments glucose uptake by brain of fasting but not fed animals (Tables 1 and 2). Propionate had no effect on this parameter. At the moment we do not have an adequate explanation for these findings, but research is presently underway in our laboratory to assess critical steps of glucose metabolism in brain of young rats receiving MMA.

Data presented in Table 3 demonstrate that HBA influx into brain was inhibited by MMA and that this effect did not occur with AcAc. Even though in our system the blood-brain barrier was essentially removed, transport through membranes still exists. Competition of ketone bodies and MMA for transportation through membranes is unlikely; only once was HBA uptake affected. Our findings therefore indicate that MMA is not transported by the monocarboxylic membrane carrier system which transports both ketone bodies and other monocarboxylic acids. Previously, Halperin *et al.* (13), working with rat liver mitochondria, demonstrated that MMA is transported into and out of mitochondria by dicarboxylate and tricarboxylate transporters. On the other hand, propionate inhibited in a dose-response manner the utilization of both HBA and AcAc into brain, probably by competing with these metabolites for the same membrane carrier. It is well known that propionate, HBA, and AcAc share the same monocarboxylic carrier membrane transport system (14).

We also verified that the amounts of AcAc and HBA metabolized by cerebral tissue were similar (Tables 3 and 4, see controls), demonstrating that brain, devoid of a blood-brain barrier, has no preference for any of the substrates. However, looking at the findings of Wiener *et al.* (15) and Pearson *et al.* (16) showing that AcAc enters brain more freely than does HBA, it is concluded that the rate of individual ketone body extraction from blood is controlled by the barrier. We also observed that MMA significantly inhibits brain HBDH activity (Table 5). Rats injected with MMA also presented an inhibition of brain HBDH, which probably explains the partially blocked HBA uptake caused by MMA. To our knowledge, this is the first time such inhibition has been demonstrated in brain; nevertheless, Tan and colleagues (17) had already observed that MMA inhibits this enzyme activity in mitochondrial preparations of pig liver and of rat, pig, and bovine heart. We also tested MMA action on liver HBDH

activity and found a similar inhibition (Table 6). The latter observation probably explains the significantly lower blood levels of HBA in MMA-injected rats. Propionate, on the other hand, did not inhibit the enzyme, demonstrating that MMA effects were specific rather than a nonspecific effect due to an acidic compound.

Methylmalonate accumulates in large amounts in tissues of patients affected by methylmalonic acidemia, who also present with frequent episodes of ketosis and hypoglycemia. Concentrations of MMA found in cerebrospinal fluid and blood of these individuals (6,18) produced effects on brain glucose and HBA uptake and also on brain and liver HBDH activity in our experiments. In view of that, it is possible that some of our results may be relevant to an understanding of the biochemical alterations leading to mental retardation in these patients.

#### SUMMARY

Methylmalonate (MMA) and propionate effects on glucose and ketone body uptake *in vitro* by brain of fed and 30-hour-fasted 15-day-old rats were studied. In some experiments cerebrum prisms were incubated in the presence of glucose and either MMA or propionate in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.0. In others, the incubation medium contained  $\beta$ -hydroxybutyrate (HBA) or acetoacetate (AcAc) instead of glucose. We verified that MMA increased glucose uptake by brain of fasting animals, whereas propionate had no effect. In addition, MMA diminished HBA but not AcAc incorporation into brain prisms, whereas propionate provoked a diminished utilization of both ketone bodies by brain. The *in vitro* effect of MMA and propionate on brain and liver  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase activity was also investigated. It was shown that MMA but not propionate significantly inhibited this activity. Rats were also injected subcutaneously three times with a MMA buffered solution, and the *in vivo* effects of MMA on the above-mentioned parameters assessed. Results from these experiments confirmed the previously found *in vitro* MMA effects.

Methylmalonic acidemic patients accumulate primarily methylmalonate and secondarily propionate and other metabolites in their tissues at levels comparable to those we used in our assays. Most patients who survive early stages of the disease show a variable degree of neuromotor delay. Since glucose and sometimes ketones are the vital substrates for brain metabolism, it is possible that our findings may contribute to a certain extent to an understanding of the biochemical basis of mental retardation in these patients.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by project grants from FINEP, FAPERGS, CNPq, and PRO-PESP/UFRGS.

#### REFERENCES

1. Mellwain, H., and Bachelard, H. S., "Biochemistry and the Central Nervous System," 4th ed. Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1971.
2. Betz, A. L., Goldstein, G. W., and Katzman, R., in "Basic Neurochemistry" (G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, and P. B. Molinoff, Eds.), 4th ed., p. 591. Raven Press, New York, 1989.

3. Page, M. A., Krebs, H. A., and Williamson, D. H., *Biochem. J.* **121**, 49 (1971).
4. Kraus, H., Schelenker, S., and Schwedesky, D., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**, 167 (1974).
5. Cremer, J. E., and Heath, D. F., *Biochem. J.* **142**, 527 (1974).
6. Rosenberg, L. E., and Fenton, W. A., in "The Metabolic Basis of Inherited Disease" (C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, Eds.), p. 821. McGraw-Hill, New York, 1989.
7. Trinder, P., *J. Clin. Pathol.* **22**, 158 (1969).
8. Williamson, D. H., and Mellanby, J., in "Methods of Enzymatic Analysis" (H. V. Bergmeyer, Ed.), Vol. 4, p. 1840. Academic Press, New York, 1974.
9. Mellanby, J., and Williamson, D. H., in "Methods of Enzymatic Analysis" (H. V. Bergmeyer, Ed.), Vol. 4, p. 1836. Academic Press, New York, 1974.
10. Leong, S. F., Lai, J. C. K., Lim, L., and Clark, J. B., *J. Neurochem.* **37**, 1548 (1981).
11. Ziven, J. A., and Snarr, J. F., *J. Appl. Physiol.* **32**, 664 (1972).
12. Miller, A. L., Kiney, C. A., Corddry, D. H., and Station, D. M., *Dev. Brain Res.* **4**, 443 (1982).
13. Halperin, M. L., Schiller, C. M., and Frantz, I. B., *J. Clin. Invest.* **50**, 2276 (1971).
14. Steele, R. D., *Fed. Proc.* **45**, 2060 (1986).
15. Wiener, R., Hirsch, H. J., and Spitzer, J. J., *Amer. J. Physiol.* **220**, 1542 (1971).
16. Pearson, B., Settergress, G., and Dahlquist, G., *Acta Paediatr. Scand.* **61**, 273 (1972).
17. Tan, A. W. H., Smith, C. M., Aogaichi, T., and Plaut, G. W. E., *Arch. Biochim. Biophys.* **166**, 164 (1975).
18. Morrow, G., and Barnes, L., *J. Pediatr.* **74**, 691 (1969).

## EFFECT OF POSTNATAL METHYLMALONATE ADMINISTRATION ON ADULT RAT BEHAVIOR

J.C. DUTRA, M. WAJNER, C.M.D. WANNMACHER, L.E. WANNMACHER, R.F. PIRES and A. ROSA-JUNIOR

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050 Porto Alegre, RS, Brasil*

1. Methylmalonate (MMA) levels (2.0-2.5 mM) comparable to those of human methylmalonic acidemia were achieved in blood of young rats from the 5th to the 25th day of life by injecting the drug subcutaneously twice a day with an interval of 8 h. MMA doses ranged from 0.76 to 1.69  $\mu\text{mol/g}$  body weight as a function of animal age. MMA-treated rats had normal body and brain weights.

2. Behavioral studies using aversive and nonaversive tasks were performed at 60 days of life. Motor activity was similar in MMA-treated and saline-treated controls. No differences in performance between these groups were identified in the shuttle-avoidance responses and in the inhibitory avoidance tasks. However, MMA-injected rats escaped footshock faster than the controls ( $1.22 \pm 0.11$  vs  $1.76 \pm 0.14$  (mean  $\pm$  SEM) for 24 rats in each group ( $P < 0.01$ )) suggesting that they may be hyperreactive to this stimulus.

3. In the open field, a nonaversive behavior task, MMA-injected rats, in contrast to control rats, presented no habituation.

4. Our results suggest that MMA by itself may impair central nervous system function, causing minor disabilities which result in specific learning deficiencies.

**Key words:** methylmalonate, methylmalonic acidemia, behavior, avoidance, open field test.

### Introduction

Methylmalonic acidemia is an inherited disorder of organic acid metabolism caused by a deficiency of L-methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) activity, owing to a structural change of the apoenzyme or to a deficiency of the active cofactor cobalamin. As a consequence, primarily methylmalonate (MMA) and secondarily other metabolites accumulate in tissues of affected individuals. This usually results in a severe clinical disorder characterized by crises of lethargy, coma, persistent vomiting and muscular hypotonia. Failure to thrive and developmental retardation are common clinical findings in children who survive the early stages of the disease. Laboratory findings may include ketoacidosis, hypoglycemia, hyperglycinemia, hyperammonemia, anemia, leukopenia

---

Research supported by FINEP, CNPq and PROPESP/UFRGS.

Correspondence: Dr. C.M.D. Wannmacher, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050 Porto Alegre, RS, Brasil.

and thrombocytopenia. Restriction of protein content in the diet and cobalamin supplementation may improve clinical and laboratory alterations (Rosenberg and Fenton, 1989). L-carnitine plays a key role in clinical and biochemical management, particularly during acute crises (Chalmers et al., 1984).

We have recently produced high levels of methylmalonate in blood and brain of young rats by injecting the drug subcutaneously twice a day. We demonstrated that MMA-treated rats have less ganglioside-N-acetylneuraminic acid in their cerebellum (Wajner et al., 1988) and also observed that MMA increases glucose utilization by brain prisms of fasting rats (Dutra et al., 1989). In addition, MMA reduces beta-hydroxybutyrate but not acetoacetate incorporation by brain slices, probably because of an inhibition of beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activity (Dutra et al., 1991). Since, to our knowledge, no studies have been published about the developmental retardation associated with methylmalonic aciduria, we used our model system to determine the effects of long-term postnatal administration of methylmalonate on body and brain weight and on behavior of adult rats in aversive and nonaversive tasks.

## Material and Methods

### *Subjects*

A total of 436 Wistar rats from our breeding stock were used. Pregnant rats were housed in individual cages and left undisturbed throughout gestation. Twenty-four hours after delivery the litters were culled to eight pups. Half of the pups were assigned to the experimental group, and the other half served as control. The rats were weaned at 21 days. All animals had free access to food and water and were kept on a 12-h light/12-h dark cycle with lights on at 6.00 a.m. Temperature was maintained at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Animals were fed a non-purified diet (Germani, Porto Alegre, RS, Brazil) of the following composition: 20.5% protein (predominantly soybean), 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipid, 7% ash, and 10% moisture. Each kg of diet was enriched with the following: 8000 IU retinol, 1489.5 IU cholecalciferol, 2 mg menadione, 5 IU alpha-tocopherol, 2 mg pyridoxine, 10 mg cyanocobalamin, 3.3 mg riboflavin, 10 mg pantothenic acid, 2 mg nicotinic acid, 300 mg choline, 5 g sodium, 20 g calcium, 20 mg iron, 81 mg manganese, 48 mg zinc, 2 mg copper, 0.2 mg cobalt, 2 mg iodine, 6 g phosphorus, 100 mg antioxidant, and 700 mg methionine.

### *Methylmalonate administration and measurement*

Buffered MMA (Sigma), pH 7.2-7.4, was administered subcutaneously to the experimental group from the 5th to the 25th day of life. Doses varied according to age and were determined by measuring some pharmacokinetic parameters, such as apparent volume of distribution (Vd), plasma half-time ( $t_{1/2}$ ) and plasma clearance (CLp) after a

Table 1 - Pharmacokinetic parameters of methylmalonate (MMA) and doses administered as a function of animal age.

Values are reported as means for 10 animals of each age.  $t_{1/2}$ , Plasma half-time;  $V_d$ , apparent volume of distribution;  $CL_p$ , plasma clearance. MMA doses were calculated from pharmacokinetic parameters in order to achieve plasma MMA levels of 2.0-2.5 mM.

| Age<br>(days) | $t_{1/2}$<br>(min) | $V_d$<br>(ml/g) | $CL_p$<br>( $\mu\text{l min}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) | MMA<br>( $\mu\text{mol/g}$ ) |
|---------------|--------------------|-----------------|----------------------------------------------------|------------------------------|
| 5-12          | 70                 | 0.26            | 2.62                                               | 0.76                         |
| 13-17         | 56                 | 0.31            | 3.83                                               | 0.89                         |
| 18-22         | 32                 | 0.42            | 9.09                                               | 1.27                         |
| 23-25         | 26                 | 0.50            | 13.25                                              | 1.69                         |

single dose administration (Benet and Scheiner, 1987). Using these parameters, doses were calculated in order to achieve plasma levels of 2.0-2.5 mM, which are similar to those reported in methylmalonic acidemic children during a crisis (Table 1). Control rats received saline in the same volumes. Because of high plasma clearance, methylmalonate was administered twice a day with an interval of 8 h between injections.

Rats were sacrificed at 5, 10, 15, 25 or 90 days of life by decapitation. Blood was collected

on heparin for plasma separation. The brain was rapidly removed and the medulla, pons, and olfactory lobes were discarded. The rest of the brain was homogenized in saline. MMA was determined in brain homogenate and in plasma by the p-nitroaniline reaction (Giorgio and Plaut, 1965). The lower limit of reliable detectability of the method is 1  $\mu\text{mol}$ .

### Behavioral tasks

After saline or MMA administration was completed at 25 days of age rats were left undisturbed in their cages up to 45 days of age, when they were separated by sex. At 60 days of age they were submitted to behavioral testing. Rats of both sexes were used because we observed no influence of sex on the parameters studied. The animals were submitted to two aversive tasks (shuttle avoidance and inhibitory avoidance) and one nonaversive task (open-field habituation), all consisting of two sessions held 24 h apart. All observations were made between 10:00 and 12:00 a. m. and the observer did not know to which group the animals belonged. Boxes for the behavioral studies were cleaned with ethanol immediately after each rat was removed. Animals were completely randomized for treatment and observation. The number of animals submitted to each task is given in the tables. Rats from the control and from the experimental groups were taken from the same litter. Animals were used for one behavioral task only.

**Shuttle avoidance.** The apparatus was a 50 x 25 x 25-cm automated acrylic box (Albarsch) with a floor consisting of a series of 1-mm caliber parallel bronze bars divided at the midline by a 1-cm high acrylic hurdle. The bars on each side of the hurdle were connected to separate electric stimulators. The conditioned stimulus (CS) was a 5-s, 70-db, 1-kHz tone delivered through a loudspeaker attached to the rear wall of the box. Each tone was immediately followed by a 2-s, 0.8-mA footshock (unconditioned stimulus, US). Two consecutive sessions (one session per day) were held. All sessions were procedurally

identical: animals were left to explore the box for 5 min and then received 50-tone footshock trials with an intertrial interval randomly varying from 10 to 50 s. Animals avoided shocks by crossing the hurdle during the tone (CS). During a session, the rats would cross the midline of the box in one of three possible situations: during a tone presentation (avoidance response), during a shock delivery (escape response) and without US or CS presentation (intertrial crossing). Intertrial crossing was considered a measure of motor activity. The difference in shuttle avoidance responses between the first and second session was considered to be avoidance retention. The escape response was measured only during the first 10 tones of both sessions, in order to avoid learning interference during the same session. The difference in escape responses between the first and second session was taken to be a measure of footshock retention and latency of footshock escape was considered to be footshock reactivity (Vendite et al., 1985).

*Inhibitory avoidance.* The task was carried out using a 50 x 25 x 25-cm wood box with a front glass wall. The right side of the floor was a grid of 0.2 cm-diameter bronze bars spaced 1 cm apart and the left side was a 25 x 12 x 4-cm wood platform. The rats were gently held by their body and placed on the platform facing the rear left corner. During the first session, when the rats stepped down on the grid, a shock of 0.2-mA intensity was manually delivered until they climbed back onto the platform. The second session was similar to the first except that animals did not receive a footshock when they stepped down. The difference in step-down latency between the first and second session was taken to be a measure of retention and was limited to 180 s.

*Open field.* Rats were submitted to the open-field task in a wooden box measuring 60 x 40 x 50 cm with a front glass wall. Constant illumination was provided by an 8-W bulb. The floor was divided by white lines forming 12 equal squares. Animals were submitted to two similar sessions held 24 h apart. Rats were gently placed on the left posterior corner of the open field box and left to explore the arena for 2 min in each session. The number of complete crossings from one square to another was indicative of motor activity. The difference in the number of orientation responses (rearings) between the first and the second session was taken to be a measure of retention of habituation (Netto et al., 1986).

#### *Statistical analysis*

Body and brain weight data were analyzed by the Student *t*-test for unpaired samples. Behavioral task data were analyzed by two-way ANOVA with repeated measures (first and second sessions) and the other factor was drug treatment (La Mar and Stires, 1970). For post-hoc comparisons, F-test for simple effects or Duncan's multiple range test was used when appropriate (La Mar and Stires, 1970). F ratios are presented in the text only when  $P < 0.05$ . To satisfy the assumptions for analysis of variance, inhibitory avoidance data were subjected to log (x) transformation before analysis (Sokal and Rohlf, 1969).

## Results

Plasma MMA levels of rats injected with the drug were similar to those of methylmalonic acidemic patients (Rosenberg and Fenton, 1983). Thirty minutes after injection, these levels matched those of patients in crisis, decreasing slowly afterwards. Cerebral MMA levels were much lower and decreased with age (Table 2). Thirty minutes after injection, the brain/plasma ratios were 0.16 in 5 day-old rats, 0.09 in 10-day old rats and less than 0.02 in rats aged 15 days or older, indicating the low permeability of the blood-brain barrier to methylmalonate. To our knowledge, there are no data in the literature about brain MMA levels in patients with methylmalonic acidemia.

The body and brain weight of rats submitted to chronic MMA administration did not differ statistically from those of control rats when the data were analyzed by the Student *t*-test for unpaired samples (Table 3).

The data in Table 4 show shuttle avoidance and footshock escape responses of rats submitted to shuttle avoidance sessions using a 0.8-mA footshock. The number of avoidance responses showed a significant main effect for sessions ( $F(1,46) = 232.6$ ,

Table 2 - Methylmalonate (MMA) levels in plasma and brain of treated rats.

The column referring to time corresponds to time after subcutaneous injection of MMA. The doses were different for each age group (see text or Table 1) to obtain plasma MMA levels near 2-2.5 mM (200-250  $\mu\text{mol/dl}$ ). \* $P < 0.01$  vs 15, 20 and 25 days for each time after administration (Duncan's multiple range test).

| Time<br>(min)                      | Age (days)   |              |              |              |              |
|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                                    | 5            | 10           | 15           | 20           | 25           |
| Plasma MMA ( $\mu\text{mol/dl}$ )  |              |              |              |              |              |
| 30                                 | 230 $\pm$ 20 | 211 $\pm$ 10 | 207 $\pm$ 29 | 158 $\pm$ 19 | 252 $\pm$ 25 |
| 60                                 | 178 $\pm$ 18 | 123 $\pm$ 10 | 160 $\pm$ 19 | 64 $\pm$ 8   | 94 $\pm$ 9   |
| 90                                 | 139 $\pm$ 17 | 114 $\pm$ 10 | 106 $\pm$ 17 | 32 $\pm$ 3   | 38 $\pm$ 4   |
| 120                                | 143 $\pm$ 13 | 74 $\pm$ 7   | 68 $\pm$ 13  | 19 $\pm$ 3   | 6 $\pm$ 2    |
| Time<br>(min)                      | Age (days)   |              |              |              |              |
|                                    | 5            | 10           | 15           | 20           | 25           |
| Brain MMA ( $\mu\text{mol/100g}$ ) |              |              |              |              |              |
| 30                                 | 36 $\pm$ 5*  | 19 $\pm$ 3*  | 4 $\pm$ 2    | 3 $\pm$ 1    | 3 $\pm$ 1    |
| 60                                 | 17 $\pm$ 5*  | 19 $\pm$ 6*  | 3 $\pm$ 1    | 3 $\pm$ 2    | 3 $\pm$ 1    |
| 90                                 | 25 $\pm$ 7*  | 17 $\pm$ 1*  | 3 $\pm$ 1    | 4 $\pm$ 1    | 4 $\pm$ 2    |
| 120                                | 25 $\pm$ 6*  | 11 $\pm$ 3*  | 1 $\pm$ 1    | 2 $\pm$ 1    | 3 $\pm$ 1    |



Table 3 - Effect of chronic methylmalonate (MMA) administration on body and brain weights of rats.

Rats received MMA subcutaneously from day 5 to day 25 of life. The dose schedule was varied to obtain plasma levels of 2-2.5 mM (see text or Table 1). Data are reported as means  $\pm$  SEM for 8 rats per group. There were no statistical differences between MMA- and saline-treated rats.

| Age            | Weight            |                   |
|----------------|-------------------|-------------------|
|                | Saline            | MMA               |
| 25 days        |                   |                   |
| Body (g)       | 47.13 $\pm$ 1.11  | 46.34 $\pm$ 0.96  |
| Cerebrum (g)   | 0.88 $\pm$ 0.01   | 0.88 $\pm$ 0.01   |
| Cerebellum (g) | 0.174 $\pm$ 0.004 | 0.178 $\pm$ 0.003 |
| 3 months       |                   |                   |
| Body (g)       | 255.3 $\pm$ 7.68  | 240.3 $\pm$ 7.65  |
| Cerebrum (g)   | 1.05 $\pm$ 0.01   | 1.05 $\pm$ 0.006  |
| Cerebellum (g) | 0.270 $\pm$ 0.04  | 0.260 $\pm$ 0.04  |

and MMA-treated rats in both sessions. Analysis of intertrial crossing showed a significant main effect for sessions ( $F(1,46) = 51.91$ ,  $P < 0.005$ ). Post-hoc comparisons by the F-test for simple effects indicated that the motor activity of both the saline ( $F(1,46) = 38.4$ ,  $P < 0.005$ ) and MMA ( $F(1,46) = 16.3$ ,  $P < 0.005$ ) groups was increased in the second session. Results of avoidance responses and intertrial crossing suggest that MMA does not

$P < 0.005$ ). Post-hoc comparisons by the F-test for simple effects demonstrated that the number of avoidance responses increased during the second session in both the saline ( $F(1,46) = 141.9$ ,  $P < 0.005$ ) and MMA ( $F(1,46) = 93.0$ ,  $P < 0.005$ ) groups. These data demonstrate that both groups improved their performance along sessions, indicating retention of this task. The number of avoidance responses was the same in control

Table 4 - Effect of chronic methylmalonate (MMA) administration on shuttle avoidance behavior of adult rats.

Rats received MMA subcutaneously from day 5 to day 25 of life. The dose schedule was varied to obtain plasma levels of 2-2.5 mM (see text or Table 1). Data are reported as means  $\pm$  SEM for 24 rats per group. Animals were submitted to 50 trials using a 0.8-mA footshock. \* $P < 0.005$  compared to the first session for the same group (F-test for simple effects). # $P < 0.01$  compared to the other group for the same session (Duncan's multiple range test).

|                                              | Saline           |                   | Methylmalonate   |                   |
|----------------------------------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|                                              | First session    | Second session    | First session    | Second session    |
| Avoidance response (number)                  | 30.71 $\pm$ 0.78 | 45.37* $\pm$ 0.53 | 33.50 $\pm$ 1.39 | 45.37* $\pm$ 0.72 |
| Intertrial crossing (number)                 | 23.08 $\pm$ 2.90 | 44.33* $\pm$ 3.84 | 21.33 $\pm$ 2.36 | 35.20* $\pm$ 3.73 |
| Escape latency during the first 10 tones (s) | 1.76 $\pm$ 0.14  | 0.52* $\pm$ 0.03  | 1.22# $\pm$ 0.11 | 0.53* $\pm$ 0.06  |

Table 5 - Effect of chronic methylmalonate (MMA) administration on inhibitory avoidance behavior of adult rats.

Rats received MMA subcutaneously from day 5 to day 25 of life. The dose schedule was varied to obtain plasma levels of 2-2.5 mM (see text or Table 1). Data are reported as means  $\pm$  SEM for 24 rats per group. Animals were submitted to 50 trials using a 0.8-mA footshock. \* $P < 0.005$  compared to the first session for the same group (F-test for simple effects).

| Group  | Step-down latency (s) |                    |
|--------|-----------------------|--------------------|
|        | First session         | Second session     |
| Saline | 2.304 $\pm$ 0.167     | 4.453 $\pm$ 0.180* |
| MMA    | 2.013 $\pm$ 0.111     | 4.233 $\pm$ 0.228* |

affect retention or motor activity in this task. There was a significant main effect on escape response times for sessions ( $F(1,46) = 85.47$ ,  $P < 0.005$ ). Post-hoc comparisons by the F-test for simple effects indicated that escape latency was reduced in both the saline ( $F(1,46) = 69.2$ ,  $P < 0.005$ ) and MMA ( $F(1,46) = 21.4$ ,  $P < 0.005$ ) groups in the second session. ANOVA also showed a significant main effect of treatments ( $F(1,46) = 5.093$ ,  $P < 0.03$ ). Group-by-session interaction was significant ( $F(1,46) = 7.12$ ,  $P < 0.01$ ) and post-hoc comparisons by Duncan's multiple range test demonstrated that MMA-treated rats escaped significantly faster than control

rats in the first ( $P < 0.01$ ) but not in the second session. Since rats of both groups received the same mean number of footshocks during the first 10 tones in each session (6.0 in the first and 3.0 in the second), these results suggest that MMA does not affect footshock retention but did increase footshock reactivity.

In the inhibitory avoidance sessions (Table 5), analysis of variance showed a significant main effect for sessions ( $F(1,46) = 152.24$ ,  $P < 0.001$ ). Post-hoc comparisons by the F-test for simple effects demonstrated that both the saline ( $F(1,46) = 73.9$ ,  $P < 0.005$ ) and MMA ( $F(1,46) = 78.8$ ,  $P < 0.005$ ) groups had a good retention of the task, as shown by the significant increase in latency detected in the second session (Izquierdo and Dias, 1983). Since group-by-session interaction was not significant and no differences in latencies were observed between groups, it seems that MMA does not interfere with this task.

Table 6 reports the results of open-field behavior. Analysis of the number of rearings demonstrated a significant main effect for sessions ( $F(1,54) = 8.12$ ,  $P < 0.01$ ). Post-hoc comparisons by the F-test for simple effects showed that the number of rearings decreased significantly in the second session only in saline-injected rats ( $F(1,54) = 14.48$ ,  $P < 0.005$ ). In addition, group-by-session interaction was significant ( $F(1,54) = 5.95$ ,  $P < 0.02$ ), further indicating the effect of MMA in retention of habituation. The number of crossings (motor activity) did not differ between experimental and control groups in either session.

## Discussion

In this study we produced high MMA levels in the blood of rats (2-2.5 mM) similar to those reported for methylmalonic acidemic patients during a crisis (Rosenberg

Table 6 - Effect of chronic methylmalonate (MMA) administration on open-field behavior of adult rats.

Rats received MMA subcutaneously from day 5 to day 25 of life. The dose schedule was varied to obtain plasma levels of 2-2.5 mM (see text or Table 1). Data are reported as means  $\pm$  SEM for 21 rats per group. Animals were submitted to 50 trials using a 0.8-mA footshock. \* $P < 0.005$  compared to the first session for the same group (F-test for simple effects).

| Group  | Number of rearings |                  | Number of crossings |                  |
|--------|--------------------|------------------|---------------------|------------------|
|        | First session      | Second session   | First session       | Second session   |
| Saline | 12.33 $\pm$ 0.52   | 9.09* $\pm$ 0.70 | 41.86 $\pm$ 1.83    | 43.76 $\pm$ 3.01 |
| MMA    | 12.14 $\pm$ 0.96   | 12.05 $\pm$ 0.90 | 41.29 $\pm$ 1.72    | 45.33 $\pm$ 2.09 |

and Fenton, 1989) occurring at a time of rapid development of brain structures, when the patients are theoretically more susceptible to their effects. In rats, various cerebral structures involved in learning/memory mostly develop during the first four weeks of postnatal life (Fish and Winick, 1969), which was the time when MMA was administered in the present study. Our main objective was to determine the effect of long-term postnatal MMA administration on adult rat behavior in various tasks, rather than simply mimic methylmalonic acidemia.

At present, data available on the *in vitro* and *in vivo* effects of MMA on various biochemical parameters in liver and brain indicate that exogenously administered MMA reaches the intracellular pools and affects some cytosolic and intramitochondrial activities or functions (Halperin et al., 1971; Patel et al., 1976; Arinze et al., 1979; Wajner et al., 1988; Dutra et al., 1989, 1991).

In the present study we showed that long-term MMA administration did not affect the body weight or the brain weight of rats. Therefore, it is possible that other factors such as frequent metabolic crises leading to a diminished food intake or even unpleasant diets may be responsible for the delayed physical development of individuals affected by methylmalonic acidemia. Propionate, tiglate and long-chain ketones, which also accumulate in this disorder, might also be responsible for this finding, but this hypothesis has not been tested.

Since behavioral tasks performed during or soon after chronic treatment may be difficult to interpret (Andersen and Guroff, 1972), we studied behavior 5 weeks after the end of treatment. This also permitted us to assess long-standing behavioral changes possibly secondary to permanent damage of the central nervous system. We found that motor activity was not affected by MMA treatment in the open-field task, in contrast to the muscular hypotonia found in affected children. The increase in intertrial crossings during the shuttle-avoidance task was probably related to the aversive situation, since the phenomenon was of the same order of magnitude in both the experimental and control groups.

Early chronic administration of methylmalonate did not affect the overall performance of adult animals in the active and inhibitory avoidance sessions. Animals

appeared to have learned both tasks. However, in the shuttle-avoidance task the rats who received MMA presented a significantly faster footshock escape behavior than saline-treated rats only during the first session, suggesting that the MMA-treated rats were hyperreactive to this stimulus. Vendite et al. (1985) also observed that adult rats undernourished during lactation were hyperreactive to an electric stimulus after a 0.2-mA footshock in the first 10 trials of the first session, but not in the second session. The authors suggest that hyperreactivity reflected a lowering of the threshold to electric response, not observed in the second session because rats learned to escape more rapidly.

In the open-field test, MMA-treated animals presented no significant differences in rearing responses between the first and second session, whereas the control rats did, demonstrating a group-by-session interaction. In the open-field box, rats present an exploratory behavior consisting of locomotor activity, rearing, grooming, and defecation, among others. Habituation to the novel environment is expressed by reduction of such activities. Retention of habituation can be measured during a second exposure by the difference in the parameter between the first and second session. Since a reduction in number of rearings along sessions in the open field can be interpreted to indicate that animals recognize the environment (Netto et al., 1986), and since in the present study we did not observe retention of habituation in MMA-treated rats, it is assumed that this reflects a nonessential learning impairment. Our results therefore suggest that the open-field behavior, a nonaversive task, may be a more sensitive parameter for detecting fine learning disabilities than tasks employing aversive stimuli. They also agree with the view of others (Strupp et al., 1984) who, working with phenylketonuric rats, concluded that nonessential tasks are more appropriate to identify small learning deficits than essential learning tasks in which animals must learn in order to satisfy immediate biological needs such as obtaining food or escaping aversive stimulation. Within this context, it should be mentioned that mentally retarded humans perform like nonretardates in tests of classical conditioning, but, because of their poor ability to spontaneously acquire information, present much difficulty in tackling a new situation which requires past experience (Zeaman and House, 1967; Estes, 1970). It is therefore possible that behavioral studies involving experimental models, particularly those using situations without aversive stimuli, can serve as a screening to detect tenuous learning disabilities in certain pathologies having mental retardation in common. Additional studies using other nonessential learning tasks are necessary to corroborate this hypothesis.

We have previously demonstrated that ganglioside-N-acetylneuraminic acid is reduced in the cerebellum of MMA-treated rats and that MMA increases glucose uptake *in vitro* by the brain of 15-day old rats, the latter being probably related to an inhibition of succinate dehydrogenase (Wajner et al., 1988; Dutra et al., 1989). It has also been demonstrated that an increase in cerebral and cerebellar ganglioside-N-acetylneuraminic acid is associated with improved behavioral performance in the open field (Morgan and Winick, 1980a,b) and in other tasks (Winick, 1976; Savaki and Levis, 1977) and that glucose seems to be important in the modulation of memory storage processing (Gold, 1986; Gold et al., 1986). Our results suggest that MMA-treated animals did not present

habituation in the open-field box. Even though at the present time it is difficult to correlate learning deficits with biochemical defects, it is possible that the biochemical alterations in ganglioside content and in glucose uptake provoked by MMA may be related to the behavioral changes observed in MMA-treated rats.

## References

- Andersen RE & Guroff G (1972). Enduring behavioral changes in rats with experimental phenylketonuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 69: 863-867.
- Arinze LJ, Waters D & Donaldson MK (1979). Effect of methylmalonic acid on gluconeogenesis in isolated rat and guinea-pig hepatocytes. *Biochemical Journal*, 184: 717-719.
- Benet LZ & Scheiner LB (1987). Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: Gilman AG, Goodman LS, Rall TW & Murad F (Editors), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. MacMillan Publishing Company, New York, 3-34.
- Chalmers RA, Stacey TE, Tracey BM, Sousa C, Roe CR, Millington DS & Hoppel CL (1984). L-Carnitine insufficiency in disorders of organic acid metabolism: response to L-carnitine by patients with methylmalonic aciduria and 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 7: 109-110.
- Dutra JC, Wajner M, Wannmacher CF & Wannmacher CMD (1989). Methylmalonate increases glucose uptake *in vitro* by brain of young rats. *Biochemical Society Transactions*, 17: 572-573.
- Dutra JC, Wajner M, Wannmacher CF, Dutra-Filho CS & Wannmacher CMD (1991). Effects of methylmalonate and propionate on uptake of glucose and ketone bodies *in vitro* by brain of developing rats. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 45: 56-64.
- Estes WK (1970). *Learning and Mental Development*. Academic Press, New York.
- Fish I & Winick M (1969). Effect of malnutrition on regional growth of the developing rat brain. *Experimental Neurology*, 25: 534-540.
- Giorgio AJ & Plaut GWE (1965). A method for the colorimetric determination of urinary methylmalonic acid in pernicious anemia. *Journal of Clinical Medicine*, 66: 667-676.
- Gold PE (1986). Glucose modulation of memory storage processing. *Behavioral and Neural Biology*, 45: 342-349.
- Gold PE, Vogt J & Hall JL (1986). Glucose effects on memory: behavioral and pharmacological characteristics. *Behavioral and Neural Biology*, 46: 145-155.
- Halperin ML, Schiller CM & Fritz IB (1971). The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *Journal of Clinical Investigation*, 50: 2276-2282.
- Izquierdo I & Dias RD (1983). Memory as a state-dependent phenomenon: role of ACTH and epinephrine. *Behavioral and Neural Biology*, 38: 144-151.
- La Mar N & Stires A (1970). *The Design of Educational Experiments*. McGraw-Hill, New York.
- Morgan BLG & Winick M (1980a). Effects of administration of N-acetylneuraminic acid (NANA) on brain NANA content and behavior. *Journal of Nutrition*, 110: 416-424.
- Morgan BLG & Winick M (1980b). Effects of environmental stimulation on brain N-acetylneuraminic acid content and behavior. *Journal of Nutrition*, 110: 425-432.
- Netto CA, Dias RD & Izquierdo I (1986). Differential effect of posttraining naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock administration upon memory of an open-field habituation and of a water-finding task. *Psychoneuroendocrinology*, 11: 437-446.
- Patel MS, Owen OE & Raefsky C (1976). Effect of methylmalonate on ketone body metabolism in developing rat brain. *Life Sciences*, 19: 41-48.
- Rosenberg LE & Fenton WA (1989). Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS & Valle D (Editors), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 6th edn. McGraw-Hill, New York, 821-844.

- Savaki HE & Levis GM (1977). Changes in rat brain gangliosides following active avoidance conditioning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 7: 7-12.
- Sokal RR & Rohlf FJ (1969). *Biometry*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Strupp BJ, Levitsky DR & Blumstein L (1984). PKU, learning and models of mental retardation. *Developmental Psychobiology*, 17: 109-120.
- Vendite D, Wofchuk S & Souza DO (1985). Effects of undernutrition during suckling on footshock escape behavior and on related neurochemical parameters in rats. *Journal of Nutrition*, 115: 1418-1424.
- Wajner M, Brites EC, Dutra JC, Buchalter MS, Pons AH, Pires RF, Wannmacher LE, Rosa-Jr. A, Trindade VM & Wannmacher CMD (1988). Diminished concentrations of ganglioside-N-acetylneuraminic acid (G-NeuAc) in cerebellum of young rats receiving chronic administration of methylmalonic acid. *Journal of Neurological Sciences*, 85: 233-238.
- Winick M (1976). *Malnutrition and Brain Development*. Oxford University Press, London.
- Zeaman D & House BJ (1967). The relation of I.Q. and learning. In: Gagne RM (Editor), *Learning and Individual Differences*. Charles E. Merrill Books, Columbus, 192-212.

Received December 14, 1990

Accepted July 2, 1991

## Effect of Methylmalonate on *in vitro* Lactate Release and Carbon Dioxide Production by Brain of Suckling Rats

M. WAJNER, J. C. DUTRA, S. E. CARDOSO, M. D. WANNMACHER  
and E. R. DE MOTTA

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, UFRGS – Rua Sarmento  
Leite 500, 90.050 Porto Alegre, RS Brazil

**Summary:** Methylmalonate (MMA) accumulates in the tissues of patients with methylmalonic acidemia who present severe neurological signs soon after birth and later mental retardation. Attempting to understand the pathophysiology of the disorder, we investigated the effects of MMA on brain glucose uptake, lactate release and CO<sub>2</sub> production. Glucose uptake and lactate release were studied by incubating 40 μm wide brain prisms from 15-day-old rats in Krebs–Ringer bicarbonate buffer, pH 7.0, containing 5.0 mmol/L glucose and one of three concentrations of MMA (1.0, 2.5 and 5.0 mmol/L). Controls did not contain MMA in the incubation medium. MMA induced a significant increase of lactate production in a dose-dependent pattern that was proportional to glucose uptake by the brain prisms. We also studied the influence of MMA on brain CO<sub>2</sub> production from [2-<sup>14</sup>C]glucose and [U-<sup>14</sup>C]acetate by incubating brain prisms in the same buffer in the presence of the substrates with (experimental groups) or without (controls) 5.0 mmol/L MMA. MMA significantly reduced CO<sub>2</sub> formation from both substrates.

Methylmalonate (MMA) accumulates in blood and tissues of patients affected by the group of inherited disorders called methylmalonic acidemia (McKusick 27741, 25112, 27738, 25100, 25110, 25111). Affected children present neurological abnormalities and a variable degree of physical and mental retardation. Very little has been done to identify the mechanisms underlying the neurological dysfunction of these patients. We have previously found that MMA induces a higher glucose utilization by brain of fasting young rats (Dutra *et al.*, 1989, 1991). Since brain of young mammals releases considerable amounts of lactate into blood (Hawkins *et al.*, 1971; Cremer and Health, 1974; Dahlquist and Persson, 1976), in this study we investigated the effect of MMA on lactate and CO<sub>2</sub> production by rat brain in an attempt to better understand the fate of the augmented brain glucose uptake provoked by this acidic metabolite. Since

---

\*Correspondence

MS received 17.4.91 Accepted 22.7.91

conversion of glucose into lactate by brain is higher during fasting and also in young animals (Hawkins *et al.*, 1971), we used 15-day-old fasting rats in our experiments.

## MATERIAL AND METHODS

Wistar rats were used. Free water and a 20% (w/w) protein chow were provided. A mother and eight pups were kept per cage. The animals were fasted for 30 h before the experiments by separating them from the mothers. The rats were killed by decapitation without anaesthesia at 15 days of age. The brain was rapidly removed, and the olfactory bulbs, cerebellum and pons/medulla were discarded. The rest of brain (cerebrum) was cut with a McIlwain's chopper into prisms of 40  $\mu$ m width. Brain prisms were incubated under an O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (19:1, v/v) mixture at 37°C for 30 min in Krebs–Ringer bicarbonate buffer, pH 7.0 (100 mg of tissue/ml of buffer) containing 5.0 mmol/L glucose and one of three concentrations of MMA (1.0, 2.5 or 5.0 mmol/L). Controls did not contain MMA in the incubation medium. Glucose and lactate were determined at the beginning and at the end of incubation by the glucose oxidase method of Trinder (1969) and by the method of Gutmann and Wahlefeld (1974), respectively. The glucose uptake or lactate release was achieved by subtracting the amounts found after the incubation from the amounts found before the incubation. Lactate was measured in the supernatant after perchloric acid (PCA) addition. Lactate levels at the beginning of the incubation were practically nil. Glucose concentrations were determined in aliquots of the buffer taken immediately before PCA was added to the medium.

Carbon dioxide production from [2-<sup>14</sup>C]glucose (specific activity 55.0 mCi/mmol) and [U-<sup>14</sup>C]acetate (specific activity 55.1 mCi/mmol) was also measured according to Kasser *et al.* (1986) with some modifications. Briefly, 100 mg of brain prisms were incubated at 37°C for 1 h in 1.0 ml of Krebs–Ringer bicarbonate buffer, pH 7.0, supplemented by 2.5 mmol/L glucose and 0.1  $\mu$ Ci of labelled glucose or 5.0 mmol/L glucose, 5.0 mmol/L acetate and 0.2  $\mu$ Ci of labelled acetate. The experimental groups also contained 5.0 mmol/L MMA. The flasks were gassed with O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (19:1, v/v) mixture and sealed with rubber stoppers equipped with hanging centre wells where a Whatman No. 3 filter paper (1.5  $\times$  6.5 cm) was introduced. After incubation, 0.15 ml of hyamine hydroxide was added to the filter-containing centre well of each flask and the reaction was stopped by the addition of 0.25 ml of 50% (w/v) trichloroacetic acid to the medium. Carbon dioxide produced during incubation was trapped for 30 min in the filters immersed in hyamine hydroxide; the filters were removed and placed in vials containing scintillation fluid and the radioactivity was determined in an LKB scintillation counter.

Statistical analysis was done by one-way ANOVA and *post hoc* tests were carried out by Duncan's multiple range test whenever necessary. Student's *t*-test and linear regression analysis were also used.



## RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows that MMA produced a significant increase of lactate release by brain from 15-day-old fasting rats ( $F(3,28) = 4.365$ ,  $p < 0.01$ ), and the calculated linear regression coefficient for repeated sampling for a given drug concentration (0.259,  $p < 0.05$ ) indicates that this effect occurs in a dose-dependent pattern. Since the carrier-mediated transport system for lactate is well developed in immature brain (Cremer *et al.*, 1979), and since MMA uses other carrier systems (dicarboxylate and tricarboxylate carriers) than that used by lactate (carrier for monocarboxylic acids) (Halperin *et al.*, 1971; Oldendorf, 1971), it is difficult to postulate an interference of MMA on lactate transport. We therefore assume that brain lactate release in our assay represents lactate production.

Total brain glucose uptake also increased with MMA concentrations in the incubation medium ( $F(3,28) = 2.215$ ,  $p < 0.05$ ) (Table 1) in a dose-dependent pattern (regression coefficient 0.774,  $p < 0.05$ ), thus confirming our previous findings (Dutra *et al.*, 1989, 1991). The table also shows that lactate production was proportional to glucose utilization, leading one to speculate that the increment in brain glucose uptake caused by MMA was mainly diverted to lactate. In fact, if we consider separately glucose transformed into lactate (1 mol of glucose giving rise to 2 mol of lactate) and glucose used in other pathways, by subtracting the former from total glucose uptake, it can be noted that there is no effect of MMA on glucose utilized by other routes ( $F(3,28) = 1.63$ ,  $p < 0.20$ ). Therefore, it is possible that the increase of brain glucose uptake caused by MMA may occur because of the high rate of lactate formation. Furthermore, as lactate and pyruvate share the same carrier transport through the mitochondrial membrane, different from the one used by MMA, it is unlikely that MMA could inhibit pyruvate transport and thus divert it to lactate production.

It should also be pointed out that the rate of lactate production from glucose in our *in vitro* system is in accordance with that described in the literature; that is, that brain tissue, even when it is at rest and well oxygenated, generates lactate which is

Table 1 Methylmalonate (MMA) action on lactate release and glucose uptake by brain of 15-day-old fasting rats<sup>a</sup>

|                                              | Controls    | MMA (mmol/L) |                          |                          |
|----------------------------------------------|-------------|--------------|--------------------------|--------------------------|
|                                              |             | 1.0          | 2.5                      | 5.0                      |
| Lactate release                              | 4.39 ± 0.70 | 5.24 ± 0.99  | 5.72 ± 0.78 <sup>c</sup> | 5.83 ± 1.02 <sup>c</sup> |
| Total glucose uptake                         | 24.6 ± 2.67 | 28.3 ± 4.24  | 28.9 ± 3.20 <sup>c</sup> | 29.3 ± 5.62 <sup>c</sup> |
| Glucose uptake for lactate                   | 2.19 ± 0.35 | 2.62 ± 0.49  | 2.86 ± 0.39 <sup>c</sup> | 2.91 ± 0.50 <sup>c</sup> |
| Glucose uptake for other routes <sup>b</sup> | 22.4 ± 2.86 | 25.6 ± 4.47  | 26.1 ± 3.08              | 26.4 ± 5.26              |

<sup>a</sup>Data represent mean ± SD (number of cases = 8 for each group) and are expressed as μmol/h per g of brain of lactate release or glucose uptake. Differences between means of the various groups calculated by one-way ANOVA, followed by the Duncan's multiple range test when suitable

<sup>b</sup>See Results and Discussion

<sup>c</sup>Significant increase over control

removed in the venous blood, accounting for 5–13% of the pyruvate produced by glycolysis (Clarke *et al.*, 1989). Glucose can also enter other pathways such as the pentose shunt, which is relatively inactive in rat brain under basal conditions, with about 2–3% of the glucose consumed proceeding via this route. This pathway has relatively high activity in developing brain, reaching a peak during myelination, probably to produce the NADPH required for the lipid synthesis (Seisjo, 1978).

Glucose can follow other routes, but the exact contributions to these pathways are still unknown. It has been shown that labelled glucose appears in carbon dioxide much more slowly than might be expected, and this is because large amounts of radioactivity are trapped in amino acids related to the Krebs cycle and in other chemical constituents of the brain. Large pools of glutamate and aspartate, as well as  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), glutamine and alanine, are formed from radioactive glucose, and this is probably due to the high activity of transaminases in comparison with the flux through the citric acid cycle (Bradford, 1986).

The effect of MMA on CO<sub>2</sub> formation is shown in Table 2. It is clear from the table that MMA significantly diminishes CO<sub>2</sub> production from both substrates, the effect being more pronounced with acetate. Taken together, these results indicate that aerobic glycolysis is blocked by MMA, probably in a step at or below the Krebs cycle. Therefore, it appears that more pyruvate is diverted to lactate instead of being oxidized in the Krebs cycle. This is in agreement with our previous findings showing that MMA inhibits brain succinate dehydrogenase activity in a dose-response way (Dutra *et al.*, 1989).

In conclusion, in view of our present studies showing a high rate of brain lactate production secondary to the presence of MMA in the medium, and from previous studies demonstrating that MMA inhibits brain succinate dehydrogenase activity, it is quite possible that the increment of brain glucose utilization produced by MMA can be at least partly attributed to an increased anaerobic glycolysis. It should also be emphasized that the concentration of MMA required for a significant stimulation of glucose uptake and lactate production is similar to that reported in cerebrospinal fluid and tissues of patients affected by methylmalonic acidemia (Rosenberg and Fenton, 1989). Whether the same findings also occur in man and whether this is relevant to methylmalonic acidemia is a subject for further investigation.

Table 2 The influence of methylmalonate (MMA) on carbon dioxide formation in brain prisms of suckling fasting rats\*

| Substrate                                                                   | Controls       | MMA (5.0 mmol/L)  |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------|
| [2- <sup>14</sup> C]glucose<br>+ 2.5 mmol/L glucose                         | 381 ± 73.4 (7) | 305 ± 33.9 (7)*   |
| [U- <sup>14</sup> C]acetate<br>+ 5.0 mmol/L glucose<br>+ 5.0 mmol/L acetate | 110 ± 17.4 (3) | 73.1 ± 13.6 (3)** |

\*Data represent mean ± SD (number of cases in parentheses) and are expressed as nmol/h per g of brain of CO<sub>2</sub> production. Differences between means of experimental and control groups calculated by the Student's *t*-test  
Significant differences compared to controls: \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01

## 158 ACKNOWLEDGEMENTS

159 This work was partly supported by grants from CNPq, FINEP and FAPERGS.

## 160 REFERENCES

- 162 Bradford, H. F. *Chemical Neurobiology: An Introduction to Neurochemistry*, W. F. Freeman,  
163 New York, 1986, pp. 118–154
- 164 Clarke, D. D., Lajtha, A. L. and Maker, H. S. Intermediary metabolism. In Siegel, G., Agranoff,  
165 B., Albers, R. W. and Molinoff, P. (eds.) *Basic Neurochemistry*, Raven Press, New York,  
166 1989, pp. 541–564
- 167 Cremer, J. E. and Health, D. F. The estimations of rates of utilization of glucose and ketone  
168 bodies in the brain of the suckling rat using compartmental analysis of isotopic data.  
169 *Biochem. J.* 142 (1974) 527–544
- 170 Cremer, J. E., Cunningham, V. J., Pardridge, W. M., Braun, L. D. and Oldendorf, W. H.  
171 Kinetics of blood–brain barrier transport of pyruvate, lactate and glucose in suckling,  
172 weanling and adult rats. *J. Neurochem.*, 33 (1979) 439–445
- 173 Dahlquist, G. and Persson, B. The rate of cerebral utilization of glucose, ketone bodies and  
174 oxygen: a comparative *in vivo* study of infant and adult rats. *Pediatr. Res.* 10 (1976)  
175 910–917
- 176 Dutra, J. C., Wajner, M., Wannmacher, C. F. and Wannmacher, C. M. D. Methylmalonate  
177 increases glucose uptake *in vitro* by brain of young rats. *Biochem. Soc. Trans.* 17 (1989)  
178 572–573
- 179 Dutra, J. C., Wajner, M., Wannmacher, C. F., Dutra-Filho, C. S. and Wannmacher, C. M. D.  
180 Effects of methylmalonate and propionate on uptake of glucose and ketone bodies *in vitro*  
181 by brain of developing rats. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 45 (1991) 56–64
- 182 Gutmann, I. and Wahlefeld, A.W. L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase  
183 and NAD. In Bergmeyer, H.U. (ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 3, Verlag Chemie,  
184 Weinheim, Academic Press, New York, 1974, pp. 1464–1468
- 185 Halperin, M. L., Schiller, C. M. and Fritz, I. B. The inhibition by methylmalonic acid of  
186 malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *J. Clin. Invest.* 50  
187 (1971) 2276–2282
- 188 Hawkins, R. A., Williamson, D. H. and Krebs, H. A. Ketone body utilization by adult and  
189 suckling rat brain *in vitro*. *Biochem. J.* 122 (1971) 13–18
- 190 Kasser, T. R., Deutch, A. and Martin, R. J. Uptake and utilization of metabolites in specific  
191 sites relative to feeding status. *Physiol. Behav.* 36 (1986) 1161–1165
- 192 Oldendorf, W. F. Blood–brain barrier permeability to lactate. *Eur. Neurol.* 6 (1971) 49–55
- 193 Rosenberg, L. E. and Fenton, W. A. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism.  
194 In Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D. (eds.) *The Metabolic Basis of*  
195 *Inherited Disease*, 6th edn., McGraw Hill, Inc., New York, 1989, pp. 821–844
- 196 Trinder, P. A. Determination of blood glucose using an oxidase–peroxidase system with a  
197 non-carcinogenic chromogen. *J. Clin. Pathol.* 22 (1969) 158–161
- 198 Seisjo, B. K. *Brain Energy Metabolism*, Wiley, Chichester, 1978