

IRANY ACHILES DENTI

**EVIDÊNCIAS DE SINERGISMO ENTRE A HIPERAMONEMIA
E O ÁCIDO METILMALÔNICO SOBRE PARÂMETROS
BIOENERGÉTICOS E INFLAMATÓRIOS EM RIM E FÍGADO
DE RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
Título de Doutor em Ciências da
Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia
Fernanda Schuck.

**CRICIÚMA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

D414e Denti, Irany Achilles.

Evidências de sinergismo entre a hiperamonemia e o ácido metilmalônico sobre parâmetros bioenergéticos e inflamatórios em rim e fígado de ratos / Irany Achilles Denti ; orientador : Patrícia Fernanda Schuck. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.
94 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Acidemia metilmalônica. 2. Hiperamonemia. 3. Erros inatos do metabolismo. 4. Ácido metilmalônico. 5. Rins – Inflamação. 6. Fígado – Inflamação. I. Título.

CDD 22. ed. 616.042

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisas e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

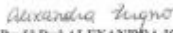
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Irany Achilles Dentil** sob o título “Evidências de sinergismo entre a hiperamonemia e o ácido metilmalônico sobre parâmetros bioenergéticos e inflamatórios em rim e fígado de ratos”, para obtenção do grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “APROVAÇÃO” da Tese.

Criciúma, SC, 29 de julho de 2016.


Prof.ª Dr.ª ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Membro Relator – UNESC


Prof. Dr. PAULO CÉSAR LOCK SILVEIRA
Membro Interno – UNESC


Prof.ª Dr.ª FABRÍCIA CARDOSO PETRONILHO
Membro Externo – UNISUL


Prof.ª Dr.ª MARISA JADNA SILVA FREDERICO
Membro Externo – UFSC


Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico
Professor PPGCS
Representante da Orientadora


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

AGRADECIMENTOS

À Eda, Felipe e Greta pela compreensão, incondicional apoio e carinho.

Aos ilustres colegas Fernanda Dal Maso Camera, Janesca Mansur Guedes, Mari Sbardelotto, Mirian Wilk Wisniewski, Elvis Wisniewski, Marcia Bairros de Castro, Ana Lucia Bernardo de Carvalho Morsch e Wolnei Luis Amado Centenaro pela ajuda, companheirismo, solidariedade e compreensão.

Aos professores Silvane Souza Roman e Luiz Carlos Cichota pela compreensão e ajuda.

Aos Professores do Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde pelo respeito, carinho, acolhimento, compreensão, paciência, dedicação e pela pronta disponibilidade para apontar caminhos seguros.

Aos Professores Orientadores: Inicialmente o Professor Gustavo da Costa Ferreira pelo acolhimento, competência, disponibilidade e segurança na indicação de caminhos seguros a serem vencidos.

Em sequência, por impedimento deste, a Professora Patrícia Fernanda Schuck assumiu a orientação com competência, carinho, dedicação.

Humildemente agradeço por terem aceito a incumbência para a orientação mesmo sem saberem se de fato a minha competência seria suficiente para efetuar todos os passos necessários para o êxito das etapas a serem vencidas.

Ao pessoal do Laboratório de Erros inatos do Metabolismo: Ândrea Cristina Ramos e Bruna Klippel Ferreira.

Ao pessoal do laboratório de Bioenergética, professor Emilio Streck, Milena e Lara.

Ao pessoal do laboratório de histologia da URI, professora Silvane Souza Roman e Vanessa Perondi.

A todos, muito obrigado.

RESUMO

A acidemia metilmalônica é um erro inato do metabolismo de herança autossômica recessiva causado pela deficiência da enzima metilmalonil-CoA mutase. Os principais sinais e sintomas incluem danos neurológicos, renais e hepáticos. Essa doença é caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo de ácidos orgânicos no plasma, na urina e em tecidos dos pacientes afetados, particularmente o ácido metilmalônico (MMA). Adicionalmente, os pacientes apresentam quadros de hiperamonemia, especialmente durante crises metabólicas. Entretanto, até o momento, não se sabe a influência da hiperamonemia na fisiopatologia da doença, bem como a toxicidade do MMA associado à hiperamonemia. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar parâmetros bioenergéticos e inflamatórios em rim e fígado em um modelo animal de acidemia metilmalônica associada à hiperamonemia. Para este estudo, foram utilizados ratos Wistar machos com 7, 15, 30 e 60 dias de vida, divididos em 4 grupos experimentais: controle, MMA, acetato de amônio (AA) e MMA+AA. Os animais do grupo controle receberam solução de NaCl 0,9 % e os animais dos grupos tratados receberam MMA (1,76 $\mu\text{mol/g}$; s.c) associado ou não ao AA (2,65 $\mu\text{mol/g}$; i.p) por cinco dias.. Os resultados mostram aumento significativo da taxa de creatinina sérica no grupo de animais com 7 e 30 dias de vida nos grupos AA e MMA+AA, bem como aumento das concentrações de ureia, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase e creatina cinase em animais com 60 dias. Adicionalmente, foi observada uma redução da taxa de filtração glomerular nos grupos de animais com 7, 30 e 60 dias. A análise histológica apresentou resultados heterogêneos, como dilatação dos túbulos, vacuolização nos túbulos proximais e dilatação dos túbulos distais, assim como desestruturação celular com desintegração da sua estrutura, alteração do epitélio e retração glomerular no grupo MMA+AA. Também foram encontradas alterações significativas na atividade da enzima citrato sintase no tecido hepático de animais com 15, 30 e 60 dias e no tecido renal de animais com 15 dias de vida. A atividade da enzima succinato desidrogenase se mostrou diminuída no grupo de animais com 15, 30 e 60 dias sobre o tecido hepático e renal. Além disso, as atividades dos complexos da cadeia respiratória foram alteradas estatisticamente. A atividade do complexo IV foi aumentada em rins de animais com 15 dias de vida. Por outro lado, a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória foi aumentada em tecido hepático de animais do grupo MMA+AA. No grupo de animais com 30 dias de

vida, houve alteração das atividades dos complexos I e II no tecido hepático, bem como complexos e II, II-III e IV no tecido renal de animais com 60 dias de vida. Aliados a esses resultados, foram observadas alterações estatisticamente significativas nos níveis de interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em tecido hepático dos animais do grupos MMA, AA e MMA+AA e de TNF α no tecido renal de animais com 30 dias de vida dos grupos MMA e MMA+AA. Tomados em conjunto, esses achados sugerem que alterações bioenergéticas e inflamatórias ocasionadas pela toxicidade da hiperamonemia associada ao MMA podem colaborar para os danos hepáticos e renais apresentados por pacientes acometidos pela acidemia metilmalônica.

Palavras-chaves: ácido metilmalônico, bioenergética, fígado, hiperamonemia, inflamação, rim.

ABSTRACT

Methylmalonic acidemia is an autosomal recessive inborn error of metabolism caused by a deficiency in methylmalonyl-CoA mutase enzyme. Main symptoms include neurological impairment, and kidney and liver damage. Biochemically, the disease is characterized by the accumulation of organic acids in plasma, urine and tissues of affected patients, particularly methylmalonic acid (MMA). Additionally, patients present with hyperammonemia, notably after metabolic crisis. To date, it is not clear the role of hyperammonemia on the pathophysiology of methylmalonic acidemia, neither MMA toxicity associated to hyperammonemia. The aim of the present work was to investigate bioenergetics and inflammatory parameters in kidney and liver in an animal model of methylmalonic acidemia associated to hyperammonemia. It was used 7-, 15-, 30- and 60-day old male Wistar rats, assigned into four different experimental groups: control, MMA, ammonium acetate (AA), and MMA + AA. Control animals received a single NaCl 0.9% injection and animals in treated groups received MMA (1.76 $\mu\text{mol/g}$; s.c) or AA (2.65 $\mu\text{mol/g}$; i.p), alone or in combination, during 5 days. Data showed a significant increase in serum creatinine levels in 7- and 30-day old animals from groups AA and MMA + AA, as well as increased concentrations of urea, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and creatine kinase in 60-day old animals. It was also observed a significant reduction of glomerular filtration rate in the 7-, 30-, and 60-day old animals. Alterations in the histological structure of tissues, including widening of tubules, vacuolization in proximal tubules, and widening of distal tubules, as well as cell disruption with disintegration of structure, epithelium and glomerular retraction in MMA + AA group were also reported. Significant alterations in citrate synthase activity were observed in liver from 15-, 30-, and 60-day old animals, as well as in kidney of 15-day old animals. Succinate dehydrogenase was decreased in liver and kidney from 15-, 30-, and 60-day old animals. Complex IV was found increased in kidney of 15-day old animals, and complex II-III activity was found increased in liver of MMA + AA animals. In 30-day old animals, it was found altered activities of complex I and complex II in liver, as well as in complex II, complex II-III and complex IV in kidney of 60-day old animals. Significant alterations of interleukin-6 and tumoral necrose factor alpha ($\text{TNF}\alpha$) levels in liver of MMA, AA and MMA + AA animals were observed, as well as of $\text{TNF}\alpha$ in kidney of

MMA and MMA + AA animals (30-day old). Taken together our findings suggest that alterations in bioenergetics and in inflammatory parameters caused by the toxicity of hyperammonemia associated to MMA may play a role in the pathophysiology of kidney and liver damage commonly reported in patients affected by methylmalonic acidemia.

Keywords: bioenergetics, hyperammonemia, inflammation, kidney, liver, methylmalonic acid.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 ACIDEMIA METILMALÔNICA	21
1.2 SINAIS CLÍNICOS, ALTERAÇÕES BIQUÍMICAS E FISIOPATOLOGIA DA MMAEMIA	23
1.4 TRATAMENTO	24
1.5 HIPERAMONEMIA	25
1.6 METABOLISMO ENERGÉTICO.....	26
1.6.1 CICLO DE KREBS	27
1.6.2 CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS	28
1.6.3 CK	30
1.7 INFLAMAÇÃO	31
1.8 JUSTIFICATIVA	32
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3 METODOLOGIA	34
3.1 ANIMAIS.....	34
3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES	34
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	34
3.3DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	36
3.3.1 Dosagens dos níveis de AST, ALT, ureia, creatinina e taxa de filtração glomerular	36
3.3.2 Análise histológica	36
3.3.3 Análise de parâmetros bioenergéticos	37
3.3.3.1 Determinação Da Atividade Do Complexo I Da Cadeia Respiratória	37
3.3.3.2 Determinação da atividade do complexo II da caeia respiratória	37
3.3.3.3 Determinação da atividade do complexo II+CoQ+III.....	37
3.3.3.4 Determinação da atividade do complexo IV	37
3.3.4 Atividade das enzimas do ciclo de Krebs	38
3.3.4.1 Determinação da atividade da enzima CS	38
3.3.4.2 Atividade da enzima SDH.....	38
3.3.5 Determinação da atividade da CK	38
3.3.6 Determinação da concentração de citocinas	39
3.3.7 Determinação da concentração de proteínas	39
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO	60

7 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 ACIDEMIA METILMALÔNICA

A acidemia metilmalônica (MMAemia) é um erro inato do metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada, colesterol e ácidos graxos de cadeia ímpar causado pela deficiência da enzima metilmalonil-CoA mutase (EC 5.4.99.2) ou da síntese da coenzima adenosilcobalamina (cblC) (Gradinger et al., 2007). Essa doença apresenta padrão de herança mendeliana autossômico recessivo (Fenton et al., 2001) e apresenta uma incidência de aproximadamente 1:50.000 nascidos vivos (Manoli e Venditti, 2016). A deficiência da enzima metilmalonil-CoA mutase pode se manifestar na forma mut^(o), em que a enzima não apresenta atividade residual, não responde à terapia com vitamina B₁₂ é a forma mais grave de MMAemia, e mut⁽⁻⁾, em que a enzima possui atividade residual e é responsiva à administração de vitamina B₁₂ (Paniz et al., 2005).

A enzima metilmalonil-CoA mutase está presente nas vias catabólicas dos aminoácidos isoleucina, valina, treonina e metionina, da base nitrogenada timina, de ácidos graxos de cadeia ímpar e do colesterol. O catabolismo do propionil-CoA produzido pelo metabolismo de bactérias intestinais também utiliza a enzima (Figura 1) (Fenton et al., 2001). Na MMAemia, devido à interrupção desta via metabólica, ocorre o acúmulo de ácido metilmalônico (MMA; acima de 1 µM) e outros metabólitos, tais como os ácidos propiônico, tíglico e metilcítrico, em tecidos e fluidos biológicos de pacientes (Leonard 2000; Deodato et al., 2006). Outros achados laboratoriais frequentemente observados em pacientes são acidose metabólica, acidemia láctica e hiperamonemia (Nizon et al., 2013).

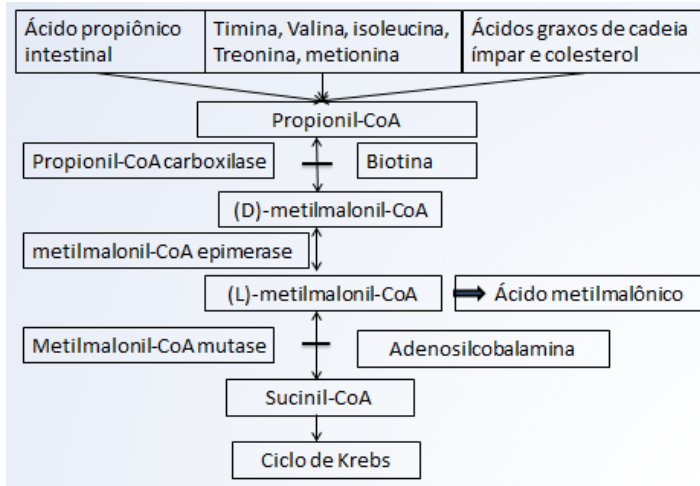


Figura 1 – Via metabólica afetada na acidemia metilmalônica. A via metabólica inicia com o ácido propiônico proveniente da ação bacteriana intestinal, do catabolismo de aminoácidos, de ácidos graxos de cadeia ímpar e do colesterol, ocorrendo a formação do propionil-CoA. Este, por sua vez, é convertido, pela ação da enzima propionil-CoA carboxilase, a D-metilmalonil-CoA, que é epimerizada a L-metilmalonil-CoA pela enzima metilmalonil-CoA epimerase. Este último é convertido a succinil-CoA, reação catalisada pela enzima metilmalonil-CoA mutase (enzima deficiente na acidemia metilmalônica). Esta última reação enzimática é uma reação anaplerótica do ciclo de Krebs. Adaptado de Baumgartner, 2014.

A MMAemia devida à deficiência da metilmalonil-CoA mutase é uma doença genética, com padrão de herança autossômico recessivo, e se deve a mutações no gene *MUT* localizado na região 12.3 do braço curto do cromossomo 6. Até o momento, mais de 150 mutações foram identificadas (Chandler e Venditti, 2005; Fowler et al., 2008; Baumgartner et al., 2014; Huemer et al., 2014; Olsen et al., 2015). Por outro lado, a MMAemia causada por deficiência de cobalamina se deve a mutações no gene *MMACHC*, que se localiza na região 34.1 do braço curto do cromossomo 1 (Lerner-Ellis et al., 2006; Gradinger et al., 2007; Fischer et al., 2014). Ambas deficiências afetam a atividade da enzima metilmalonil-CoA mutase, por conseguinte acumulando MMA.

1.2 SINAIS CLÍNICOS, ALTERAÇÕES BIQUÍMICAS E FISIOPATOLOGIA DA MMAEMIA

Os achados clínicos observados em pacientes acometidos pela MMA incluem tanto periféricos tanto o sistema nervoso central, quando órgãos e tecidos periféricos. Dentre os principais sinais, pode-se citar recusa alimentar, letargia, coma, convulsões, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, hepatomegalia, hipotonia, hipotermia, cardiomiopatia, hipoglicemia, desidratação e perda de peso (Schwartz et al., 2008; Baumgartner et al., 2014). Além disso, Saudubray e Walter (2012), podem ser observados tetraparesia e deficiência intelectual. Convulsões recorrentes de difícil resolução foram relatadas em pacientes, possivelmente relacionadas ao envolvimento de receptores do ácido gama-aminobutírico (Biancheri et al., 2002; Malfatti et al., 2007; Grünert et al., 2012), bem como desmielinização neuronal, infiltração fagocítica e hidrocefalia (Smith et al., 2006; Longo et al., 2011). Nesse sentido, Colín-González et al. (2015) descrevem que crianças afetadas por acidemias orgânicas, incluindo a MMAemia e acidemia propiônica, podem apresentar neurodegeneração aguda. Periféricamente, foram descritos cardiomiopatia e insuficiência renal crônica (Grünert et al., 2012; Imen et al., 2012). Estes sintomas podem ser observados principalmente durante as crises metabólica, sendo geralmente associadas a infecções recorrentes (Acquaviva et al., 2005; Kaplan et al., 2006).

Após o sistema nervoso central, os rins são os órgãos mais afetados na MMA. Os danos a longo prazo observados em pacientes incluem nefrite túbulo-intersticial com infiltração de células mononucleares, fibrose intersticial e atrofia tubular (D'angio et al., 2001). O aumento do conteúdo de fosfato pode ser atribuído a alterações funcionais nos túbulos distais, acarretando em desequilíbrio eletrolítico (Morath et al., 2008; Vernon et al., 2014). Adicionalmente, achados relacionados a estas alterações foram encontrados por Koenig e colaboradores (2015), incluindo insuficiência renal aguda ou crônica, nefrite túbulo intersticial e microangiopatia trombótica, síndrome hemolítica urêmica, hemólise, hipertensão arterial, proteinúria, hematúria, glomeruloesclerose e glomerulopatia atípica. Além disso, Baunly et al. (2005) demonstraram que pacientes acometidos pela MMAemia podem apresentar anemia megaloblástica e macrocítica, leuconutropenia, trombocitopenia e pancitopenia.

As principais alterações laboratoriais encontradas em pacientes acometidos pela MMAemia são cetose/cetonúria,

neutrotrombocitopenia, acidose metabólica e deficiência de bicarbonato. Raramente são encontrados hiperglicemia, desequilíbrio hidroeletrolítico e acidemia láctica (Marouani et al., 2011; Leonard, 2000; Als-Nielsen et al., 2004; de Baulny et al., 2005; Morath et al., 2008; Seashore et al., 2009; Vernon, 2014). Adicionalmente ao acúmulo de MMA e seus metabólicos, há acúmulo de homocisteína, aminoácido citotóxico e apresenta ação pró-aterogênica e pró-trombótica por afetar o endotélio vascular, acentua sintomas relacionados ao sistema cardiovascular (Handy et al., 2005; Chwatko et al., 2007). Elevações séricas da creatina cinase (CK; EC 2.7.3.2), ácido úrico e as enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) também podem ser indicadores inespecíficos desta doença (Baumgartner et al., 2014), sendo estas últimas marcadores de dano hepático.

Elevadas concentrações de amônia (hiperamonemia) são um achado característico de alguns erros inatos do metabolismo, incluindo a MMAemia. Os níveis séricos de amônia variam em função da atividade residual da enzima envolvida, da ingestão proteica e da taxa de catabolismo endógeno, especialmente durante episódios de crise metabólica (Cagnon et al., 2007).

1.3 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico laboratorial é baseado na identificação dos metabólitos acumulados em plasma e urina, principalmente o MMA. A quantificação dos compostos é realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Hoff et al., 1995). O diagnóstico de MMAemia se dá apenas sob suspeita médica e não faz parte do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) brasileiro.

1.4 TRATAMENTO

O tratamento inicial baseia-se na estabilização do quadro clínico, suspensão da ingestão de proteínas e infusão de glicose para evitar um quadro catabólico (Baumgartner et al., 2014). A administração de L-carnitina é essencial para o tratamento da MMA, resultando na excreção de metabólitos conjugados como ésteres de carnitina, tais como propionilcarnitina e metilmalonilcarnitina (Yannicelli et al., 2006). Adicionalmente, recomenda-se a administração de soluções hipotônicas em situações de hiperglicemia, além de vitamina B12 e N-carbamoil-

glutamato Summar et al., 2001; Baumgartner et al., 2014). O uso de benzoato de sódio também é utilizado para estabilização do quadro de hiperamonemia (Leonard, 2006). Outros tratamentos adjuvantes para a remoção de amônia são a diminuição da produção intestinal de amônia através de administração de lactulose (Als-Nelsen et al., 2004) e hemodiálise (Ribas et al., 2010).

1.5 HIPERAMONEMIA

A amônia é formada predominantemente nos hepatócitos a partir da desaminação dos aminoácidos e síntese de ureia no ciclo da ureia. No organismo, a amônia pode coexistir como gás (NH_3) ou na sua forma iônica (NH_4^+). As concentrações séricas desta molécula dependem do pH do meio (Lang et al., 1998). Em pH fisiológico, 98 % do total de amônia existe na forma de NH_4^+ . A forma gasosa, NH_3 , tem difusão facilitada através das membranas celulares e, no indivíduo saudável, são mantidas concentrações entre 10-50 mmol/L. Em situações de alcalose metabólica, a relação entre a forma ionizada e a não ionizada encontra-se aumentada (Gutierrez et al., 1987). Fisiologicamente, as concentrações séricas de amônia podem também variar de acordo com a ingestão proteica e a taxa de catabolismo endógeno (Cagnon et al., 2007).

A hiperamonemia pode ter origem congênita ou adquirida. Em sua forma congênita, está normalmente relacionada a defeitos primários no ciclo da ureia (Mas, 2006). Por outro lado, a hiperamonemia adquirida está relacionada à falência hepática provocada por ingestão de toxinas, infecções virais ou doenças autoimunes (Strauss et al., 1986). Nesse contexto, na MMAemia, o MMA inibe a enzima argininosuccinato sintetase, impedindo a transformação de amônia em ureia no ciclo e resultando no acúmulo de amônia, (Leonard, 2006; Jafari et al., 2013).

Diversas alterações na homeostasia celular estão relacionadas à hiperamonemia. Nesse sentido, a amônia altera vias metabólicas e sistemas de neurotransmissores e a síntese de óxido nítrico e induz estresse oxidativo. Evidências também demonstram que este composto altera o metabolismo energético, especialmente a função mitocondrial (Summar et al., 2001; Gropman et al., 2007). Acredita-se que o acúmulo de amônia nos tecidos e líquidos biológicos possam potencializar a toxicidade do MMA, como demonstrado por estudos prévios (Marisco et al., 2003; Viegas et al., 2014).

1.6 METABOLISMO ENERGÉTICO

Além das alterações do metabolismo energético causadas pela hiperamonemia, diversas evidências de que o MMA causa deficiência energética foram relatadas no sistema nervoso central e periférico (Wajner e Coelho, 1997; Pettenuzzo et al., 2006; Melo et al., 2011; Schuck et al., 2013). Neste sentido, para a síntese de trifosfato de adenosina (ATP), principal moeda energética celular, as células utilizam a energia obtida a partir da oxidação de biomoléculas, que podem ser oriundas da ingestão alimentar, além do oxigênio molecular proveniente da respiração. O principal substrato energético para a maioria dos tecidos é a glicose, mas outros substratos como ácidos graxos e corpos cetônicos podem ser utilizados por alguns tecidos. O catabolismo da glicose resulta na liberação de 2 moléculas de ATP e 2 moléculas de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (NADH), bem como na síntese de duas moléculas de ácido pirúvico (Rich et al., 2003). Por ação da enzima mitocondrial piruvato desidrogenase (EC 1.2.4.1), o ácido pirúvico, após descarboxilação, é convertido em acetil-CoA, liberando NADH (Tymoczko et al., 2011). O acetil-CoA recém formado é direcionado para o ciclo de Krebs (Figura 2) (Nelson e Cox, 2014).

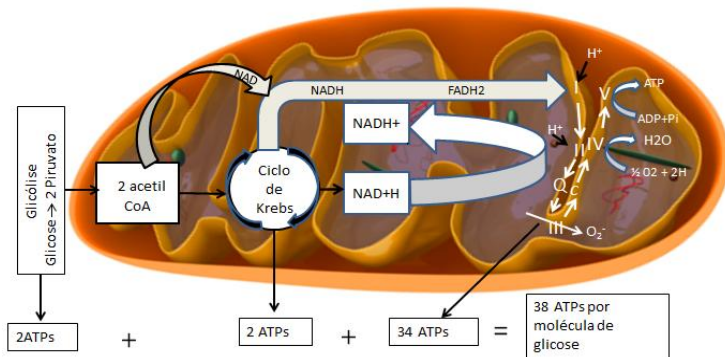


Figura 2 – Visão geral do metabolismo energético celular e rendimento energético. inicialmente ocorre a oxidação dos macronutrientes da dieta, seguida pela conversão da energia das ligações químicas destes compostos em equivalentes reduzidos e, finalmente, na transferência da energia destas ligações químicas ao ATP. O processo é composto pela glicólise, ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons. ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de

adenosina; FADH_2 : dinucleotídeo de flavina adenina reduzido; NAD: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado; NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido; Pi: fosfato inorgânico. Adaptado de Sousa, 2015.

1.6.1 CICLO DE KREBS

O ciclo de Krebs é considerado uma via comum da oxidação da maioria dos macronutrientes. Essa via metabólica constitui-se oito etapas, que resultam na oxidação completa do grupamento acetil do acetil-CoA, com a concomitante liberação dos carbonos na forma de CO_2 (Figura 3). A enzima citrato sintase (CS; EC 2.3.3.1) catalisa o primeiro dos oito passos, uma reação de condensação do resíduo acetil do acetil-CoA com oxaloacetato, sintetizando citrato (Nelson e Cox, 2014).

No passo seguinte, o citrato é convertido em isocitrato pela ação da enzima aconitase (EC 4.2.1.3), com a formação de um intermediário instável, o cis-aconitato. Após esta etapa, o isocitrato é convertido em α -cetogluturato, através de uma descarboxilação e concomitante formação de NADH, em uma reação catalisada pela enzima isocitrato desidrogenase (IDH; EC 1.1.1.42). Pela ação da enzima α -cetogluturato desidrogenase (CGDH; EC 1.4.1.13), o α -cetogluturato é convertido em succinil-CoA, após descarboxilação oxidativa, com a liberação de uma molécula de CO_2 e a formação de outra molécula de NADH (Leonardi et al., 2012). O succinil-CoA sofre a hidrólise do grupamento CoA pela enzima succinil-CoA sintetase (EC 6.2.1.4), liberando uma molécula de trifosfato de guanosina um composto de alto potencial energético, o trifosfato de guanosina (GTP), e succinato. O succinato é então convertido a fumarato pela ação da enzima succinato desidrogenase (SDH; EC 1.3.5.1), com a consequente formação de uma molécula reduzida do dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH_2). Pela ação da enzima fumarase (EC 4.2.1.2), o fumarato é convertido em malato (Mescam et al., 2011). Por fim, a enzima malato desidrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) regenera o oxaloacetato com a consequente formação de uma molécula de NADH (Taillefer et al., 2015). Após a oxidação completa do esqueleto de carbonos de uma molécula de acetil-CoA, o rendimento energético inclui a formação de 3 moléculas de NADH, uma molécula de FADH_2 e uma molécula de GTP.

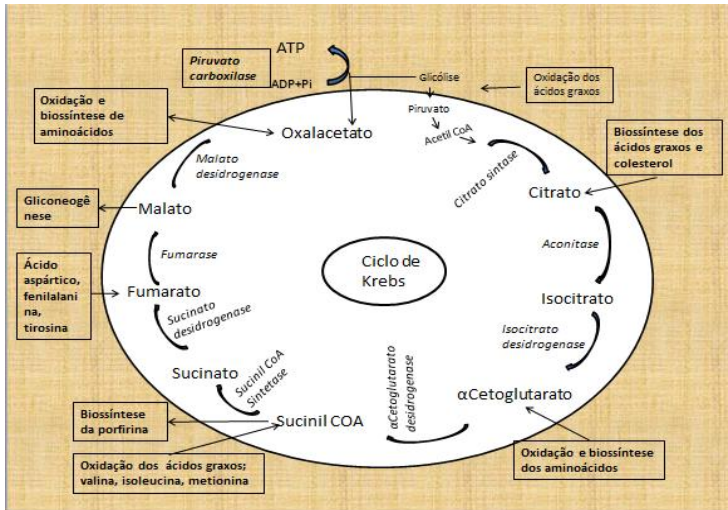


Figura 3 – Ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs. a característica anfibólica desta via metabólica está representada nas vias catabólicas e de biossíntese de intermediários do ciclo. ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; Pi: fosfato inorgânico. Adaptado de Ktena, 2015.

1.6.2 CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS

A oxidação de moléculas das coenzimas reduzidas NADH e FADH_2 ocorre em uma série de estruturas proteicas denominada de cadeia transportadora de elétrons ou cadeia respiratória (Figura 4). A cadeia transportadora de elétrons é composta por cinco complexos enzimáticos ancorados na membrana mitocondrial interna: complexo I ou NADH desidrogenase: coenzima Q redutase (EC 1.6.5.3), complexo II ou succinato desidrogenase: coenzima Q redutase (EC 1.3.5.4), complexo III ou coenzima Q oxidase-citocromo *c* redutase (EC 1.10.2.2), complexo IV ou citocromo *c* oxidase (EC 1.9.3.1) e complexo V ou ATP-sintase (EC 3.6.3.14). Além destes complexos proteicos, também fazem parte da cadeia transportadora de elétrons dois carreadores móveis de elétrons: a ubiquinona ou coenzima Q e o citocromo *c* (Voet et al., 2008; Tymoczko et al., 2011). O receptor final de elétrons nesta via é o oxigênio e a síntese de ATP (fosforilação oxidativa) ocorre no complexo V.

Na cadeia respiratória, os elétrons oriundos do NADH são transferidos para o complexo I e após, sequencialmente, para a

coenzima Q, o complexo III, o citocromo c e o complexo IV, onde ocorre a redução do O_2 a H_2O . Por outro lado, os elétrons oriundos do $FADH_2$ são transferidos para o complexo II e, da mesma forma, sequencialmente transferidos para a coenzima Q, o complexo III, o citocromo c e o complexo IV. A transferência dos elétrons através da cadeia respiratória até o receptor final, o oxigênio, resulta no permanente bombeamento de prótons para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico (potencial de membrana mitocondrial). A dissipação deste potencial pela entrada de prótons para a matriz no complexo V fornece aporte energético necessário para a condensação de ADP e fosfato inorgânico (P_i), formando ATP (Painter et al., 2007). A fosforilação oxidativa é fundamental para a homeostase bioenergética celular, sendo responsável pela formação de aproximadamente 85-90 % do ATP celular (Melo et al., 2012) e é considerada a etapa terminal da respiração celular (Nelson e Cox, 2014).

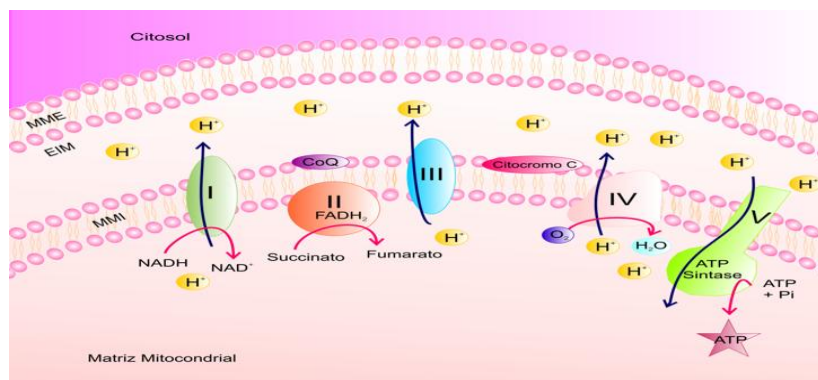


Figura 4. Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa. Moléculas ricas em energia química são metabolizadas por uma série de reações de oxirredução levando à produção de água ao final da cadeia respiratória. As coenzimas reduzidas $NADH$ e $FADH_2$ provenientes das oxidações de substratos energéticos entregam seus elétrons ao complexo I e ao complexo II, respectivamente. À medida que os elétrons fluem através dos complexos da cadeia respiratória, há transporte de prótons (H^+) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico. Este, por sua vez, é dissipado pela ATP-sintase na fosforilação oxidativa para a síntese de ATP. ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; FAD: dinucleotídeo de adenina e flavina, forma oxidada; $FADH_2$: coenzima reduzida de adenina e flavina, forma reduzida; NAD^+ : dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada; $NADH$: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida; P_i : fosfato inorgânico. Fonte: Bairros, 2016.

Neste cenário, foi demonstrado que o MMA inibe complexos da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro, rins e fígado (Brusque et al., 2002; Pettenuzzo et al., 2006; Zsengellér et al., 2014). Adicionalmente, o MMA também atua como desacoplador mitocondrial e inibidor do transporte de succinato para dentro da célula (Mirandola et al., 2008).

1.6.3 CK

Além de inibição da cadeia respiratória, o MMA também inibe a enzima CK em tecido cerebral e renal (Schuck et al., 2004; Schuck et al., 2013). Esta é uma enzima importante para o tamponamento energético celular e catalisa a conversão reversível da creatina fosfato (CF) em creatina (CR) e fosfato (Pi), liberando energia química para a ressíntese de ATP (Figura 5) (Goldblatt, 1969). A CF é utilizada pelos tecidos como reservatório de energia e para o transporte de energia intracelular entre sítios de síntese de ATP a sítios de alta demanda energética (Lygate et al., 2012). Até o momento, não foi descrito o efeito da interação MMA e hiperamonemia sobre a CK e outras etapas do metabolismo energético celular.

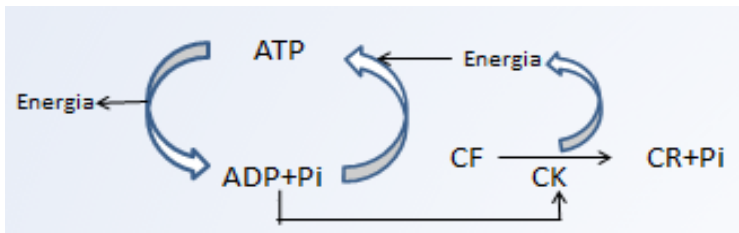


Figura 5. Reação enzimática reversível catalisada pela creatina cinase (CK). A creatina (CR) sintetizada nos rins a partir de aminoácidos é captada principalmente pelos músculos e utilizada como substrato da CK para a transferência reversível de fosfato inorgânico (Pi) proveniente do trifosfato de adenosina (ATP), liberando creatina fosfato (CF) e difosfato de adenosina (ADP). Adaptado de Neubauer, 1998.

1.7 INFLAMAÇÃO

Adicionalmente aos efeitos sobre a bioenergética celular, recentemente foi demonstrado o possível envolvimento da inflamação na fisiopatologia da MMAemia. Neste sentido, Zsengellér et al. (2014) demonstraram a presença de processos inflamatórios no parênquima renal de um paciente, além de fibrose intersticial. Além disso, Ribeiro et al. (2013) demonstraram alterações em parâmetros inflamatórios associados a estresse nitrosativo, aumento dos níveis de citocinas e da atividade da óxido nítrico sintase induzível.

Os processos inflamatórios consistem em reações localizadas ou generalizadas que ocorrem como resposta à agressão tecidual ou celular, com o intuito de reparação de tecidos lesados (Medzhhitov et al., 2008). Estas reações são consideradas fisiológicas, fazendo com que o organismo promova defesas para o combate de agentes agressores, bem como para a remoção de tecidos lesados e promoção da reconstrução tecidual (Palsson-McDermott et al., 2009). Reações inflamatórias podem se manifestar de forma aguda, com sinais e sintomas bem definidos, como em infecções agudas induzidas por micro-organismos, ou de forma lenta e progressiva, com sintomas inespecíficos, como é o caso das artrites ou processos autoimunes. Por outro lado, em situações patológicas, os processos inflamatórios podem ser danosos ao tecido. Inflamações podem ser macroscopicamente evidenciadas em tecidos, através da visualização de áreas hiperemiadas, com aumento da temperatura, sensibilidade e volume tecidual (Lau et al., 2006).

A resposta inflamatória pode ser mediada por enzimas e/ou produção e secreção de citocinas. A enzima mieloperoxidase (MPO; EC 1.11.1.7) é a preponderante em processos inflamatórios periféricos e que pode constituir uma reação fisiológica esperada e proporcional ao dano tecidual ou resposta exacerbada, como na anafilaxia (Takeuchi et al., 2010). As citocinas, por sua vez, são proteínas secretadas no local da lesão através da ativação de proteínas cinases (Sommer et al., 2010). Esta linha de defesa é constituída por citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas (IL) 1, 2, 6 e 7 e fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), e anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10, IL-13 e fator transformador de crescimento β (FTC β) (Oliveira et al., 2011).

As citocinas pró-inflamatórias, como o $TNF\alpha$ e a IL-6, são responsáveis pela organização da resposta inflamatória e pela modulação vascular, o que resulta em vasodilatação e consequente

aumento da permeabilidade vascular (Takeuchi et al., 2010). A sinalização celular permite o recrutamento de células sanguíneas de defesa para que migrem para áreas lesadas, iniciando o processo de reparação tecidual (Park et al., 2009). As citocinas podem apresentar diferentes formas de ativação: $TNF\alpha$ e IL-6 são reguladas por transcrição e IL- 1β requer a clivagem da pró-IL- 1β pela caspase 1 (Honda et al., 2006; Matsushita et al., 2009).

A resposta inflamatória aguda é constituída por leucócitos, tais como neutrófilos, monócitos, eosinófilos, mastócitos e linfócitos (Flint et al 2003; Lukic et al., 2009). Devido a alta capacidade de diapedese, ação fagocítica e migração, os neutrófilos são as primeiras células de defesa no local da lesão (Hsieh et al., 2007). Estas células segmentadas fagocitam e induzem morte de micro-organismos pela liberação de enzimas hidrolíticas e espécies reativas de oxigênio (ERO) (Barrett e Austen, 2009).

Os eosinófilos, por sua vez, são células multifuncionais e estão envolvidos em vários processos inflamatórios de origem alérgica e infestações parasitárias (Hogan et al., 2008; Kvarnhammar et al., 2012). Comumente, estas células são encontradas na corrente sanguínea, constituindo 1-3 % do leucograma e fazem parte das defesas em vários tecidos (Klion et al., 2004; Triverdi et al., 2007; Fabre et al., 2009). Sua ação é regulada por IL-3 e IL-5 atuam através de proteínas tóxicas contidas nos seus grânulos e, concomitantemente, da liberação de ERO, leucotrienos, prostaglandinas, citocinas e quimiocinas (Broide et al., 2001).

1.8 JUSTIFICATIVA

Foram demonstradas evidências de que o acúmulo de MMA e a hiperamonemia isoladamente são deletérios ao sistema nervoso central e tecidos renais e hepáticos. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos celulares da associação de ambos. Nesse contexto, torna-se importante avaliar o possível efeito sinérgico e/ou aditivo dos compostos acumulados MMAemia em associados ou isoladamente ao longo do desenvolvimento, na tentativa de estabelecer os mecanismos fisiopatológicos dessa doença e colaborar para a melhora da qualidade de vida dos pacientes afetados por essa doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração aguda de MMA sobre parâmetros inflamatórios e de bioenergética em fígado e rim de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento submetidos a um modelo experimental de hiperamonemia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da administração aguda de MMA sobre os níveis de ureia, creatinina, ALT e AST em soro de ratos com 7, 15, 30 e 60 dias de vida submetidos a um modelo experimental de hiperamonemia;
- Avaliar o efeito da administração aguda de MMA sobre a TFG em ratos com 7, 15, 30 e 60 dias de vida submetidos a um modelo experimental de hiperamonemia;
- Avaliar o efeito da administração aguda de MMA sobre a histologia de fígado e rim de ratos com 7, 15, 30 e 60 dias de vida submetidos a um modelo experimental de hiperamonemia;
- Avaliar o efeito da administração aguda de MMA sobre a atividade de enzimas do ciclo de Krebs em fígado e rim de ratos com 15, 30 e 60 dias de vida submetidos a um modelo experimental de hiperamonemia;
- Avaliar o efeito da administração aguda de MMA sobre a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons em fígado e rim de ratos e com 15, 30 e 60 dias de vida submetidos a um modelo experimental de hiperamonemia;
- Avaliar o efeito da administração aguda de MMA sobre a atividade da CK em fígado e rim de ratos com 15, 30 e 60 dias de vida submetidos a um modelo experimental de hiperamonemia;
- Avaliar o efeito da administração aguda de MMA sobre os níveis de citocinas em fígado e rim de ratos com 30 dias de vida submetidos a um modelo experimental de hiperamonemia.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos e com 7, 15, 30 e 60 dias de vida, provenientes do Biotério da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram acondicionados em gaiolas, em grupos de 6 (seis) por gaiola. Os animais foram mantidos em ciclos claro-escuro de 12 horas, à temperatura de 23 ± 1 °C, com exaustão e alimento e água em livre acesso. A utilização dos animais seguiu a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, aprovada por meio da Portaria do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) nº 465 (23/05/2013). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob protocolo nº 058-2013 (ANEXO A). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções de MMA e acetato de amônio (AA) foram preparadas em solução NaCl 0,9 % (peso/volume) nos dias das administrações e tiveram seus pH ajustados para 7,4.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Inicialmente, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (10 animais por grupo): grupo controle, grupo AA, grupo MMA e grupo MMA+AA. Os animais dos grupos controle e MMA receberam uma administração intraperitoneal diária de solução salina (NaCl 0,9 %, peso/volume) durante 5 dias. Neste mesmo período, os animais dos grupos AA e MMA+AA receberam uma única administração intraperitoneal diária de 2,5 $\mu\text{mol/g}$ de AA (Figura 6A). No 5º dia, os animais dos grupos MMA e MMA+AA receberam três administrações subcutâneas de MMA (1,67 $\mu\text{mol/g}$) com intervalo de 90 minutos entre as administrações. Os grupos controle e AA receberam 3 administrações subcutâneas de NaCl 0,9 %, com intervalo de 90 minutos entre as administrações, como demonstrado na Figura 9B. As doses de MMA e de AA utilizadas neste estudo e os tempos de tratamentos foram descritos por Dutra et al. (1991) e Rukmini Devi et

al. (1998), respectivamente. Decorrida 1 hora da última administração, os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina e sem anestesia. Amostras de sangue periférico proveniente da decapitação foram coletadas para obtenção de soro. O fígado e os rins foram retirados da cavidade abdominal por laparotomia e então perfundidos com solução NaCl 0,9 % com auxílio de uma seringa. Após, esses órgãos foram retirados, limpos e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

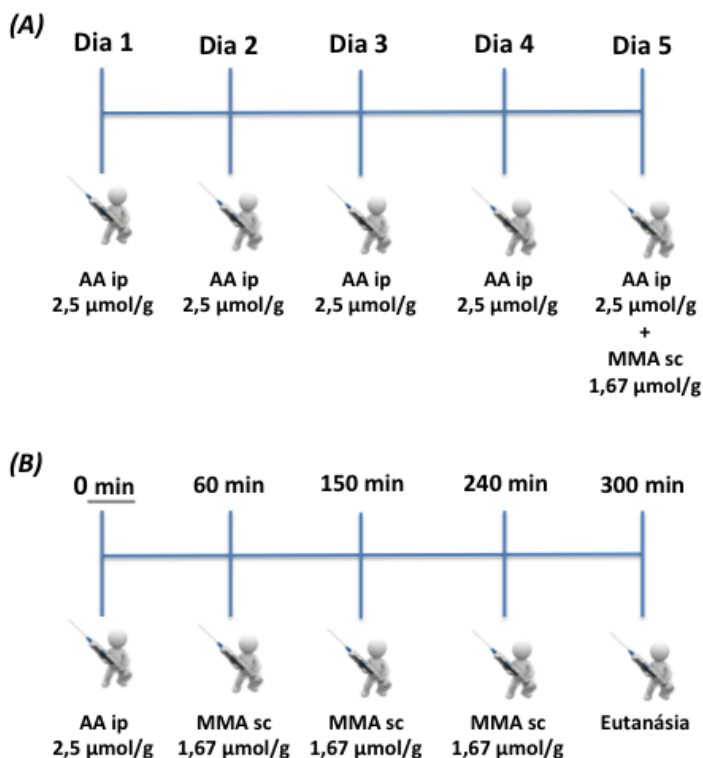


Figura 6 - Protocolo experimental dos modelos animais de MMAemia associada à hiperamonemia. (A) Esquema de tratamento em dias; (B) Esquema de tratamento em minutos no 5^o dia. AA: acetato de amônio; ip: intraperitoneal; min: minuto; MMA: ácido metilmalônico; sc: subcutânea.

3.3 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

3.3.1 Dosagens dos níveis de AST, ALT, ureia, creatinina e taxa de filtração glomerular

A separação dos componentes sólidos e líquidos do sangue coletado no momento da eutanásia foi feita utilizando-se uma centrífuga a 4 mil rotações por minuto durante 5 minutos. Em seguida, a parte líquida foi retirada com o auxílio de uma pipeta e este conteúdo foi depositado em tubos e acondicionado em freezer -80 °C. Este material foi encaminhado para um laboratório de análises clínicas comercial para determinar as taxas de de ureia, creatinina, AST e ALT utilizando-se kits comerciais da Labtest® Brasil. A estimativa taxa de filtração glomerular foi efetuado utilizando-se como referência o cálculo recomendado pela *National Kidney Education Program* e pela Sociedade Brasileira de Nefrologia.

3.3.2 Análise histológica

A análise histológica foi realizada utilizando-se o método de eosina e hematoxilina. As peças histológicas no momento da coleta foram imersas em solução de formaldeído 10 %. O processamento histológico foi efetuado com a imersão das peças em diferentes concentrações de etanol em sequência: 70 % por 1 h; 80 % - 1h; 90 % - 1 h; 96 % - 1 h e 100 % - 24 horas. Após esse período, as peças foram tratadas com etanol/xilol – 30 minutos, xilol I – 30 minutos; xilol II – 30 minutos; xilol/parafina – 30 minutos; parafina I – 1 hora; parafina II – 1 hora e foi realizado o emblocamento em parafina. Para a coloração pela técnica de hematoxilina e eosina, foi efetuada a desparafinização com xilol I por 20 minutos seguido de xilol II por 20 minutos. O xilol foi removido e as amostras foram deixadas para secar. Após a secagem, as peças foram hidratadas com etanol 70 % por 3 minutos seguido de álcool 50 % por 3 minutos, etanol 40 % por 3 minutos e, finalmente, água por 3 minutos. A coloração foi realizada pela imersão em hematoxilina por 2 minutos, seguida de uma lavagem em água contendo carbonato de lítio e, por fim, eosina por 4 minutos. Ao final do processo de coloração, as amostras foram novamente desidratadas com etanol 96% por 30 segundos e etanol 99 % por 30 segundos. As análises foram realizadas por microscopia óptica.

3.3.3 Análise de parâmetros bioenergéticos

3.3.3.1 Determinação Da Atividade Do Complexo I Da Cadeia Respiratória

O meio de incubação constituiu-se de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,4, ferricianeto de potássio 10 mM e rotenona 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 14 mM de NADH. A redução do ferricianeto de potássio dependente de NADH foi acompanhada pelas leituras espectrofotométricas registradas por 3 minutos a 420 nm a 25 °C. (Cassina e Radi, 1996). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.3.3.2 Determinação da atividade do complexo II da caeia respiratória

A atividade deste complexo enzimático foi determinada de acordo com Fischer et al. (1985). O meio de incubação constituiu-se de tampão fosfato de potássio 40 mM, pH 7,4, 16 mM de succinato de sódio e 8 μM de 2,6-diclorofenol (DCIP). Inicialmente, pré-incubou-se o meio de incubação com 40-80 μg de proteínas do homogeneizado a 30 °C por 20 minutos. Logo após, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7 μM de rotenona e iniciou-se a reação com a adição de 40 μM de DCIP. As absorvâncias foram registradas por 5 minutos a 600 nm. A atividade do complexo II foi determinada pela diminuição da absorvância devida à redução do DCIP. Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.3.3.3 Determinação da atividade do complexo II+CoQ+III

O meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 40 mM, pH 7,4, contendo 16 mM de succinato de sódio, foi pré-incubado com 40-80 μg de proteínas do homogeneizado a 30 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7 μM de rotenona e a reação se iniciou pela adição de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ de citocromo *c*. As absorvâncias foram registradas por 5 minutos a 550 nm. A atividade do complexo II+CoQ+III foi determinada pelo aumento da absorvância causado pela redução do citocromo *c* (Fischer et al., 1985). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.3.3.4 Determinação da atividade do complexo IV

O meio de incubação continha tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, N-dodecil-D-maltosídeo 0,6 mM e 10-20 μg de proteínas. A reação foi iniciada com a adição de 0,7 μg de citocromo *c* previamente reduzido. A atividade enzimática foi medida a 25 °C por 10 minutos e foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 550 nm devido à oxidação de citocromo *c* (Rustin et al., 1994). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.3.4 Atividade das enzimas do ciclo de Krebs

3.3.4.1 Determinação da atividade da enzima CS

A atividade da enzima CS foi avaliada em um meio de incubação contendo 5',5''-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) 0,1 μM , ácido oxaloacético 0,2 μM , Triton X-100 0,1 % e acetil-CoA 0,1 μM , em um tampão Tris-HCl 100 μM , pH 8,0. A redução do DTNB a TNB foi medida espectrofotometricamente a 412 nm por 3 minutos a 37 °C (Srere, 1969). A atividade enzimática está expressa em $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.3.4.2 Atividade da enzima SDH

Essa atividade enzimática foi determinada em um meio de incubação constituído de tampão fosfato de potássio 40 mM, pH 7,4, 16 mM de succinato de sódio e 8 μM de DCIP. Inicialmente, pré-incubou-se o meio de incubação com 40-80 μg de proteínas do homogeneizado a 30 °C por 20 minutos. Logo após, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica, 7 μM de rotenona e 1 mM de metassulfato de fenazina e se iniciou a reação com a adição de 40 μM de DCIP. As absorvâncias foram registradas por 5 minutos a 600 nm. A atividade da SDH foi determinada pela diminuição da absorvância devida à redução do DCIP (Fischer et al., 1985). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.3.5 Determinação da atividade da CK

Após um período de 15 minutos de pré-incubação, a reação enzimática foi iniciada com a adição de ADP a uma concentração final de 3,2 mM em meio contendo 7,08 mM de fosfocreatina e de 0,8 a 1 μg de proteínas. Após 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida

com ácido p-hidroximercuribenzoico 50 mM e a coloração rósea foi obtida pela adição de α -naftol 20 %, água destilada e diacetil 20 %. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 540 nm, segundo o método de Hughes (1962). Para calcular a atividade enzimática, foi feita uma curva de calibração com creatina em diferentes concentrações. Os resultados estão expressos em μmol de creatina $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

3.3.6 Determinação da concentração de citocinas

As concentrações teciduais das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF α foram determinadas utilizando-se kits comerciais, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (kDuoSet, R&D Systems, Minneapolis, EUA). Os resultados estão apresentados como $\mu\text{g}/\text{mL}$ para IL-1 β , IL-10 e TNF α e pg/mg de proteína para IL-6.

3.3.7 Determinação da concentração de proteínas

Foi realizada utilizando-se o método descrito por Lowry et al. (1951), usando-se albumina sérica bovina como padrão.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan quando o valor de F foi significativo. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa IBM SPSS Statistics. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Inicialmente, foram avaliados parâmetros de função renal e hepática em animais com 7, 15, 30 e 60 dias de vida submetidos à administração de MMA e AA isoladamente ou associados. Foi observado que os animais com 7 dias de vida que receberam MMA ou AA isoladamente não apresentaram nenhuma alteração nos níveis séricos de ureia e creatinina. Entretanto, a administração de MMA e AA associados aumentou os níveis de creatinina em comparação com os animais do grupo controle (Figuras 7A e 7B). Adicionalmente, a TFG foi diminuída tanto pela administração de MMA e AA isoladamente quanto pela administração de uma combinação dos dois compostos (Figura 7E). Os níveis de AST e ALT não foram alterados pela administração isolada ou combinada de MMA e AA (Figuras 7C e 7D).

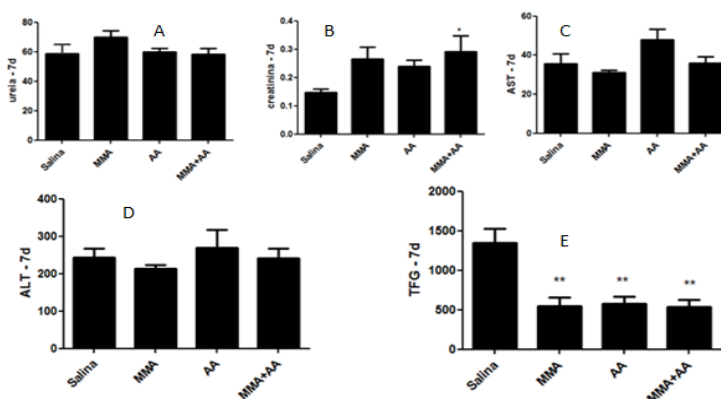


Figura 7 – Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) e acetato de amônio (AA) isoladamente ou em combinação sobre os níveis séricos de ureia (A), creatinina (B), aspartato aminotransferase (AST) (C) e alanina aminotransferase (ALT) (D) e taxa de filtração glomerular (TFG) (E) em soro de ratos com 7 dias de vida. Dados representam média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan).

Por outro lado, os níveis de ureia, creatinina, AST e ALT e a TFG não foram alteradas pela administração isolada ou combinada de MMA e AA (Figura 8).

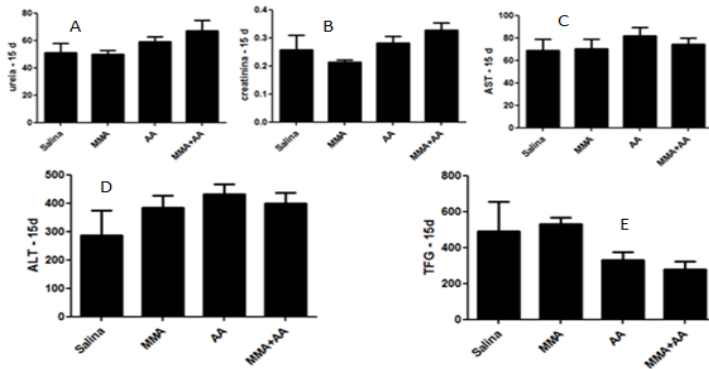


Figura 8 – Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) e acetato de amônio (AA) isoladamente ou em combinação sobre os níveis séricos de ureia (A), creatinina (B), aspartato aminotransferase (AST) (C) e alanina aminotransferase (ALT) (D) e taxa de filtração glomerular (TFG) (E) em soro de ratos com 15 dias de vida. Dados representam média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. Não foi observada nenhuma alteração significativa estatisticamente entre os grupos (ANOVA de uma via).

Após a administração de MMA e AA isoladamente ou associados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nos níveis de ureia (Figura 9A), AST e ALT em soro de ratos com 30 dias de vida. Entretanto, os níveis séricos de creatinina encontraram-se aumentados nos animais que receberam AA isoladamente ou em combinação com MMA, mas não nos animais que receberam MMA isoladamente. Nesses mesmos animais, a TFG foi diminuída para presença tanto de MMA quanto de AA isoladamente ou em combinação (Figura 9).

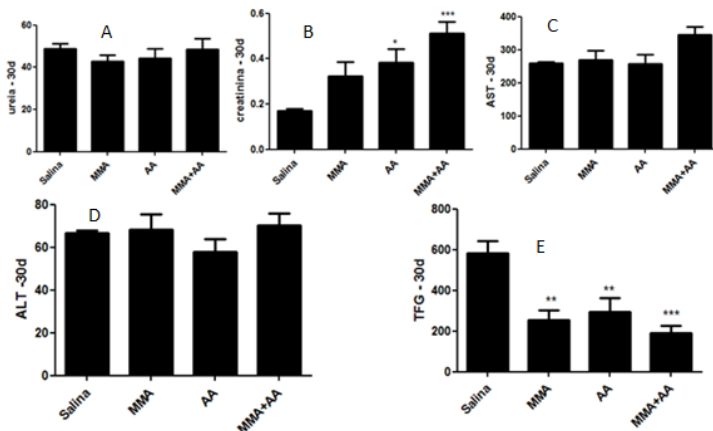


Figura 9 – Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) e acetato de amônio (AA) isoladamente ou em combinação sobre os níveis séricos de ureia (A), creatinina (B), aspartato aminotransferase (AST) (C) e alanina aminotransferase (ALT) (D) e taxa de filtração glomerular (TFG) (E) em soro de ratos com 30 dias de vida. Dados representam média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan).

Os mesmos parâmetros foram também avaliados em soro de ratos com 60 dias de vida submetidos à administração de MMA associada ou não à administração de AA. Estes animais apresentaram aumento dos níveis de ureia, AST e ALT quando receberam a administração de MMA isoladamente ou em combinação com AA, mas não quando receberam AA isoladamente. Adicionalmente, a TFG foi diminuída nos 3 grupos experimentais, quando comparados ao controle (Figura 10).

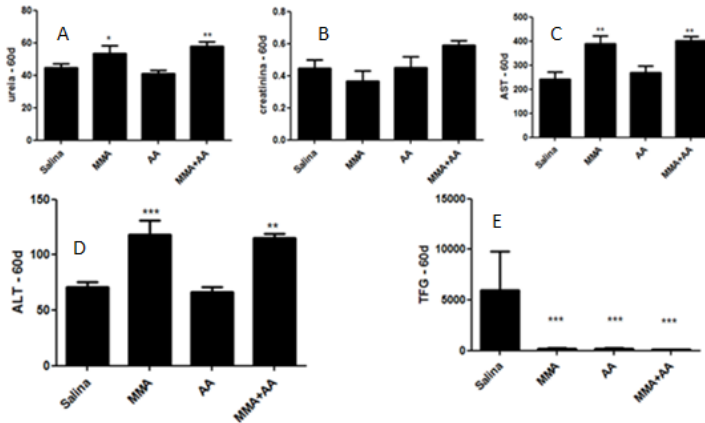


Figura 10 – Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) e acetato de amônio (AA) isoladamente ou em combinação sobre os níveis séricos de ureia (A), creatinina (B), aspartato aminotransferase (AST) (C) e alanina aminotransferase (ALT) (D) e taxa de filtração glomerular (TFG) (E) em soro de ratos com 60 dias de vida. Dados representam média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan).

A seguir, foram realizados cortes histológicos para análise de tecido renal e hepático de animais com 7, 15, 30 e 60 dias de vida submetidos à administração de MMA e AA isoladamente ou em associação. Na Figura 11, pode-se observar em cortes histológicos renais que o grupo controle mostrou vacuolizações citoplasmáticas nos túbulos proximais e alguns glomérulos com vacúolos. Animais que receberam MMA isoladamente apresentaram retração glomerular, túbulos distais dilatados e desestruturação celular. Nesse grupo, os animais apresentaram substituição do epitélio cúbico simples por tecido pavimentoso simples e os túbulos proximais apresentavam-se desorganizados e com retração glomerular. Os animais que receberam administração apenas de AA apresentaram vacuolizações citoplasmáticas dos túbulos proximais e distais e glomérulos com aspecto normal em algumas áreas e, em outras, com retração glomerular. Por outro lado, os animais do grupo MMA+AA apresentaram retração glomerular em algumas áreas, morfologia preservada em outras e vacuolizações citoplasmáticas.

Em relação ao tecido hepático, animais do grupo controle não apresentaram eosinofilia citoplasmática, enquanto os que receberam a

administração de MMA apresentaram. Verificou-se também que os animais que receberam a administração de AA apresentaram eosinofilia e vacuolizações, com tumefação celular moderada nos hepatócitos. Os animais que foram submetidos à administração de ambos os compostos (MMA e AA) apresentaram eosinofilia, vacuolizações e tumefação acentuada nos hepatócitos.

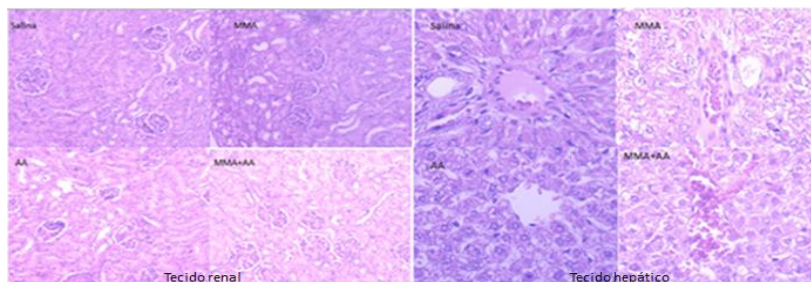


Figura 11. Fotomicrografia de cortes histológicos de rim e segmento do lobo hepático de ratos com 7 dias de vida submetidos à administração de ácido metilmalônico (MMA) e acetato de amônio (AA) isoladamente ou em combinação. Aumento: 10 e 25X.

De acordo com a Figura 12, para o grupo de animais com 15 dias, a análise histológica do tecido renal para o grupo salina observa-se vacuolizações citoplasmáticas nos túbulos distais. Alguns glomérulos com vacúolos. Grupo MMA (1,67 $\mu\text{mol/g}$ s.c.): túbulos distais dilatados e desestruturação celular; vacuolizações citoplasmáticas nos túbulos proximais (seta preta) e retração glomerular. Grupo AA (2,5 $\mu\text{mol/g}$ i.p.): vacuolizações citoplasmáticas dos túbulos proximais e distais; glomérulos com aspecto normal em algumas áreas e em outras com retração. Grupo MMA+AA: retração glomerular em algumas áreas e com morfologia preservada em outras; vacuolizações citoplasmáticas e substituição do epitélio cúbico simples por tecido pavimentoso simples (setas vermelhas). Fígado – Grupo Salina: mostra eosinofilia citoplasmática; Grupo MMA (1,67 $\mu\text{mol/g}$ s.c.) vacuolizações e tumefação. Grupo AA (2,5 $\mu\text{mol/g}$ i.p.) mostra eosinofilia, vacuolizações e tumefação moderada. Grupo MMA+AA mostra eosinofilia (seta vermelha), vacuolizações e tumefação acentuada. Em todos se observa cordões de hepatócitos, veia centrolobular e capilares sinusoidais. (vcl) veia centro lobular; (cs) capilar sinusóide; (dc) ducto hepático; cordões de hepatócitos (ponta de seta preta); Células eosinofílicas citoplasmáticas (ponta de seta vermelha).

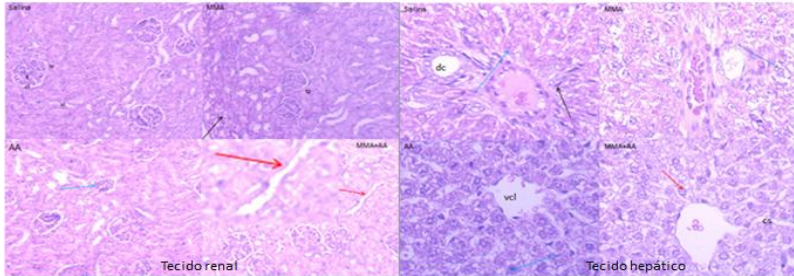


Figura 12. Fotomicrografia de cortes histológicos de rim e segmento do lobo hepático de ratos com 15 dias de vida submetidos à administração de ácido metilmalônico (MMA) e acetato de amônio (AA) isoladamente ou em combinação. Aumento: 10 e 25X.

A Figura 13 mostra fotomicrografias de segmento de rim e de fígado de ratos com 30 dias de vida que receberam MMA e/ou AA. O grupo controle apresentou arquitetura glomerular e túbulos renais preservados. Por outro lado, cortes histológicos de rim dos ratos do grupo MMA demonstraram morfologia de células dos túbulos proximais alargados e discreta alteração da morfologia do glomérulo, bem como aumento do espaço de Bowman. Quando administrado isoladamente, o AA ocasionou apenas dilatação tubular. Por outro lado, o tecido renal dos animais do grupo MMA+AA apresentou retração glomerular, desintegração da sua arquitetura, aumento do espaço de Bowman e tumefação tubular. A mesma figura mostra histologia de lobo hepático de ratos com 30 dias de vida. O grupo controle apresentou eosinofilia citoplasmática. Isoladamente, o MMA também não ocasionou alterações significativas no tecido hepático, apenas pequenos focos inflamatórios. Por outro lado, o tecido hepáticos dos animais dos grupos AA e MMA+AA apresentou eosinofilia e vacuolizações. Entretanto, o grupo AA apresentou tumefação moderada, enquanto o grupo MMA+AA apresentou tumefação acentuada.

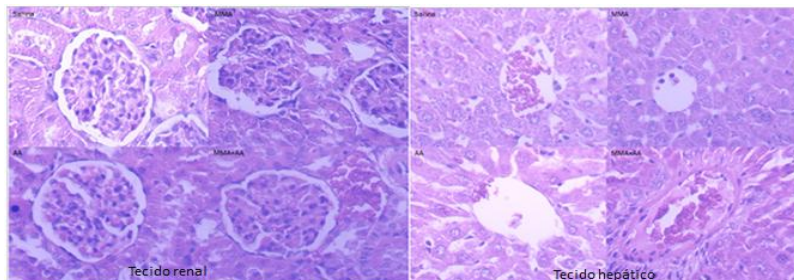


Figura 13 - Fotomicrografia de cortes histológicos de rim e segmento do lobo hepático de ratos com 30 dias de vida submetidos à administração de ácido metilmalônico (MMA) e acetato de amônio (AA) isoladamente ou em combinação. Aumento: 10 e 25X.

Na Figura 14, são apresentadas fotomicrografias de segmento de tecido renal e hepático de animais com 60 dias de vida. Os ratos do grupo controle apresentaram glomérulos e túbulos renais preservados. Os animais do grupo MMA apresentaram tumefação glomerular, desestruturação, dilatação dos túbulos e ausência de núcleos em algumas áreas dos túbulos proximais. Além disso, no tecido renal dos animais do grupo AA foram identificadas congestão vascular, tumefação tubular, presença de neutrófilos e redução do espaço de filtração glomerular. O grupo MMA+AA apresentou destruição de túbulos proximais e distais, redução do espaço de filtração, estruturas corticais desestruturadas e dilatação tubular (detalhe ao centro). A mesma figura mostra fotomicrografias de tecido hepático de animais com 60 dias de idade. Os animais que receberam MMA apresentaram congestão das estruturas da veia centrolobular e do tecido intersticial. Tumefação hepatocítica com focos inflamatórios, dificultando a visualização dos capilares sinusoides, também foi observada. Animais que receberam apenas AA apresentaram eosinofilia, vacuolizações e tumefação moderada do tecido hepático, enquanto os animais que receberam a associação de MMA e AA mostraram eosinofilia, vacuolizações e tumefação acentuada. Em todos os grupos se observam cordões de hepatócitos, veia centrolobular e capilares sinusoidais.

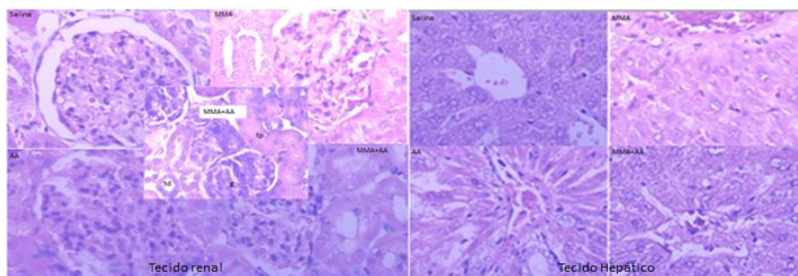


Figura 14 - Fotomicrografia de cortes histológicos de rim e segmento do lobo hepático de ratos com 60 dias de vida submetidos à administração de ácido metilmalônico (MMA) e acetato de amônio (AA) isoladamente ou em combinação. Aumento: 10 e 25X.

O próximo passo foi investigar o efeito da administração de MMA e/ou AA sobre parâmetros bioenergéticos em ratos de 15, 30 e 60 dias. Inicialmente, avaliou-se os efeitos da administração de MMA associado ou não com AA, sobre a atividade da enzima CK. Pode-se observar na Figura 15 que essa atividade foi inibida apenas no tecido hepático de animais com 60 dias de vida pertencentes aos grupos AA e MMA+AA, em comparação ao grupo controle, sem qualquer alteração no tecido renal dos mesmos animais (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA), associado ou não a acetato de amônio (AA), sobre a atividade da enzima creatina cinase (CK) em fígado e rins de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento.

Tecido	Controle	MMA	AA	MMA+AA
<u>Ratos com 15 dias de vida</u>				
Fígado	0,164 ± 0,01	0,168 ± 0,02	0,156 ± 0,09	0,190 ± 0,02
Rim	0,190 ± 0,01	0,158 ± 0,06	0,174 ± 0,10	0,216 ± 0,02
<u>Ratos com 30 dias de vida</u>				
Fígado	0,325 ± 0,03	0,409 ± 0,06	0,416 ± 0,06	0,254 ± 0,03
Rim	0,331 ± 0,04	0,327 ± 0,06	0,347 ± 0,01	0,265 ± 0,06
<u>Ratos com 60 dias de vida</u>				
ígado	0,126 ± 0,02	0,094 ± 0,01	0,070 ±	0,880 ± 0,14*

			0,01*	
Rim	$0,096 \pm 0,01$	$0,144 \pm 0,03$	$0,122 \pm 0,002$	$0,100 \pm 0,01$

Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em \square mol de creatina \cdot min⁻¹ \cdot mg proteína⁻¹. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan).

A seguir, foram avaliadas as atividades das enzimas do ciclo de Krebs CS e SDH em rim e fígado de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento submetidos a um modelo experimental de MMAemia associado ou não à hiperamonemia. Como observado na figura 15, a administração de MMA isoladamente aumentou a atividade da CS em tecido hepático e inibiu a mesma atividade no tecido renal (Figuras 15A e 15C). Adicionalmente, a administração concomitante de MMA e AA induziu um aumento das atividades da CS e SDH em tecido hepático e renal, respectivamente (Figuras 15A e 15D). Não houve alteração estatisticamente significativa da atividade da enzima SDH em fígado de animais de 15 dias (Figura 15B).

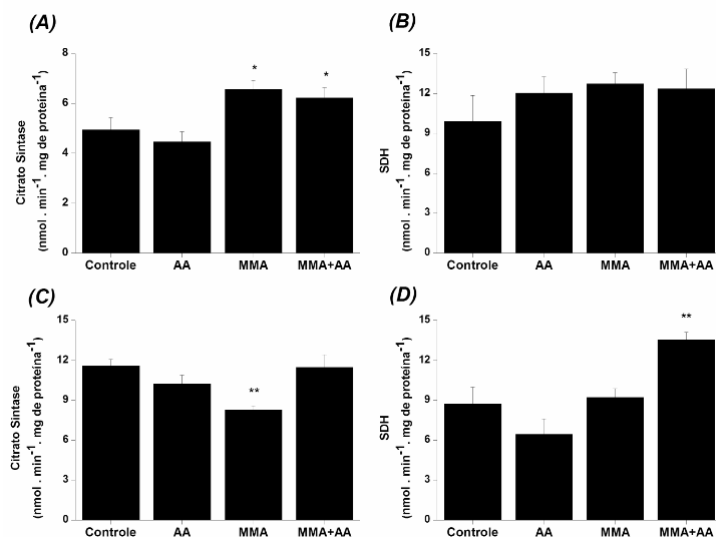


Figura 15 - Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) isoladamente ou em combinação com acetato de amônio (AA) sobre a atividade das enzimas citrato sintase (CS) e succinato desidrogenase (SDH) em fígado e rim de ratos de 15 dias de vida: (A) atividade da enzima CS no tecido hepático; (B) atividade da enzima SDH no tecido hepático; (C) atividade da enzima CS no tecido renal; (D) atividade da enzima SDH no tecido renal. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 5 animais em cada grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan).

Em animais com 30 dias de vida, observou-se um aumento da atividade da enzima SDH em tecido hepático de animais submetidos à administração isolada de AA. Os animais dos grupos MMA e MMA+AA apresentaram atividade aumentada dessa mesma enzima em fígado (Figura 16B), porém foi observada uma inibição da atividade da SDH em rins (Figura 16D). Por outro lado, não foi observada alteração significativa da atividade da enzima CS em nenhum dos tecidos avaliados (Figuras 16A e 16C).

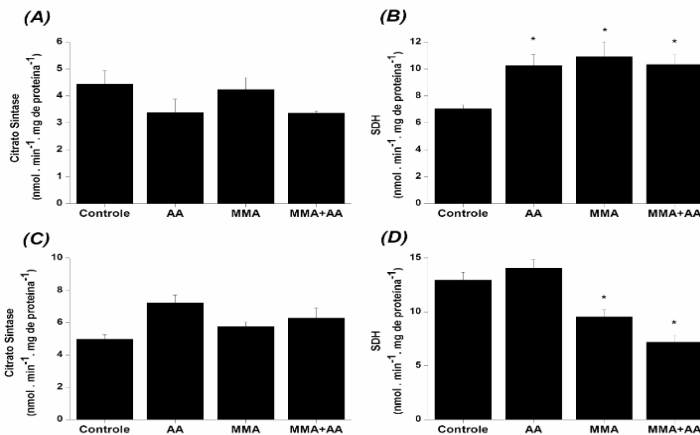


Figura 16 - Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) isoladamente ou em combinação com acetato de amônio (AA) sobre a atividade das enzimas citrato sintase (CS) e succinato desidrogenase (SDH) em fígado e rim de ratos de 30 dias de vida: (A) atividade da enzima CS no tecido hepático; (B) atividade da enzima SDH no tecido hepático; (C) atividade da enzima CS no

tecido renal; (D) atividade da enzima SDH no tecido renal. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 5 animais em cada grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan).

Adicionalmente, as mesmas atividades enzimáticas foram avaliadas em fígado e rim de ratos com 60 dias de vida submetidos à administração de MMA e/ou AA. A figura 17 demonstra que a administração isolada de AA e em combinação com MMA inibiu a atividade da enzima SDH no tecido hepático, mas aumentou essa atividade em rim (Figuras 17B e 17D, respectivamente). Por outro lado, não foi observada alteração significativa da atividade da enzima CS em nenhum dos tecidos avaliados (Figuras 17A e 17C).

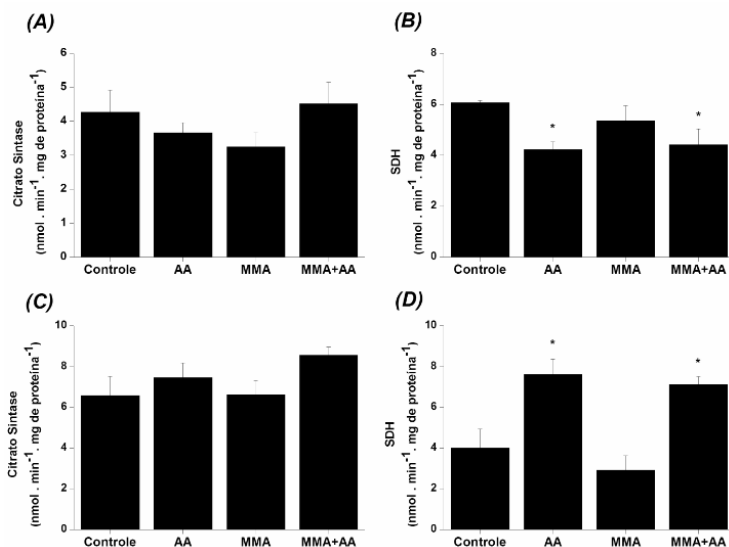


Figura 17 - Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) isoladamente ou em combinação com acetato de amônio (AA) sobre a atividade das enzimas citrato sintase (CS) e succinato desidrogenase (SDH) em fígado e rim de ratos de 60 dias de vida: (A) atividade da enzima CS no tecido hepático; (B) atividade da enzima SDH no tecido hepático; (C) atividade da enzima CS no tecido renal; (D) atividade da enzima SDH no tecido renal. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 5 animais em cada grupo

experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan).

A seguir, investigou-se os efeitos da administração de MMA, combinado ou não com AA, em fígado e rins de ratos em diferentes estágios do desenvolvimento sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Em animais com 15 dias de vida, foi observado um aumento da atividade do complexo IV da cadeia respiratória em rim de animais pertencentes ao grupo MMA+AA (Figura 18D). As demais atividades não foram alteradas pela administração de MMA e/ou AA.

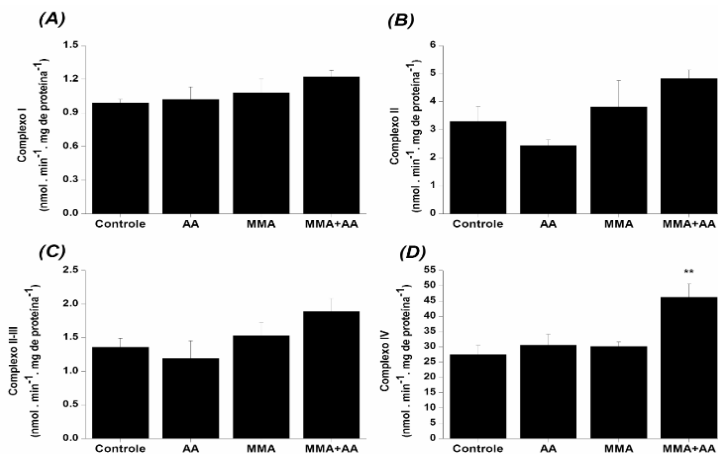


Figura 18 - Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) e/ou acetato de amônio (AA) sobre a atividade dos complexos I (A), II (B), II-III (C) e IV (D) da cadeia respiratória em rim de ratos com 15 dias de vida. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 5 animais em cada grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan).

Por outro lado, a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória foi aumentada em fígado de animais de 15 dias de vida pertencentes ao grupo MMA+AA (Figura 19C). As atividades dos demais complexos da cadeia respiratória não foram alteradas no tecido hepático dos mesmos animais.

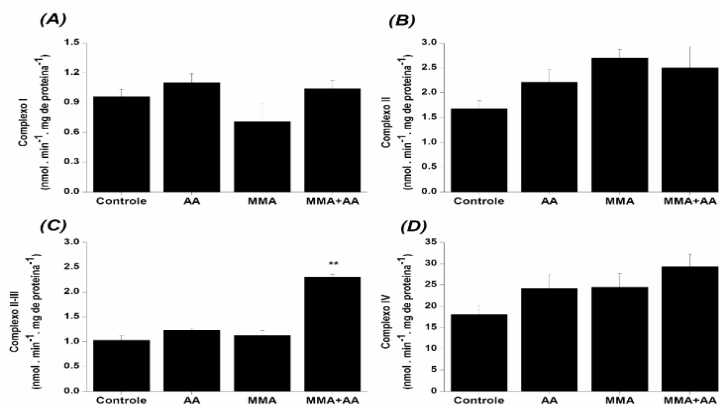


Figura 19 - Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) e/ou acetato de amônio (AA) sobre a atividade dos complexos I (A), II (B), II-III (C) e IV (D) da cadeia respiratória em fígado de ratos com 15 dias de vida. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 5 animais em cada grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan).

Além disso, foram avaliadas as atividades dos complexos da cadeia respiratória em homogeneizados de rim e fígado de ratos com 30 dias de vida. A administração combinada de MMA e AA causou diminuição das atividades dos complexos II e II-III em tecido renal de ratos. Por outro lado, não houve alteração das demais atividades enzimáticas neste tecido (Figura 20).

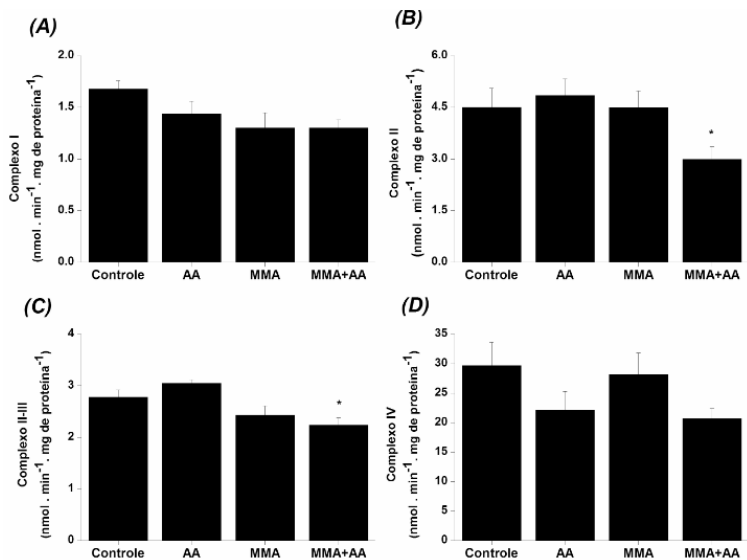


Figura 20 - Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) e/ou acetato de amônio (AA) sobre a atividade dos complexos I (A), II (B), II-III (C) e IV (D) da cadeia respiratória em rim de ratos com 30 dias de vida. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 5 animais em cada grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan).

Em homogeneizado de tecido hepático, pode-se observar um aumento da atividade do complexo I e uma inibição do complexo II da cadeia respiratória em animais submetidos à administração de MMA isoladamente e associado ao AA. Não foram identificadas alterações estatisticamente significativas nas demais atividades enzimáticas no tecido hepático (Figura 21).

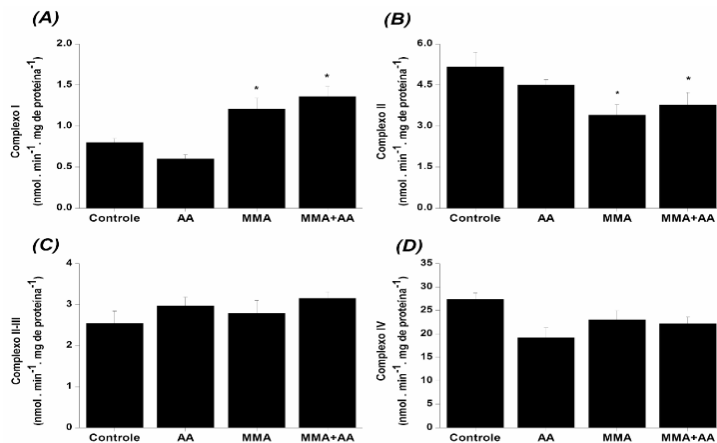


Figura 21 - Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) e/ou acetato de amônio (AA) sobre a atividade dos complexos I (A), II (B), II-III (C) e IV (D) da cadeia respiratória em fígado de ratos com 30 dias de vida. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 5 animais em cada grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan).

Em homogeneizado de tecido renal de animais com 60 dias de vida, a administração isolada de MMA inibiu a atividade do complexo IV da cadeia respiratória, o que não ocorreu quando uma associação de MMA e AA foi administrada (Figura 22D). As atividades dos complexos I, II e II-III não foram alteradas em nenhum dos grupos experimentais em rim de animais com 60 dias de vida.

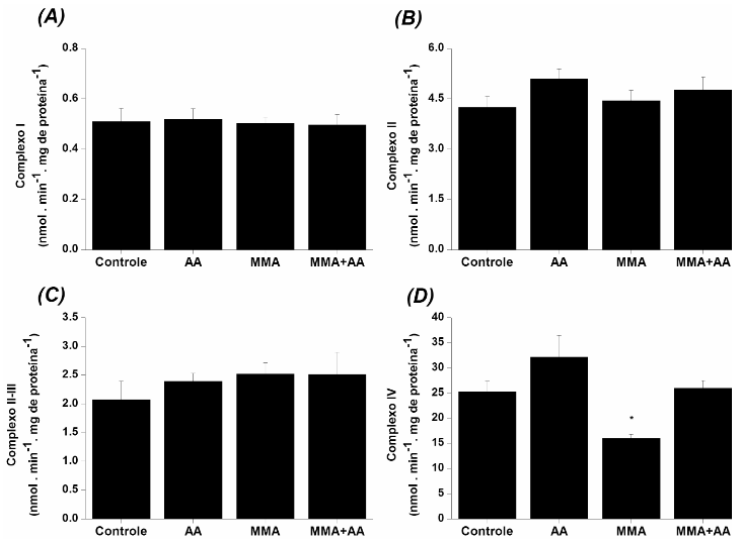


Figura 22 - Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) e/ou acetato de amônio (AA) sobre a atividade dos complexos I (A), II (B), II-III (C) e IV (D) da cadeia respiratória em rim de ratos com 60 dias de vida. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 5 animais em cada grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. $**p < 0,01$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan).

Por outro lado, não houve nenhuma alteração significativa das atividades dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial em tecido hepáticos de animais com 60 dias de vida submetidos à administração isolada ou associada de MMA e AA (Figura 23).

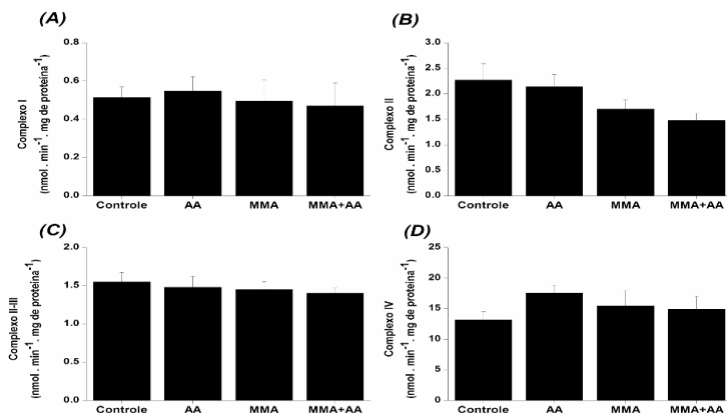


Figura 23 - Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) e/ou acetato de amônio (AA) sobre a atividade dos complexos I (A), II (B), II-III (C) e IV (D) da cadeia respiratória em fígado de ratos com 60 dias de vida. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 5 animais em cada grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via).

Por fim, foram avaliados parâmetros inflamatórios em rim e fígado de ratos com 30 dias de vida submetidos à administração conjunta ou separada de MMA e AA. Inicialmente, foram avaliados os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α em homogeneizados de tecido hepático. Nestas amostras, foram observados aumento dos níveis IL-6 nos animais do grupo MMA+AA (Figura 24B) e aumento dos níveis de TNF α nos grupos experimentais AA, MMA e MMA+AA (Figura 24C). Diferentemente desses achados, os níveis de IL-1 β nessas amostras não foram alterados em nenhum dos grupos experimentais (Figura 24A).

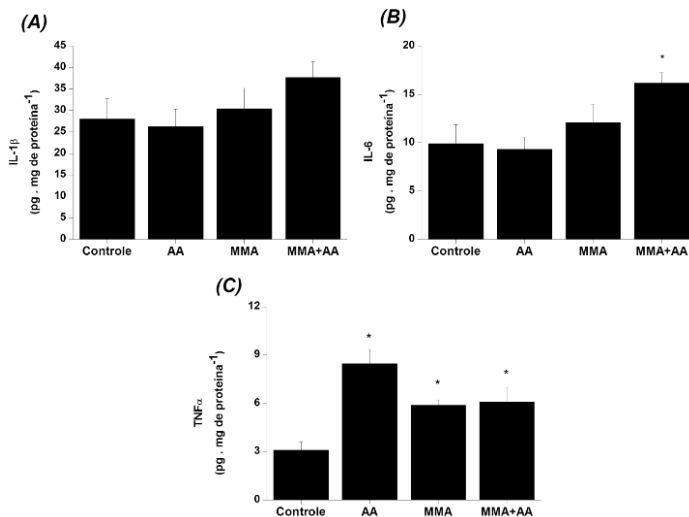


Figura 24- Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) e/ou acetato de amônio (AA) sobre os níveis IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF α (C) em fígado de ratos com 30 dias de vida. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 5 animais em cada grupo experimental e estão expressos em $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (IL-1 β e TNF α) ou $\text{pg} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ (IL-6). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan).

Finalmente, foram avaliados os níveis de citocinas em homogeneizados de tecido renal de animais com 30 dias de vida que receberam administração combinada ou isolada de MMA e AA. As figuras 25A e 25B demonstram que, por um lado, não houve alteração dos níveis de IL-1 β e IL-6, respectivamente, nesse tecido. Por outro lado, os níveis de TNF α foram aumentados significativamente no rim de animais que receberam MMA isoladamente ou associado ao AA (Figura 25C).

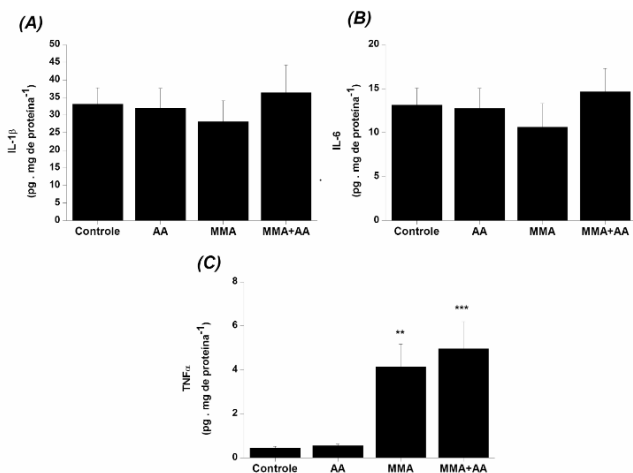


Figura 25 - Efeito da administração de ácido metilmalônico (MMA) e/ou acetato de amônio (AA) sobre os níveis IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF α (C) em rim de ratos com 30 dias de vida. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 5 animais em cada grupo experimental e estão expressos em $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (IL-1 β e TNF α) ou $\text{pg} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ (IL-6). *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* dos raios múltiplos de Duncan)

6 DISCUSSÃO

Apesar dos diversos estudos investigando a fisiopatologia da MMAemia, os exatos mecanismos que levam ao marcado dano tecidual nos pacientes ainda não estão esclarecidos. Além disso, Chandler et al. (2007) descreveram que uma crise metabólica desenvolvida nas primeiras 24-48 horas pode ser fatal em animais e que, nessas situações, os níveis de MMA foram dramaticamente elevados em músculo esquelético, rins, fígado e cérebro desses animais. Com a evolução da doença observou-se elevação extrema de MMA em diversos tecidos, principalmente no fígado. Além do acúmulo de MMA nos tecidos, a hiperamonemia é um achado bioquímico comumente encontrado em pacientes afetados pela MMAemia (Fenton et al., 2001; Fenton e Rosenberg, 2001). No presente estudo, avaliou-se o efeito da administração aguda de MMA sobre a função e a histologia hepática e renal, bem como o efeito destes tratamentos isolados ou em combinação sobre parâmetros inflamatórios e de bioenergética em fígado e rim de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento.

Inicialmente, este estudo demonstrou que a administração isolada de MMA diminuiu significativamente a atividade da função excretora dos rins nos animais com 7, 30 e 60 dias de vida, o que foi evidenciado através de alterações nos níveis séricos de ureia e de creatinina e pela TFG. Estes dados estão em concordância com os descritos por Humer et al. (2014), que observaram a ocorrência de síndrome urêmica em aproximadamente 50 % dos pacientes acometidos pela MMAemia. Segundo Manoli e Venditti (2010), a MMAemia, além de complicações que acometem o sistema nervoso central e descompensações metabólicas sistêmicas, apresenta complicações secundárias como nefrite no túbulo intersticial e doença renal progressiva. Nesse contexto, foram observadas neste trabalho alterações das estruturas responsáveis pela filtração glomerular como alterações da estrutura glomerular, túbulos proximais e distais, além de substituição do epitélio em algumas áreas, o que poderia explicar as alterações na função renal destes animais e corroborar os estudos que demonstram alterações histológicas em rim de pacientes afetados pela MMAemia e em modelos animais genéticos desta doença (Morath et al., 2013).

Fischer et al. (2014) descreveram que a recuperação da função renal é pouco significativa quando a sintomatologia não oferece subsídios consistentes para relacionar o quadro clínico com a sua causa. Nestes casos, a alteração genética só é descoberta após sucessivas internações hospitalares, com sintomas heterogêneos, e com importante

perda da função excretora renal (Bouts et al., 2010). Brassier et al. (2013) referem que a função renal não é sempre recuperada após transplante em pacientes com MMAemia, e que nestes podem ser comumente observadas fibrose intersticial e atrofia tubular, sem a melhora da toxicidade sistêmica provocada pelo dano renal, que pode ser evidenciada pelos altos níveis séricos de creatinina. Disfunção tubular renal com progressão para nefrite crônica tubulointersticial foi observada em estágios avançados da doença renal. Esta característica é uma manifestação comum na MMAemia, bem como são pancreatite, acidente vascular cerebral, atrofia do nervo óptico, disfunção imune e especialmente doença renal (Manoli et al., 2013).

Manoli e Venditti (2010) descreveram que a morbidade a longo prazo na MMAemia inclui insuficiência renal, necessitando de hemodiálise e/ou transplante renal, cardiomiopatia e atraso no crescimento e no desenvolvimento, além de alterações no sistema nervoso central. Höster et al. (2007) encontraram nefrite tubulointersticial e perda progressiva da função renal em todos os pacientes, incluindo aqueles que aparentam ser pouco afetados ou que receberam transplante hepático. Adicionalmente, Manoli et al. (2013) descreveram disfunção tubulointersticial, nefrite, instabilidade metabólica, complicações sistêmicas e alta letalidade em pacientes com MMAemia, além de redução da TFG, degeneração mitocondrial, visualizadas através de megamitocôndrias, e redução da atividade da enzima citocromo *c* oxidase no tecido renal. A hipótese mais aceita como causa dessas alterações é a de que o MMA cause nefrotoxicidade direta. Nesse sentido, Viegas et al. (2014), em análise histológica de tecido cerebral após administração intracerebroventricular de MMA em animais submetidos a um modelo experimental de hiperamonemia, encontraram vacuolizações, edema pericelular, isquemia, alterações do estado *redox* e anormalidades morfológicas das estruturas cerebrais. Algumas dessas alterações são similares às encontradas no tecido renal no presente estudo, incluindo vacuolização, desestruturação celular com desintegração da sua estrutura tecidual, alteração do epitélio e retração glomerular.

Além de alterações renais, danos hepáticos encontrados em pacientes acometidos pela MMAemia como os descritos por Brassier et al. (2013) também foram encontrados no presente modelo experimental. Neste sentido, observou-se aumento estatisticamente significativo da atividade das enzimas AST e ALT em animais com 60 dias de vida que receberam o MMA isoladamente ou em combinação com AA. Também foram observadas alterações histológicas hepáticas nos diferentes

estágios de desenvolvimento investigados neste estudo. No entanto, um estudo em que foram avaliadas crianças com hiperamonemia primária em acompanhamento clínico não encontrou diferenças significativas no crescimento e no desenvolvimento ou em indicadores séricos bioquímicos como citrulina, albumina e proteínas totais (Pei et al., 2015). Contudo, em algumas crianças foi possível observar desnutrição e microcefalia além de deficiência intelectual, reforçando a proposta da toxicidade da amônia. Neste contexto, a insuficiência hepática aguda foi relacionada a um comprometimento da função encefálica, provavelmente secundária ao aumento da amônia e inflamação crônica deste órgão (Chanprasert e Scaglia, 2015). Sokal et al. (2014) descreve alterações na estrutura do parênquima hepático compatíveis com fibrose e hepatopatia crônica, além de alterações metabólicas e processo inflamatório crônico, resultando na necessidade de transplante hepático para a correção parcial da sintomatologia e do curso da doença. Este mesmo trabalho mostrou aumento nos níveis teciduais de TNF α , indicando um processo inflamatório, o que está em concordância com os achados do presente estudo.

Complicações devidas ao comprometimento da função renal e hepática, como acidose metabólica e hiperamonemia, foram descritas anteriormente em pacientes acometidos pela MMAemia em diversos estudos (Leonard 2000; Als-Nelsen et al., 2004; de Baulny et al., 2005; Seashore et al., 2009; Vernon et al., 2014). Também deve-se ressaltar que outros sintomas pouco específicos que podem ter correlação com a disfunção renal e hepática, como encefalopatia, coma e cardiomiopatia mostrando intervalo Q-T prolongado, também são frequentemente descritos em pacientes acometidos pela MMAemia (Grünert et al., 2012; Imen et al., 2012).

No presente estudo, também foi demonstrado que a administração isolada de MMA altera a atividade de importantes enzimas envolvidas na bioenergética celular em rim e fígado de ratos em diferentes estágios do desenvolvimento. Primeiramente, foram observadas alterações na atividade da CK, enzima importante para o tamponamento energético celular, no tecido hepático dos animais dos grupos AA e MMA+AA. Adicionalmente, foram observadas alterações nas atividades de duas importantes enzimas do ciclo de Krebs, a CS e a SDH. Esses achados são corroborados por estudos anteriores que demonstraram que o MMA *in vitro* causa inibição da atividade da SDH em rim e fígado de ratos jovens (Brusque et al., 2002; Pettenuzzo et al., 2006; Schuck et al., 2013). Também foram evidenciadas alterações em atividades dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial nos dois tecidos

avaliados dos animais submetidos ao protocolo experimental usado neste trabalho. Uma disfunção da cadeia respiratória pode elevar a geração de ERO e inibir a síntese de ATP, distúrbios na homeostasia do cálcio intracelular, desequilíbrio proteico citosólico e mitocondrial, mitofagia e morte celular (Topf et al., 2016), o que poderia explicar, ao menos parcialmente, a suscetibilidade destes tecidos nos pacientes acometidos pela MMAemia. Neste cenário, Chandler et al. (2013) observaram mitocôndrias anormais nos túbulos proximais e abundância de cópias de mtDNA no fígado de animais $mut^{-/-}$, além de reduzida capacidade enzimática.

Da mesma forma, os efeitos da administração isolada de amônia também foram investigados no presente estudo. Neste sentido, sabe-se que a amônia, em altas concentrações, pode inibir as enzimas do ciclo de Krebs (Lai e Cooper, 1991). Além disso, foi reportado que a intoxicação aguda por amônia leva a um aumento dos níveis séricos de lactato e piruvato, bem como aumento da razão $[NAD^+]/[NADH]$ mitocondrial e redução da razão $[NAD^+]/[NADH]$ citosólica (Hindfelt e Siesjö, 1971; Hawkins et al., 1973; Hindfelt et al., 1977), indicando que os mecanismos de toxicidade da amônia podem envolver depleção de ATP intracelular e desequilíbrio *redox* (Hawkins et al., 1973). Considera-se hiperamonemia quando os níveis plasmáticos deste composto nitrogenado encontram-se superiores a 50 $\mu\text{mol/L}$ em indivíduos adultos ou maior do que 100 $\mu\text{mol/L}$ em recém-nascidos. No entanto, foi observado que, na dose e regime de tratamento escolhidos no presente estudo, a administração de amônia isoladamente apresentou um baixo potencial de toxicidade, permitindo, assim, a verificação de efeitos sinérgicos entre a ação desta biomolécula e do MMA.

Por fim, foram avaliados marcadores de processos inflamatórios em tecidos renal e hepático de animais submetidos ao protocolo experimental apresentado no presente estudo. Foi observado um aumento dos níveis de IL-6 apenas no fígado dos animais pertencentes ao grupo MMA+AA, sugerindo um efeito sinérgico entre os dois compostos. Por outro lado, houve aumento da citocina pró-inflamatória TNF α em ambos os tecidos avaliados dos animais que receberam administração isolada de MMA ou associado ao AA. Nesse sentido, Fu et al. (2012) descreveram que níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF α , IL-1 β e IL-6, levam a doença inflamatória, desencadeando uma cascata de eventos que pode culminar em coagulopatia pulmonar. Essas moléculas pró-inflamatórias podem ativar a cascata de coagulação através do fator estimulador de tecido, resultando na deposição de fibrina na microvasculatura pulmonar.

Vários estudos podem ser tomados como resultado final de processos inflamatórios. Koenig et al. (2015) descreveram insuficiência renal aguda ou crônica como resultado de nefrite tubulointersticial, microangiopatia trombótica, síndrome hemolítica urêmica com hemólise, hipertensão arterial, proteinúria, hematúria, glomerulosclerose e glomerulopatia atípica. Além disso, Sharma et al. (2007) e Humer et al. (2014) descreveram doença multissistêmica com sintomatologia heterogênea incluindo complicações neurológicas, neuropsiquiátricas, hematológicas, renais e trombóticas. Ainda, D'Angio et al. (2001) observaram nefrite túbulo-intersticial com infiltração de células mononucleares, fibrose intersticial e atrofia tubular, sendo a alteração tubular relatada como efeito secundário ao dano tubular. Adicionalmente, Sokal et al. (2014) descreveram alterações na estrutura do parênquima hepático, como fibrose e hepatopatia crônica, além de alterações metabólicas e processo inflamatório crônico, havendo similaridade com os achados do estudo atual no que se refere ao TNF α . Neste cenário, Labouesse et al. (2015) ressaltam que estes distúrbios tem potencial para alterar a homeostasia do metabolismo da glicose, levar a resistência à insulina, aumentar a permeabilidade vascular e alterar a composição da microbiota, além de déficits comportamentais e cognitivos.

Teixeira et al. (2014) destacaram que a IL-6 é uma importante citocina envolvida em diversos processos imunológicos, atuando na regulação metabólica e que, durante uma reação inflamatória, pode ocasionar efeitos deletérios em diversos órgãos. Neste sentido, o aumento dos níveis séricos de IL-6 pode inibir a enzima óxido nítrico sintase endotelial, facilitando a formação de trombos e, conseqüentemente, aumentando o risco de eventos cardiovasculares. Hein et al. (2009) destacaram a influência da inflamação sobre a geração de ERO, piorando a disfunção endotelial. Estes eventos, segundo Verma et al. (2006), seriam levados a cabo através de fatores pró-inflamatórios como IL-6 e TNF α , podendo estes estarem implicados na fisiopatologia da disfunção cardiovascular como manifestação da MMAemia congênita ou quando esta se manifesta na tenra idade.

Colín-González et al. (2015) postularam que o MMA pode ser um ativador de processos inflamatórios e, com a permanência do processo, este distúrbio poderia desempenhar função importante na degeneração celular durante episódios patológicos. Infantino et al. (2013) descreveram que há evidências crescentes relacionando o déficit do metabolismo energético com eventos inflamatórios mediados pela enzima citrato liase, e que estes processos podem estar na base da

patogênese de alguns processos patológicos humanos. Neste contexto, Ribeiro et al. (2013) encontraram em ratos administrados com o MMA uma redução do número de neutrófilos polimorfonucleares e aumento dos níveis de IL- 1β e TNF α no sangue e no tecido cerebral.

A deterioração da função encefálica devido a alterações metabólicas podem ser consequência dos efeitos deletérios causados pelo diretamente pelo MMA ou secundária à hepatopatia desencadeada por este ácido orgânico. Esta última pode levar à hiperamonemia e, conseqüentemente, à encefalopatia hepática. Braissant et al. (2013) descreveram que a hiperamonemia provoca danos irreversíveis ao desenvolvimento sistema nervoso central, tais como atrofia cortical, alargamento ventricular e desmielinização, e estas alterações podem levar a disfunção cognitiva, convulsões e paralisia cerebral. Nesse sentido, Aghaei et al. (2016) encontraram alterações nas propriedades eletrofisiológicas intrínsecas do tecido nervoso em um modelo animal de encefalopatia hepática. Através de investigações neuropatológicas Brissant (2010) e Butterworth (2015) citam que a insuficiência hepática provoca distúrbio metabólico, edema astrocitário, citotoxicidade, hipertensão intracraniana e aumento da ativação de células gliais como resposta inflamatória. Ainda, Aldridge et al. (2015) descreveram que a patogênese da encefalopatia hepática associada à hiperamonemia pode estar relacionada com uma complexa rede de eventos em várias rotas metabólicas relacionadas a processo inflamatório, imunossupressão e indução de estresse oxidativo.

Baumgartner et al. (2014) descrevem que, na MMAemia, os sintomas podem variar consideravelmente de acordo com o estágio de desenvolvimento do paciente, podendo apresentar comprometimento de sistemas e órgãos diferentes. Deve-se ressaltar que, na adolescência, comumente são encontrados episódios de alterações do estado mental, perda da consciência, encefalopatia, falência de múltiplos órgãos, colapso circulatório, cefaleia, dores abdominais, vômitos, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e da aprendizagem nestes pacientes (Ahrens-Nicklas et al., 2015). Neste sentido, o presente trabalho é o primeiro a comparar efeitos tóxicos do MMA associado à hiperamonemia em diferentes idades. Interessantemente, os efeitos encontrados neste estudo foram mais proeminentes nas idades mais avançadas aqui estudadas, o que poderia ser devido à maior plasticidade tecidual de animais jovens.

Diversos estudos investigaram a toxicidade isolada do MMA (Wajner et al., 1992; Calabresi et al., 1998; McLaughlin et al., 1998; Okun et al., 2002; Brusque et al., 2002; Marisco et al., 2003; Royes et

al., 2003; Fleck et al., 2004) e tais achados, associados aos resultados do presente estudo, corroboram a hipótese de que a toxicidade deste ácido orgânico é responsável pelos danos renais e hepáticos na MMAemia. No presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez que os efeitos tóxicos do MMA são potencializados pela administração simultânea de AA. É importante ressaltar que 70 % dos pacientes acometidos por esta doença apresentam hiperamonemia (Fenton e Rosenberg, 1995), indicando a relevância da combinação dos efeitos destes compostos para o desenvolvimento dos sintomas clínicos. Neste sentido, os resultados do presente estudo indicam que a hiperamonemia potencializa os efeitos do MMA em fígado e rim de ratos em diferentes estágios do desenvolvimento, particularmente sobre a bioenergética, processos inflamatórios e função e histologia hepática e renal. Acredita-se que o entendimento dos exatos mecanismos que levam ao dano tecidual auxiliará no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para os pacientes acometidos pela MMAemia.

7 CONCLUSÕES

- O MMA induz alterações histológicas e altera parâmetros de bioenergética em tecidos renal e hepático;
- O AA e o MMA apresentam efeito sinérgico sobre histologia celular e parâmetros de bioenergética e de inflamação;
- Os achados do presente trabalho sugerem a participação do MMA associado à hiperamonemia nos mecanismos fisiopatológicos da MMAemia.

REFERÊNCIAS

Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem.* 2000; 275(48): 24-32.

Acquaviva AC, Benoist JF, Pereira S, Callebaut I, Koskas T, Porquet D. Molecular basis of methylmalonyl-Coa mutase apoenzyme defect in 40 European patients affected by mut(o) and um(-) forms of methylmalonic acidemia: identification of 29 novel mutations in the gene. *Hum Mutat.* 2005; 25 (2):67-76.

Aebi H. Catalase in vivo. *Methods Enzymol.* 1984;(105):11-6.

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum. In: *Alzheimer disease. Neurosc Letters.* 2001; 302(2):141-145.

Aghaei I, Hajali V, Dehpour A, Haghani M, Sheibani V, Shabani M. Alterations in the intrinsic electrophysiological properties of Purkinje neurons in a rat model of hepatic encephalopathy: Relative preventing effect of PPAR γ agonist. *Brain Research Bulletin.* 2016; (121): 16-25.

Ahrens-Nicklas RC, Slap G, Ficiocioglu C. Adolescent Presentations of Inborn Errors of Metabolism. *Journal of Adolescent Health.* 2015; (56): 477-482.

Aldridge DR, Tranah EJ, Shawcross DL. Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: Role of Ammonia and Systemic Inflammation. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology.* 2015; 5 (1):7-20.

Als-Nelsen B, Gluud LL, Gluud C. Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. *Bmj.* 2004; 328(7):10-46.

Alves A, Macedo DV, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação *Anal Biochem.* 2007; 323(5): 23-30.

Armstrong D. Free Radical and Antioxidant Protocols, Humana Press. New Jersey; 1998;108.

Arnhold J. Free radicals – friends or foes- Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow)*. 2004; (69): 4-9.

Baldus S, Eiserich HP, Mani A, Castro L, Figueroa M, Chumley P, et al. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest*. 2001; (108):59-70.

Ballhausen D, Mittaz L, Boulat O, Bonafé L, Braissant O. Evidence for catabolic pathway of propionate metabolism in CNS: expression pattern of methylmalonyl-CoA mutase and propionyl-CoA carboxylase alpha-subunit in developing and adult rat brain. *Neurosci*. 2009; 164 (2):78-87.

Bannisters JV, Calabrese L. Assay for sod. *Meth Biochem*. 1987; (32): 279-312.

Barker HA. Coenzyme B₁₂-dependent mutases causing carbon chain rearrangements, in Boyer PD (Ed.), *The Enzymes*. Academic Press. New York; 1972; 6 (3):509-537.

Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova*. 2006; 29 (1):113-23.

Baumgartner MR, Hörster F, Dionisi-Vici C, Haliloglu G, Karall D, Chapman KA, Huemer M, Hochuli M, Assoun M, Ballhausen D, Burlina A, Fowler B, Grünert SC, Grünewald S, Honzik T, Merinero B, Pérez-Cerdá C, Scholl-Bürgi S, Skovby F, Wijburg F, MacDonald A, Martinelli D, Sass JO, Valayannopoulos V, Chakrapani A. Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia. *Orphanet J Of Rare Diseases*, 2014; (2): 9-13.

Beld J, Lee DJ, Burkart MD. Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering. *Mol Bio Syst*. 2015; (11):38-59.

Bem-Menachem E, Kyllerman R, Markleind S. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. *Epilepsy Res.* 2000; (40):33-39.

Bennett, CF, Kaeberlein M. The mitochondrial unfolded protein response and increased longevity: cause, consequence or correlation? *Exp. Gerontol.* 2014; (56): 142-146.

Bessman SP. Hexokinase acceptor theory of insulin action. New evidence. *Isr J Med Sci.* 1972; (3): 44-52.

Biancheri R, Cerone R, Rossi A, Schiaffino MC, Caruso U, Minniti G, Perrone MV, Tortori-Donati P, Veneselli E. Early-onset cobalamin C/D deficiency: epilepsy and electroencephalographic features. *Epilepsia.* 2002; (43):616-622.

Borato DCK, Parabocz GC, Ribas JT, Netto HP, Erdmann FC, Wiecheteck LD, Manente FA, Almeida Mello LR, Belló C, Santos FA, Borba LM, Velloso JCR. Biomarkers in Obesity: Serum Myeloperoxidase and Traditional Cardiac Risk Parameters. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2016; (124): 49-54.

Bouts AH, Roofthoof MTR, Gajja S, Salomons GS, Davin JC. CD-46 associated atypical hemolytic uremic syndrome with uncommon course caused by cblC deficiency. *Pediatr Nephrol.* 2010; 25(12): 2547-2548.

Boxer AL, Kramer JH, Johnston K, Goldman J, Finley R, Miller BL. Executive dysfunction in hyperhomocystinemia responds to homocysteine-lowering treatment. *Neurology.* 2005; (64): 1431-1434.

Boxma B, De Graaf RM, Van Der Staay GW et al. An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature.* 2005; 434(7): 4-9.

Brassier A, Boyer O, Valayannopoulos V, Ottolenghi C, Krug P, Cosson MA, Touati G, J.B. Arnoux JB, Barbier V, Bahi-Buisson N, Desguerre I, Charbit M, Benoist JF, Dupic L, Aigrain Y, Blanc T, Salomon R, Rabier D, Guest G, Lonlay de P, Niaudet P. Renal transplantation in 4 patients with methylmalonic aciduria: A cell therapy for metabolic disease. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2013; (110): 106-110.

Barrett N A; Austen K F. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Cell press.* 2009; (31): 424-437.

Braissant O, McLin VA, Cudalbu C. Toxicidade da amônia para o cérebro. *J Inher Metab Dis.* 2013; (36): 595-612.

Braissant O. Current concepts in the pathogenesis of urea cycle disorders. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2010; (100): 3-12.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe Sobre regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviço de saúde. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 306, de 7 de dezembro 2004.

Broide D, Sriramarao P. Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. *Immunol Rev.* 2001; (179): 63-72.

Browne RW, Armstrong, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol.* 1998; (108): 47-52.

Brusilow SW, Horwich AL. Urea cycle enzymes in the metabolic and molecular bases of inherited disease. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle, D. (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill; 2005; 1187-1232.

Brusque AM, Borba R, Schuck PF, Dalcin KB, Ribeiro CAJ, Silva CG, Wannmacher CMD, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Briones P, Wajner M. Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complex activities in rat tissues. *Neurochemistry International* 2002; (40): 593-601.

Brusilow SW, Horwich AL. Urea Cycle Enzymes. In: Scriver CR, Sly WS (eds). *The metabolic & molecular bases of inherited disease.* 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.

Buettner GR. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; (300): 535-537.

Burk RF, Levander OA. *Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença.* 9. ed. vol. I. São Paulo: Manole; 2002.

Butterworth RF. Pathogenesis of Hepatic. Encephalopathy and Brain Edema in Acute Liver Failure. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2015; 5 (1): 96-103.

Cagnon L, Braissant O. Hyperammonemia-induced toxicity for the developing central nervous system. *Brain Res Rev*. 2007; 56 (1):183-97.

Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Sancesario G, Gubellini P, Marfia GA, Bernardi G. Striatal spiny neurons and cholinergic interneurons express differential ionotropic glutamatergic responses and vulnerability: implications for ischemia and Huntington's disease. *Ann. Neurol*. 1998; (43): 586–597.

Carrillo-Carrasco N, Venditti CP. Combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cblC type. II. Complications, pathophysiology, and outcomes. *J Inherit Metab Dis*. 2012; 35(1): 103-114.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory Action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996; (328): 309-316.

Cooper AI, Plum F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev*. 1987; (67): 440-519.

Chalmers RA, Lawson AM. *Organic acids in man: Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias*. 1. ed. London: Chapman and Hall; 1982.

Chandler RJ, Tarasenko TN, Cusmano-Ozog K, Sun Q, Sutton VR, Venditti CP, McGuire PJ. Liver-directed adeno-associated virus serotype 8 gene transfer rescues a lethal murine model of citrullinemia type 1. *Gene Ther*. 2013; 20 (12): 88-91.

Chandler RJ, Sloan J, Fu H, Tsai M, Stabler S, Allen R, Kaestner KH, Haig H, Kazazian HH, Venditti CP. Metabolic phenotype of methylmalonic acidemia in mice and humans: the role of skeletal muscle. *BMC Medical Genetics*. 2007; 8-64.

Chanprasert S, Scaglia F. Adult liver disorders caused by inborn errors of metabolism: Review and update. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2015; (114): 1-10.

Chwatko G, Boers GH, Strauss KA, Shih DM, Jakubowski H. Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine beta-synthase gene, or a high-methionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice. *FASEB J*. 2007; (21): 1707–1713.

Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*. 2010; (10): 826- 837.

Colín-González AL, Paz-Loyola AL, Serratos I, Seminotti B, Ribeiro CA, Leipnitz G, Souza DO, Wajner M, Santamaría A. Toxic synergism between quinolinic acid and organic acids accumulating in glutaric acidemia type I and in disorders of propionate metabolism in rat brain synaptosomes: Relevance for metabolic acidemias. *Neuroscience*. 2015; (308): 64-74.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins patologia estrutural e funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

D'Angio CT, Dillon MJ, Leonard JV. Renal tubular dysfunction in methylmalonic acidemia. *European Journal of Pediatrics*. 2001; (150): 259-263.

Das AM. Pharmacotherapy of inborn errors of metabolism illustrating challenges in orphan diseases. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2016; (26): 1056-8719.

De Baulny HO, Benoist JF, Rigal O, Touati G, Rabier D, Saudubray JM. Methylmalonic and propionic acidemias: management and outcome. *J Inher Metab Dis*. 2005; 28 (3): 415-23.

Deodato F, Boenzi S, Santorelli FM, Dionisio-Vici C. Methylmalonic and propionic aciduria. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2006; (2):104-12.

Ellman GL, Courtnef KD, Andres VJR, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; (7): 88-95.

Enns GM, Berry SA, Berry GT, Rhead WJ, Brusilow SW, Hamosh A. Survival after Treatment with Phenylacetate and Benzoate for Urea-Cycle Disorders. *N Engl J Med.* 2007; (356): 82-92.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; (186): 07-21.

Fabre V, Beiting DP, Bliss SK, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA. Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *J Immunol.* 2009; 182 (3): 77-83.

Feksa LR, Cornelio A, Dutra-Filho CS. Inhibition of pyruvate kinase activity by cysteine in brain cortex of rats. *Brain Res.* 2004; 1012 (1-2): 10-93.

Felipo V, Kosenko E, Minana MD, Marcaida, G, Grisolia S. Molecular mechanism of acute ammonia toxicity and of its prevention by L-carnitine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994; (368): 65-77.

Fenton WA, Rosenberg LE. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism, in: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 1995; (1):1423–1449.

Fenton WA, Gravel RAA, Rosenblatt DS. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* 2001; 2165-2193.

Fenton WA, Hack AM, Willard HF, Gertler A, Rosenberg LE. Purification and properties of methylmalonyl coenzyme A mutase from human liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1982; (214): 815-823.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000; 408 (9): 39-47.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders M, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim. Acta.* 1985; 153(1): 23-36.

Fischer S, Huemer M, Baumgartner M, Deodato F, Ballhausen D, Boneh A, Burlina AB, Cerone R, Garcia P, Gökçay G, Grünewald S, Häberle J, Jaeken J, Ketteridge D, Lindner M, Mandel H, Martinelli D, Martins EG, Schwab KO, Gruenert SC, Schwahn BC, Sztriha L, Tomaske M, Trefz F, Vilarinho L, Rosenblatt DS, Fowler B, Dionisi-Vici C. Clinical presentation and outcome in a series of 88 patients with the cblC defect. *J Inherit Metab Dis.* 2014; 37 (5): 31-40.

Fleck J, Ribeiro MC, Schneider CM, Sinhorin VD, Rubin MA, Mello CF. Intraatrial malonate administration induces convulsive behavior in rats. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2004; (27): 211-219.

Flint MS, Depree KM, Rich BA, Tinkle SS. Differential regulation of sensitizer-induced inflammation and immunity by acute restraint stress in allergic contact dermatitis. *Journal of Neuroimmunology.* 2003; (140): 28-40.

Fontella FU, Pulrolnik V, Gassen E, Wannmacher CM, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport.* 2000; 11(3): 4-41.

Fournier B, Smeitink JAM, Dorland L. Peroxisomal disorders: a review. *J Inherit Metab Dis.* 1994; 17 (4) :470-486.

Fowler B, Leonard JV, Baumgartner MR. Causes of and diagnostic approach to methylmalonic acidurias, *J Inherit Metab Dis.* 2008; 31(3): 350-60.

Fu PK, Wu CL, Tsai TH, Hsieh CL. Anti-Inflammatory and Anticoagulative Effects of Paeonol on LPS-Induced Acute Lung Injury in Rats. *Hindawi Publishing Corporation.* 2012; (10): 37-48.

Gaeta LM, Tozzi G, Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase

activities in blood of healthy pediatric subjects. *Clin Chim Acta*. 2002; (2): 117-120.

Geiman TM, Muegge K. DNA methylation in early development. *Mol Reprod Dev*. 2010; (77) :105–113.

Gandra PG, Alves AA, Macedo DV, Kubota LT. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Quim Nova*. 2004; 17 (2): 980-987.

Goldblatt H. The effect of high salt intake on the blood pressure of rabbits. *Laboratory Investigation* 1969; (2): 6-8.

Gradinger AB, Bélair C, Worgan LC, Lavallée J, Roquis D, Watkins D, Rosenblatt DS. Atypical methylmalonic aciduria: frequency of mutations in the methylmalonyl-CoA epimerase gene (MCEE). *Hum Mutat*. 2007; 28 (10):10-45.

Gropman AL, Summar M, Leonard JV. Neurological implications of urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30 (6): 65-79.

Grünert SC, Müllerleile S, de Silva L, Barth M, Walter M, Walter K, Meissner T, Lindner M, Ensenaer R, Santer R, Bodamer OA, Baumgartner MR, Brunner-Krainz M, Karall D, Haase C, Knerr I, Marquardt T, Hennermann JB, Steinfeld R, Beblo S, Koch HG, Konstantopoulou V, Scholl-Bürgi S, van Teeffelen-Heithoff A, Suormala T, Sperl W, Kraus JP, Superti-Furga A, Schwab KO, Sass JO. Propionic acidemia: neonatal versus selective metabolic screening. *J Inherit Metab Dis*. 2012; 35 (1):1-9.

Gutierrez C, Beaty G, Lopez-Vancell R, Estrada S. Mechanism of ammonium translocation in rat liver mitochondria. Finger-printing of the translocator. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam*. 1987; 37(2): 57-75.

Haarmann A, Mayr M, Kölker S, Baumgartner ER, Schnierda J, Hopfer H, Devuyst O, Baumgartner MR. Renal involvement in a patient with cobalamin A type (cblA) methylmalonic aciduria: a 42-year follow-up. 2013; (4): 2-6.

Halliwell B; Gutteridge, JMc. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press Inc. New York. 1999; 19 (10):1-4.

Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009; (46): 531-542

Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992; 59 (5): 09-23.

Handy DE, Zhang Y, Loscalzo J. Homocysteine down-regulates cellular glutathione peroxidase (GPx1) by decreasing translation. *J Biol Chem*. 2005; (280): 18-25.

Hansson M, Olsson I, Nauseef WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*. 2006; (445): 214-24.

Hawkins RA, Miller AL, Nielsen RC, Veech RL. The acute action of ammonia on rat brain metabolism in vivo. *Biochem. J*. 1973; (134):1001-1008.

Hein TW, Singh U, Vasquez-Vivar J, Devaraj S, Kuo L, Jialal I. Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in vivo. *Atherosclerosis*. 2009; (206): 61-68.

Hensley K, Williamson KS, Floyd RA. *Free Radical. Biol Med*. 2000; 4(8):118-126.

Hindelfelt B, Siesjö BK. Cerebral effects of acute ammonia intoxication. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*. 1971; (28): 365-374.

Hindelfelt B, Plum F, Duffy TE. Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. *J. Clin. Invest*. 1977; (59): 386-396.

Hoff, VWG, Ledermann SE, Waldron M, Trompeter RS. Earlyonset chronic renal failure as a presentation of infantile nephropathic cystinosis. *Pediatr Nephrol*. 1995; 9 (4): 3-4.

Hoffmann S. Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria - A pathophysiological approach. *J Inherit Metab Dis*. 2008; 31 (2): 597-603.

Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38 (5): 09-50.

Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*. 2006; 25 (3); 49-60.

Hörster F, Baumgartner MR, Viardot C, Suormala T, Burgard P, Fowler B, Hoffmann GF, Garbade SF, Kölker S, Baumgartner ER. Long-term outcome in methylmalonic acidurias is influenced by the underlying defect (mut0, mut-, cblA, cblB). *Pediatr Res*. 2007; 62 (2): 25-30.

Horster F, Hoffmann GF. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of methylmalonic aciduria-recent advances and new challenges. *Pediatr Nephrol*. 2004; 136 (10):11-20.

Hsieh MM, Everhart JE, Byrd-Holt DD, Tisdale JF, Rodgers GP. "Prevalence of neutropenia in the U.S. population: age, sex, smoking status, and ethnic differences". *Ann. Intern. Med.* 2007; 146 (7): 486-92.

Hughes BP. A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chm Acta*, 1962; 7 (5): 7-3.

Humer M, Scholl-Bürgi S, Hadaya K, Kern I, Beer R, Seppi K, Fowler B, Baumgartner M R, Karall D. Three new cases of late-onset cblC defect and review of the literature illustrating when to consider inborn errors of metabolism beyond infancy. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2014; 15 (9):1-6.

Imen M, Hanene B, Ichraf K, Aida R, IlhemTK, Neziha GK. Methylmalonic acidemia and hyperglycemia: an unusual association. *Brain Dev*. 2012; 34 (2): 3-4.

Infantino V, Iacobazzi V, Palmieri F, Menga A. ATP-citrate lyase is essential for macrophage inflammatory response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013; 440 (10): 105-111.

Jafari P, Braissant O, Zavadakova P, Henry H, Bonafé L, Ballhausen D. Brain damage in methylmalonic aciduria: 2-methylcitrate induces

cerebral ammonium accumulation and apoptosis in 3D organotypic brain cell cultures. *Orphanet J Rare Dis.* 2013; 8 (8): 4-8.

Jimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D. The effect of Mendelian disease on human health. In: Scriver CR, Beaudet AR, Sly W, Valle D (eds). *The metabolic and molecular base of inherited disease.* New York: McGraw-Hill; 2001; (1): 67-74.

Kaplan P, Ficicioglu C, Mazur AT, Palmieri MJ, Berry GT. Liver transplantation is not curative for methylmalonic acidopathy caused by methylmalonyl-CoA mutase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2006; 88 (4): 2-6.

Kitto GB. Intra and extramitochondrial malate dehydrogenase from chicken and tuna heart. *Methods Enzymology.* 1969; 13 (69): 107-116.

Klion AD, Nutman TB. The role of eosinophils in host defense against helminth para-sites. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113 (1): 1-7.

Koenig JC, Rutsch F, Bockmeyer C, Baumgartner M, Bodo B, Beck BB, Kranz B, Konrad M. Nephrotic Síndrome and Thrombotic Microangiopathy Caused by Cobalamin C deficiency. *Pediatric Nephrol.* 2015; 30 (7): 3-6.

Ktena YP, Ramstad T, Baker EH, Sloan JL, Mannes AJ, Manoli I, Venditti CP. Propofol administration in patients with methylmalonic acidemia and intracellular cobalamin metabolism disorders: a review of theoretical concerns and clinical experiences in 28 patients. *J Inherit Metab Dis.* 2015; 38 (5): 47-53.

Kvarnhammar AM, Cardel LO. Pattern-recognition receptors in human eosinophils. *Immunology.* 2012; 136 (1): 11-20.

Lai JC, Leong SF. Energy-metabolizing enzymes in brain regions of adult and aging rats. *J Neurochem.* 1981; 37 (6): 48-56.

Lai JCE, Cooper AJ. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *Journal of Neurochemistry.* 1986; 47 (5): 76-86.

Lai CK, Cooper AJL. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochem. Res.* 1991; (16) :795-803.

Lang W, Block TM, Zander R. Solubility of NH₃ and apparent pK of NH₄⁺ in human plasma, isotonic salt solutions and water at 37 degrees. *Clin Chim Acta*, 1998; 273 (1): 43-58.

Labouesse MA, Langhans W, Meyer U. Long-term pathological consequences of prenatal infection: beyond brain disorders. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015; (309): 1-12.

Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharm Therap.* 2006; (111): 16-26.

Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992; 5 (2): 227-231.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5^a ed. São Paulo: Sarvier, c2007.

Leonard JV, Morris AA. Inborn errors of metabolism around time of birth. *Lancet.* 2000; 356 (9): 3-7.

Leonard JV, Morris AA. Urea cycle disorders. *Semin Neonatol.* 2002; (7): 27-35.

Leonard JV. Disorders of the Urea Cycle and Related Enzymes. In: Fernandes J, Saudubray J-M, Van Den Berghe G, Walter JH. Editors. *Inborn Metabolic Diseases*. 2006. 4th ed. Heidelberg: Springer. 2006; 63-72.

Lerner-Ellis JP, Tirone JC, Pawelek PD, Doré C, Atkinson JL, Watkins D, Morel CF, Fujiwara TM, Moras E, Hosack AR, Dunbar GV, Antonicka H, Forgetta V, Dobson CM, Leclerc D, Gravel RA, Shoubridge EA, Coulton JW, Lepage P, Rommens JM, Morgan K, Rosenblatt DS. Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nat Genet.* 2006; 38 (1): 93-100.

Li Y, Peng T, Li L, Wang X, Duan R, Gao H, Guan W, Lu J, Teng J, Jia Y. MicroRNA-9 regulates neural apoptosis in methylmalonic acidemia via targeting BCL2L1. *Int. J. Devl Neuroscience*. 2014; (36): 19-24.

Longo N, Ardon O, Vanzo R, Schwartz E, Pasquali M. Disorders of creatine transport and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2011; (157):72-78.

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

Lygate CA, Bohl S, ten Hove M, Faller KM, Ostrowski PJ, Zervou S, et al. Moderate elevation of intracellular creatine by targeting the creatine transporter protects mice from acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2012; (3): 66-75.

Lukic ML; Arsenijec N; Mitchison NA. Inflammation at the interface of innate and acquired immunity, *Molecular Immunology*. 2009; (47): 1-2.

McLaughlin BA, Nelson D, Silver IA, Erecinska M, Chesselet MF. Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 1998; (86): 279-290.

Malfati CRM. Envolvimento do sistema GABAérgico nas alterações comportamentais eletrencefalográficas e neuroquímicas induzidas pela injeção de metilmalonato no ventrículo de ratos. Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica. UFRGS. Porto Alegre; 2007.

Manoli I, Sysol JR, Li L, Houillier P, Garone C, Wang C, Zerfas PM, Cusmano-Ozog K, Young S, Trivedi NS, Cheng J, Sloan JL, Chandler RJ, Abu-Asab M, Tsokos M, Elkahlon AG, Rosen S, Enns GM, Berry GT, Hoffmann V, DiMauro S, Schnermann J, Venditti CP. Targeting proximal tubule mitochondrial dysfunction attenuates the renal disease of methylmalonic acidemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110 (33): 2-7.

Manoli I, Venditti CP. Long-term Rescue of a Lethal Murine Model of Methylmalonic Acidemia Using Adeno- associated Viral Gene Therapy. *Medical Genetics Information Resource. Molecular Therapy*. 2010; (18): 11-16.

Manoli I, Venditti CP. Isolated Methylmalonic Acidemia. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. Gene Reviews, University of Washington, Seattle, WA, 1993-2016.

Marisco PC, Ribeiro MC, Bonini JS, Lima TT, Mann KC, Brenner GM, Dutra-Filho CS, Mell CF. Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. *Exp. Neurol.* 2003; (182): 455-460.

Marouani I, Hanene B, Ichraf K, Aida R, Ithem T, Naziha K, Neziha GK. Methylmalonic acidemia and hyperglycemia: An unusual association. Department of Child and Adolescent Neurology, UR06/11, National Institute of Neurology, Tunis, Tunisia. *Laboratory of Biochemistry, La Rabta Hospital, Tunis, Tunisia Elsevier*; 2012. 34 (2): 3-4.

Martins AM, D'almaida V, Micheletti C, Santos LMG, Aoki MM, Macedo DM. Erros Inatos do Metabolismo: avaliação de um protocolo de investigação clínica e laboratorial. *Rev. Saúde Pública.* 2000; 76 (5):375-382.

Mas A. Hepatic encephalopathy: from pathophysiology to treatment. *Digestion.* 2006; 73 (1): 86-93.

Matsushita K, Takeuchi O, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, Miyake T, Satoh T, Kato H, Tsujimura T, Nakamura H, Akira S. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature.* 2009; 458 (2); 85-90.

Medzhitov R . Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008; (4): 428-435.

Melo DR, Miranda SR, Assunção NA, Castilho RF. Methylmalonate Impairs Mitochondrial Respiration Supported by NADH-Linked. Substrates: Involvement of Mitochondrial Glutamate Metabolism. *Journal of Neuroscience Research.* 2012; (90): 1190-1199.

Ministério da Saúde (BR). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico

para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Diário Oficial da União. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

Morath MA, Hörster F, Sauer SW. Renal dysfunction in methylmalonic acidurias: review for the pediatric nephrologist. *Pediatr Nephrol*. 2013; 28 (2): 27-35.

Morel CF, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS. Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC): phenotype/genotype correlations and ethnic-specific observations. *Mol Genet Metab*. 2006; 88 (4):15-21.

Morrison JF. The activation of aconitase by ferrous ions and reducing agents. *The Biochemical Journal*. 1954; 58(4): 685- 692.

Nassogne MC, Heron, B.; Touati, G.; Rabier, D.; Saudubray, J.M. Urea cycle defects: management and outcome. *J Inherit Metab Dis*. 2005; 28 (3):07-14.

Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.545-550 p.

Netto CB, Siqueira IR, Portela LV, Tavares MP, Souza DO, Giuliani R, Gonçalves CA. *Clin. Biochem*. 2004; 37 (5): 3-4.

Neubauer S, Remkes H, Spindler M, Horn M, Wiesmann F, Prestle J.. Downregulation of the Na(+)-creatine cotransporter in failing human myocardium and in experimental heart failure. *Circulation*. 1999; (18): 47-50.

Neubauer S. Influence of left ventricular pressures and heart rate on myocardial high-energy phosphate metabolism. *Basic Res Cardiol*. 1998; (1): 2-7.

Neves L, Carreira T. *Bioquímica*. 6 ed. Lisboa: Associação de Estudantes da Faculdade de Ciências de Lisboa; 2003.

Niemi A-K, Kim IK, Krueger CE, Cowan TM, Baugh N, Farrell R, Bonham CA, Concepcion W, Esquivel CO, Enns GM. Treatment of Methylmalonic Acidemia by Liver or Combined Liver-Kidney Transplantation. *J Pediatr* 2015; (166): 55-61.

Nizon M, Ottolenghi C, Valayannopoulos V, Arnoux JB, Barbier V, Habarou F, Desguerre I, Boddaert N, Bonnefont JP, Acquaviva C, Benoist JF, Rabier D, Touati G, de Lonlay P. Long-term neurological outcome of a cohort of 80 patients with classical organic acidurias. *Orphanet Journal Of Rare Diseases*, 2013; 23 (8):4-8.

Nyhan WL, Gargus JJ, Boyle K, Selby R, Koch R. Progressive neurologic disability in methylmalonic acidemia despite transplantation of the liver. *Eur J Pediatr*. 2002; 161(7): 377-379.

O'Hare MCE, Doonan S. Purification and structural comparisons of the cytosolic and mitochondrial isoenzymes of fumarase from pig liver. *Biochimica Biophysica Acta*. 1985; 827(2):127-134.

Oberholzer VG, Levin B, Burgess EA, Young WF. Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. *Arch Dis Child*. 1967; 42 (225): 492-504.

Oliveira AC de, Santos AMN dos, Martins AM, D'almeida V. Triagem para erros inatos do metabolismo em recém-nascidos com distúrbios metabólicos e / ou manifestações neurológicas sem causa determinada. *Jornal de Medicina*. São Paulo; 2001; 119 (5):160-164.

Oliveira, CMB; Sakata,RK; Issy, AM; Gerola, LR,Salomão, R. Citocinas e Dor. *Rev Bras Anestesiol* 2011; 61(2): 255-265.

Okun JG, Hörster F, Farkas LM, Feyh P, Hinz A, Sauer S, Hoffmann GF, Unsicker K, Mayatepek E, Kölker S. Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. *J Biol Chem*. 2002; (277): 74-80.

Olsen RKJ, Cornelius N, Gregersen N, Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis*. 2015; 38 (4):3-19.

Owusu-Ansah E, Song W, Perrimon N. Muscle mitohormesis promotes longevity via systemic repression of insulin signaling. *Cell*. 2013; (155):699–712.

Painter Hj, Morrisey Jm, Mather Mw, Vaidya Ab. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2007; 446 (1): 88-91.

Palliser D, Levy M. Targeting Liposomes to Immune Cells. In: Santambrogio L. *Biomaterials in regenerative Medicine and the Immune System*, Cap. 11. Springer; 2015.

Pallotta I, Wrona EA; Sun B, Freytes DO. Role of Mesenchymal Stem Cells, Macrophages, and Biomaterials During Myocardial Repair. In: Santambrogio L. *Biomaterials in regenerative Medicine and the Immune System*, Cap. 10. Springer; 2015.

Palsson-McDermott EM, Palsson-McDermott EM¹, Doyle SL, McGettrick AF, Hardy M, Husebye H, Banahan K, Gong M, Golenbock D, Espevik T, O'Neill LA. TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat Immunol*. 2009; 10 (6): 79-86.

Paniz C, Grotto D, Schmitt GC, Valentini J, Schott KL, Pomblum JV, Garcia SC. Physiopathology of vitamin B12 deficiency and its laboratorial diagnosis. *Jornal Brasileiro de patologia*. Rio de Janeiro. 2005; 41 (5): 169-174.

Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009; (458):1191-1195.

Pela I, Gasperini S, Pasquini E, Donati MA. Hyperkalemia after acute metabolic decompensation in two children with vitamin B12-unresponsive methylmalonic acidemia and normal renal function. *Clin Nephrol*. 2006; 66 (1): 3-6.

Pei KJ, Rajikan RB, Hock NL, Jamil K. Growth and Nutritional Status of Children with Urea Cycle Defects (UCD): A 6-months Follow up Study in Institute of Pediatric, Hospital Kuala Lumpur. *International Journal of Clinical Nutrition*. 2014; (2): 41-52.

Pérez-López J. Terapia génica en el tratamiento de los errores congénitos del metabolismo. *Med Clin (Barc)*. 2014; 14 2(12):549-553

Pettenuzzo L, Ferreira Gda C, Schmidt AL, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M. Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complex activities in rat tissues. *Int J Devl Neuroscience*. 2006; 24 (1): 45-52.

Plaut GWE. Isocitrate dehydrogenase from bovine heart. In: Lowenstein JM. (eds). *Methods in Enzymology*. New York. 1969; 13 (87): 34-42.

Pollitt RJ, Green A, McCabe CJ, Booth A, Cooper NJ, Leonard JV, Nicholl J, Nicholson P, Tunaley JR, Viridi NK. Neonatal screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and outcome. *Health Technol Assess*. 1997; 1 (7):1-2.

Prada CE, Jasmi FAL, Kirk EP, Hopp M, Jones O, Leslie ND, Burrow, MD. Cardiac Disease in Methylmalonic Acidemia. *Jpeds*. 2011; 159 (5): 05-06.

Regoli F, Gorbi S, Frenzilli G, Nigro M, Corsi I, Focardi S, Winston GW. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar Environ Res*. 2002; 54 (3-5): 419-423.

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*. New York. 1994; (233):57-63.

Rezvani I. Defects in metabolism of amino acids. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF (eds). *Nelson Textbook of Pediatrics*. 18th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007. chap 85.

Ribas GS. Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. *Mutat Res*. 2010; 702 (1): 3-8.

Ribeiro LR, Della-Pace ID, Ferreira APO, Funck VR, Pinton S, Bobinski F, Oliveira CV, Fiorin FS, Duarte MMMF, Furian AF, Oliveira MS, Nogueira CW, Santos ARS, Royes LFR, Figuera MR. Chronic administration of methylmalonate on young rats alters neuroinflammatory markers and spatial memory. *Immunobiology*. 2013; (218): 1175- 1183.

Rich PR. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem. Soc. Trans.* 2003; 31 (6): 95-105.

Ripoche P, Bertrand O, Gane P, Birkenmeier C, Colin Y, Cartron JP. Human Rhesus-associated glycoprotein mediates facilitated transport of NH_3 into red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101 (49):17222-17227.

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

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rotiq A, Saudubray JM et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica Chimica Acta.* 1994; 228 (1): 35-51.

Saudubray JM, Berghe GVD, Walter JH. *Inborn Metabolic Diseases Diagnosis and Treatment.* ed 5. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York .2012.

Saudubray JM, Charpentier C. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver CR, Beaudet L, Sly WS, Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* Chapter. 1995; (5): 327-400.

Schafer FQ, Buettner GR. *Free Radical. Biol. Med.* 2001; (30):11-91.

Schaftingen EV, Cunha MV, Linster C. Enzyme complexity in intermediary metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2015; 38 (4): 7-21.

Schapira AH, Cooper JM, Morgan-Hughes JA, Landon DN, Clark JB. Mitochondrial myopathy with a defect of mitochondrial-protein transport. *N Engl J Med. London.* 1990; 323 (1):37-42.

Schenker S, McCandle DW, Brophy E, Lewis MS. Studies on intracerebral toxicity of ammonia. *J. Clin. Invest.* 1967; (48): 838–848.

Schmitt CP, Mehls O, Trefz FK, Weber TL, Kolker S. Reversible end-stage renal disease in an adolescent patient with methylmalonic aciduria. *Pediatric Nephrology*. 2004; 19 (10): 2-4.

Schuck PF, Leipnitz G, Ribeiro CA, Dalcin KB, Assis DR, Barschak AG, Pulrolnik V, Wannmacher CM, Wyse AT, Wajner M. Inhibition of creatine kinase activity in vitro by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. *Neurochem Res*. 2002; (12): 1633-1639.

Schuck PF, Januário SB, Simon KR, Scaini G, Mafioleti RL, Malgarin F, Pettenuzzo LF, Streck EL, Ferreira GC. Acute renal failure potentiates brain energy dysfunction elicited by methylmalonic acid. *Int J Dev Neurosci*. 2013; (4): 5-9.

Schwartz IV, Souza, C.F.M.; Giugliani, R. Tratamento de erros inatos do metabolismo. *Pediatr. (Rio J.) Porto Alegre*, Aug. 2008; 84 (4):8-19.

Scriver CR, Beaudet A, Sky W.S.; Valle, D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2001.

Seashore M. *The Organic Acidemias: An Overview*. Department of Genetics Yale University School of Medicine, New Haven, CT; 2009; 3 (1): 61-78.

Sharma AP. Hemolytic uremic syndrome (HUS) secondary to cobalamin C (cblC) disorder. *Pediatr Nephrol*, 2007; 22 (12): 7-10.

Sinclair LA. A New Look at the inborn errors of metabolism. *Ann Clin Biochem*. 1982; 19 (4):14-21.

Sokal EM. Treating inborn errors of liver metabolism with stem cells: current clinical development. *J Inher Metab Dis*. 2014; 37 (4): 5-9.

Sommer C, White F - Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F. *Pharmacology of Pain*. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010; 279-302.

Soto-Otero R, Méndez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras, A.; Sánchez-Sellero, I.; Cruz, L.A.; Lamas. M.L. Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals: potential

implications in relation to oxidative stress. *Life Sci. Compostela (SPAIN)*. 2001; 69 (8): 79-89.

Sousa RT, Vieira RM, Zarate Jr CA, Manji HK. Targeting mitochondrially mediated plasticity to develop improved therapeutics for bipolar disorder. *PMC*. 2015; 18 (10): 1131-1147.

Smith SE, Kinney HC, Swoboda KJ, Levy HL. Subacute combined degeneration of the spinal cord in cblC disorder despite treatment with B12. *Mol Genet Metab*. 2006; (88):138-145.

Spronsen VFJ, Smit, GPA, Erwich, JJHM. Inherited metabolic diseases and pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 2005; (112):2-11.

Srere PA. Citrate synthase. *Methods Enzymol*. 1969; (13):3-11.

Strauss E, Santos WR, Silva EC, Lacet, C.M.; Capacci. M.L.L.; Bernardini, P. Treatment of hepatic encephalopathy: a randomized clinical trial comparing a branched chain amino acid solution to oral neomycin. *Nutritional Support Services*. 1986; (6):18-21.

Summar M, Tuchman M. Proceedings of a consensus conference for the management of patients with urea cycle disorders. *J Pediatr*. 2001; (138): 6-10.

Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010; mar; 19; 140 (6): 5-20.

Tangney CC, Tang Y, Evans DA, Morris MC. Biochemical indicators of vitamin B12 and folate insufficiency and cognitive decline. *Neurology*. 2009; (72) :361–367.

Thoene JG. Treatment of urea cycle disorders. *J Pediatr*, 1999; (134):5-6.

Tomer KB, Mason RP, Barrett, JC. *Free Radical. Biol Med*. 2005; (38): 9-8.

Teixeira BC, Lopes AL, Macedo RCO, Correa CS, Ramis TR, Ribeiro JL, Oliveira AR. Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos Cardiovasculare. *J Vasc Bras*. 2014; (2): 108-115.

Ten Hove M, Lygate CA, Fischer A, Schneider JE, Sang AE, Hulbert K, et al. Reduced inotropic reserve and increased susceptibility to cardiac ischemia/reperfusion injury in phosphocreatine-deficient guanidinoacetate- N-methyltransferase-knockout mice. *Circulation*. 2005; (19): 77-85.

Tian R, Ingwall JS. The molecular energetics of the failing heart from animal models—small animal models. *Heart Failure Rev*. 1999; (4): 35-53.

Topf U, Wrobel L, Chacinska, A. Chatty Mitochondria: Keeping Balance in Cellular Protein Homeostasis. *Trends in Cell Biology*. 2016.

Touati G, Valayannopoulos V ; Mention K. ; De Lonlay, P. ; Jouvret, P. ; Depondt, E. Methylmalonic and propionic acidurias: management without or with a few supplements of specific amino acid mixture. *J Inherit Metab Dis*. 2006; (2-3); 88-98.

Tretter LE, Adam-Vizi V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci*. 2004; (36):1-8.

Trivedi SG, Lloyd CM. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64 (10):69-89.

Trujillo M, Folkes L, Bartesaghi S, Kalyanaraman B, Wardman P, Radi R. Peroxynitrite-derived carbonate and nitrogen dioxide radicals readily react with lipoic and dihydrolipoic acid Free Radical. *Biol Med*. 2005; (39):279-288.

Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochem. Biophys Acta*. 2004; 1660 (1-2): 171-179.

Tymoczko JL, Jeremy MB, Lubert S. *Bioquímica Fundamental*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.

Vasconcelos SML. *Avaliação Nutricional de Enfermos nas Diversas Etapas da Vida*. 2.ed. EDUFAL: Maceió; 2003.

Verma S, Devaraj S, Jialal I. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? C-reactive protein promotes atherothrombosis. *Circulation*. 2006; (113): 2135-2150.

Vernon HJ, Vernon HJ¹, Sperati CJ, King JD, Poretti A, Miller NR, Sloan JL, Cameron AM, Myers D, Venditti CP, Valle D. A detailed analysis of methylmalonic acid kinetics during hemodialysis and after combined liver/kidney transplantation in a patient with mut0 methylmalonic acidemia. *J Inher Metab Dis*. 2014; (6): 899-907.

Viegas CM, Zanatta Â, Grings M, Hickmann FH, Monteiro WO, Soares LE, Sitta Â, Leipnitz G, de Oliveira FH, Wajner M. Disruption of redox homeostasis and brain damage caused in vivo by methylmalonic acid and ammonia in cerebral cortex and striatum of developing rats. *Free Radic Res*. 2014; (6): 59-69.

Voet D, Voet J, Pratt C. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 2000.

Wajner M, Barschak AG, Luft A, Pires R, Grillo E, Lohr A, Funayama C, Sanseverino MT, Giugliani R, Vargas CR. Acidúrias Orgânicas: diagnóstico em pacientes de alto risco no Brasil. sociedade brasileira de pediatria. *J Bras Pediatr*. Rio de Janeiro, 2001; 77 (5): 401-406.

Wajner M, Dutra JC, Cardozo SE, Wannmacher CMD, Motta ER. Effect of methylmalonate on in vivo lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. *J. Inherit. Metab. Dis*. 1992; (15): 92-96.

Walter JH, Michalski A, Wilson WM, Leonard JV, Barratt TM, Dillon MJ. Chronic renal failure in methylmalonic acidemia. *Eur J Pediatr*. 1989; 148 (4): 4-8.

Vargas CR. Acidúrias Orgânicas: Diagnóstico e tratamento. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Revista AMRIGS*. 2001; 45 (2): 77-82.

Watchko JF, Tiribelli C. Bilirubin-Induced Neurologic Damage Mechanisms and Management Approaches. *N Engl J Med*. 2013; (369): 21-30.

Weisfeld-Adams, JD, Morrissey, MA, Kirmse, BM, Yu, C, Wasserstein, MP, Salveson, BR, McGuire, PJ, Cohen-Pfeffer, JL, Sunny, S, Caggana, M, Diaz, GA. Newborn screening and early biochemical follow-up in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type, and utility of methionine as a secondary screening analyte. Program for Inherited Metabolic Diseases, Department of Genetics & Genomic Sciences, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY 10029, USA. 2010; (99): 116-23.

Weisfeld-Adams JD, Bender HA, Miley-Åkerstedt A, Frempong T, Schragger NL, Patel K, Naidich TP, Stein V, Spat J, Towns S, Wasserstein MP, Peter I, Frank Y, Diaz GA. Neurologic and neurodevelopmental phenotypes in young children with early-treated combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cobalamin C type. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2013; (110): 241-247.

Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso FJ, Cutting GR. Cystic fibrosis. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2006; 21-88.

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

Yagi K. Simple Procedure for Specific Assay of Lipid Hydroperoxides in Serum or Plasma. *methods mol biol* 108:107-110. *Cell Mol Neurobiol*. 2011; (31):775-785.

Yannicelli S. Nutrition therapy of organic acidaemias with amino acid-based formulas: emphasis on methylmalonic and propionic acidaemia. *J Inherit Metab*. 2006; 29 (2-3): 1-7.

Zsengellér ZK, Aljinovic N, Teot LA, Korson M, Rodig N, Sloan JL, Venditti CP, Berry GT, Rosen S. Methylmalonic acidemia: a megamitochondrial disorder affecting the kidney. *Pediatr Nephrol*. 2014; 29 (11): 39-46.

ANEXO

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



*A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.
Protocolo: 058/2013*

Professor Responsável: Gustavo da Costa Ferreira.

Equipe: Patrícia Fernanda Schuck, Emilio Luiz Streck, Irany Achilles Denti, Márcia Baires de Castro, Luciane Taschetto, Hemilly Batista, Eliane Bernardo, Soliany Grassi Maravai, José Henrique Cararo Silva, Nádia Webber Dimer, Juliana Priscila Martins da Costa e Bruna Dalsasso Pizzato.

Título: "INFLUÊNCIA DA HIPERAMONEMIA SOBRE A TOXICIDADE DO ÁCIDO METILMALÔNICO EM CEREBRO E RIM DE RATOS JOVENS".

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada a CEUA. Foi autorizada a utilização 408 Ratos Wistar no total:

Espécie	Idade	Peso	Qtd	F+M
Wistar	7	15 g	102	102
Wistar	15	50 g	102	102
Wistar	30	100 g	102	102
Wistar	60	250 g	102	102

Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analysed the following Project:

Protocol number: 058/2013

Principal Investigator: Gustavo da Costa Ferreira.

Researchers: Patrícia Fernanda Schuck, Emilio Luiz Streck, Irany Achilles Denti, Márcia Baires de Castro, Luciane Taschetto, Hemilly Batista, Eliane Bernardo, Soliany Grassi Maravai, José Henrique Cararo Silva, Nádia Webber Dimer, Juliana Priscila Martins da Costa e Bruna Dalsasso Pizzato.

Project title: "INFLUENCE OF HYPERAMONEMIA ON THE TOXICITY OF METHYLMALONIC ACID IN BRAIN AND KIDNEY OF YOUNG RATS".

The project was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyze. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 09 de julho de 2013.

Patricia Fernanda Schuck

Patrícia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA