

ALTERAÇÕES DA FUNÇÃO HEPÁTICA E RENAL DETERMINADAS PELA HIPERAMONEMIA E O ÁCIDO METILMALÔNICO EM RATOS

Changes in hepatic and kidney function determined by hyperamonemia and methylmalonic acid in rats

Silvane Souza Roman¹; Luiz Carlos Cichota²; Irany Achilles Denti³

¹ Doutora em Ciências Biológicas pela UFSM-RS.

² Doutor em Ciências Farmacêuticas pela UFSM-RS.

³ Doutor em Ciências da Saúde pela UNIESC-SC. *E-mail*: iranyd@uricer.edu.br

Data do recebimento: 16/11/2022 - Data do aceite: 24/02/2023

RESUMO: O objetivo geral do estudo foi avaliar o efeito do ácido metilmalônico (MMA) isolado ou em associação com acetato de amônio (AA) sobre alguns parâmetros da função hepática e renal em ratos. Para este estudo foram utilizados 120 ratos Wistar machos com 7, 15, 30 e 60 dias de vida, divididos em 4 grupos: controle (salina), (MMA), (AA) e (MMA+AA). Os animais do grupo controle receberam salina e os grupos tratados receberam MMA (1,76 μ mol/g. s.c), AA, (2,65 μ mol/g, i.p) ou MMA+AA associados nas mesmas concentrações por cinco dias. Os principais resultados, para o grupo de animais com 7 dias, mostraram alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$), para a taxa de creatinina e ($p < 0,01$) para as taxas de filtração glomerular (TFG). Para o grupo de animais com 30 dias mostrou significância estatística ($p < 0,001$) para a taxa de creatinina e ($p < 0,01$) para a TFG. Quanto ao grupo de animais com 60 dias de vida, as principais alterações foram nas taxas de ureia e aspartato aminotransferase ($p < 0,01$), alanina aminotransferase e TFG ($p < 0,001$). A Análise histológica do tecido renal mostrou túbulos dilatados, vacuolização nos túbulos proximais e distais, desestruturação celular, alteração do epitélio e retração glomerular. No tecido hepático evidenciaram-se eosinofilia, vacuolizações, tumefação acentuada e focos inflamatórios.

Palavras-chave: Erros inatos do metabolismo. Metabolismo. Ratos

ABSTRACT: The general aim of this study was to evaluate the effect of methylmalonic acid (MMA) alone or in association with ammonium acetate (AA) according to some hepatic and renal function parameters in rats. 120 male Wistar rats age 7, 15, 30 and 60 days old were used, they were divided into four groups: control (saline), (MMA), (AA) and MMA+AA. The animals in the control group received saline and the treated groups received MMA (1.76 μ mol/g.s.c), AA, (2.65 μ mol/g.i.p) or MMA+AA associated under the same concentrations for five days. The main results, the 7-day-old group, showed statistically significant changes ($p < 0.05$), regarding the creatinine rate and ($p < 0.01$) the glomerular filtration rates (GFR). The 30-day-old group showed statistical significance ($p < 0.001$) for the creatinine rate and ($p < 0.01$) for the GFR. Regarding the 60-day-old group, the main changes were in the rates of urea and aspartate aminotransferase ($p < 0.01$), alanine aminotransferase and GFR ($p < 0.001$). Renal tissue histological analysis showed dilated tubules, vacuolization in the proximal and distal tubules, cellular disruption, epithelium alteration and glomerular retraction. Eosinophilia, vacuolization, marked swelling and inflammatory foci were observed in the hepatic tissue.

Keywords: Inborn errors of metabolism. Metabolism. Rats

Introdução

Erros inatos do metabolismo (EIM) são classificadas como alterações, disfunções ou distúrbios pouco diagnosticados através de testes bioquímicos convencionais, geralmente determinados por padrões de herança autossômica recessiva, cujas manifestações clínicas são heterogêneas (SAUDUBRAY et al., 2012). EIM constituem um grupo de mais de 1.500 distúrbios produzidos por mutações em genes que codificam proteínas que participam de vias metabólicas (LEAL et al., 2023). *A acidemia metilmalônica* (MMA) é caracterizada por um grupo de distúrbios autossômicos recessivos que afetam as vias catabólicas da isoleucina, valina, metionina, treonina, timina, ácidos graxos de cadeia ímpar e colesterol; determinam acúmulo de metilmalonil-CoA e ácido metilmalônico nos fluidos corporais (ZWICKLER et al., 2012).

Quando se manifestam na forma de doenças, configuram-se com resultado da ausência ou deficiência de uma enzima ou coenzima que impede ou dificulta a rota metabólica, ocasionando excedente de produtos potencialmente tóxicos ou deficiência de produtos essenciais ao metabolismo (OLIVEIRA et al., 2001). De modo geral, quando o distúrbio se manifesta, observa-se interferência em processos metabólicos, principalmente nas etapas de síntese, degradação, transporte ou armazenamento de diversas biomoléculas orgânicas (SCRIVER et al., 2001). A MMA é um EIM com padrão de herança autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima metilmalonil-CoA mutase ou da síntese da coenzima adenosilcobalamina (cblC) (GRADINGER et al., 2007), apresentando incidência de, aproximadamente, 1:50.000 nascidos vivos (SCRIVER et al., 2001).

Estudos atualizados Almási et al (2019), em triagem neonatal, apurou estimativas pontuais das taxas de detecção de MMA

(0,79; 1,12; 1,22 e 6,04) por 100.000 recém-nascidos, nas regiões da Ásia, Europa, América do norte, Oriente Médio e norte da África, respectivamente.

A deficiência pode se manifestar na forma mut (o), ou seja, quando a enzima não tem atividade e não responde à terapia com vitamina B₁₂, e mut (-), quando a enzima possui alguma atividade residual e é responsiva à administração de vitamina B₁₂ (PANIZ et al., 2005). O resultando desta deficiência, nas vias catabólicas de diversos compostos, inclui aminoácidos de cadeia ramificada e ácidos graxos de cadeia ímpar e na consequente elevação dos níveis séricos do ácido metilmalônico acima de 1 micromol/L (FENTON et al., 2001). Nestas circunstâncias, ocorre, também, aumento das concentrações de outros metabólitos nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes (LEONARD, 2000; DEODATO et al., 2006).

Visto que esses distúrbios apresentam características genéticas, as mutações nos genes MMAA 4q31.21, MMAB 12q24 ou MMADHC 2q23.2, determinam alterações no metabolismo de diversos aminoácidos, incluindo valina, isoleucina, metionina e treonina, bem como de ácidos graxos e colesterol, resultando também em aumento das concentrações MMA (CHANDLER, 2013; FOWLER et al., 2008; BAUMGARTNER et al., 2014; HUEMER et al., 2014; OLSEN et al., 2015). Outros achados bioquímicos frequentemente observados em pacientes portadores deste distúrbio são acidose metabólica e hiperamonemia após o nascimento. Em pacientes diagnosticados tardiamente, o quadro pode se manifestar com sinais e sintomas heterogêneos, com comprometimento acentuado da função neurológica (NIZON et al., 2013).

Neste contexto, o objetivo geral foi avaliar o efeito do ácido metilmalônico sobre parâmetros da função hepática e renal de ratos Wistar, na ausência ou presença de hi-

peramonemia. Para elucidar o objetivo geral, estabeleceu-se como objetivos específicos determinar as taxas séricas de ureia, creatinina, estimativa da taxa de filtração glomerular, além das taxas de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) de ratos Wistar, bem como descrever as alterações histológicas do tecido hepático e renal.

O presente estudo foi realizado seguindo as recomendações internacionais para a utilização de animais de laboratório e recomendações para o uso de animais, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O experimento foi previamente aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob Protocolo nº 058-2013, acolhido pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões.

Foram utilizados 120 *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, machos, pesando entre 15 a 200g, distribuídos em grupos com 7, 15, 30 e 60 dias de vida. Os animais foram obtidos no biotério da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Estes foram acondicionados em gaiolas, em grupos de três animais, mantidos com iluminação e temperatura controladas, ciclo claro-escuro de 12 horas (07 às 19 horas, ciclo claro), temperatura de 23±1°C, sem privação de água e alimento. Para menor desconforto ambiental, a higiene das gaiolas foi realizada semanalmente.

Para o estudo *in vivo*, os animais foram divididos, respectivamente, por idades, em 4 grupos: controle (salina intra peritoneal [i.p.]); acetato de amônio (2,5 µmol/g. i.p.); MMA (1,67 µmol/g sub cutâneo [s.c.]); MMA+AA associados nas mesmas concentrações, submetidos a um tratamento uma vez ao dia, durante cinco dias. No quinto dia, foram administradas três doses de MMA nas mesmas concentrações, via administração, para todos os animais, em intervalos de

noventa minutos entre as administrações. O grupo controle foi submetido às mesmas condições experimentais, porém, foi administrada solução salina 0,9%. Decorridos sessenta minutos da última administração, foi efetuada eutanásia, conforme protocolo aprovado pela CEUA, a fim de investigar os efeitos sobre parâmetros do metabolismo hepático através das taxas de enzimas (AST e ALT) e da função renal apresentados pelas taxas de ureia e creatinina, além das taxas de filtração glomerular. Adicionalmente, foram efetuadas análises histológicas dos tecidos renal e hepático. A análise histológica foi realizada utilizando-se o método de eosina e hematoxilina. As análises bioquímicas foram efetuadas com Kits comerciais Labtest®.

Os resultados estão dispostos através de média e erro padrão e, para análise de variância foi utilizado anova de uma via (One ANOVA) seguido do teste *post hoc de Tukey* de múltiplas comparações. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Inicialmente, serão apresentados dados quantitativos para o grupo específico e, ao final, alguns achados qualitativos referentes ao estudo histológico dos tecidos renal e hepático. Os dados inseridos abaixo referem-se à administração de salina, MMA,

AA, MMA+AA associados, nas mesmas concentrações descritas na metodologia, com administrações diárias durante cinco dias, onde buscou-se avaliar a influência destes metabólitos sobre alguns parâmetros da função hepática e renal, determinados por testes bioquímicos, além das alterações evidenciadas pelo estudo histológico. Os resultados serão apresentados, inicialmente, através da média e desvio padrão (\pm) e, subsequentemente, sua significância estatística (quando for pertinente).

Resumidamente, os testes de função renal do grupo de animais com sete dias, quanto a taxa de ureia, assim como nas taxas de AST e ALT expostos na figura 1, não mostraram significância estatística quando comparada ao grupo controle. Contudo, os resultados mostraram significância estatística ($p < 0,05$) para a taxa de creatinina para o grupo MMA+AA; ($p < 0,01$) para a taxa de filtração glomerular para os grupos MMA, AA e MMA+AA.

Em relação às alterações histológicas do tecido renal para o grupo de animais com sete dias de vida, não evidenciadas no grupo controle, para os grupos MMA, AA e MMA+AA observa-se retração glomerular, túbulos distais dilatados e desestruturação celular além de vacuolizações citoplasmáticas dos túbulos proximais e distais. No tecido hepático, para os grupos MMA+AA, evidenciou-se eosinofilia, vacuolizações e tumefação acentuada. Eosinofilia, vacuolizações e tumefação celular moderada, para o grupo AA.

Tabela I - Níveis de ureia, creatinina, AST, ALT, TFG, para o grupo de animais com sete dias

Grupos	Ureia	Creatinina	AST	ALT	TFG.
Salina	56,6 \pm 12,83	0,14 \pm 0,02	35,6 \pm 11,08	203,14 \pm 44,12	1347,01 \pm 400,7
MMA	70 \pm 9,11	0,26 \pm 0,08	35,12 \pm 4,08	213,4 \pm 22,39	547,06 \pm 217,28
AA	60 \pm 5,80	0,24 \pm 0,05	48 \pm 14,07	283 \pm 107,55	579,15 \pm 214,33
MMA+AA	60,4 \pm 9,44	0,29 \pm 0,12	38 \pm 7,81	241,8 \pm 55,75	533,12 \pm 215,49

Dados expressos em média \pm erro padrão para 30 animais por grupo.

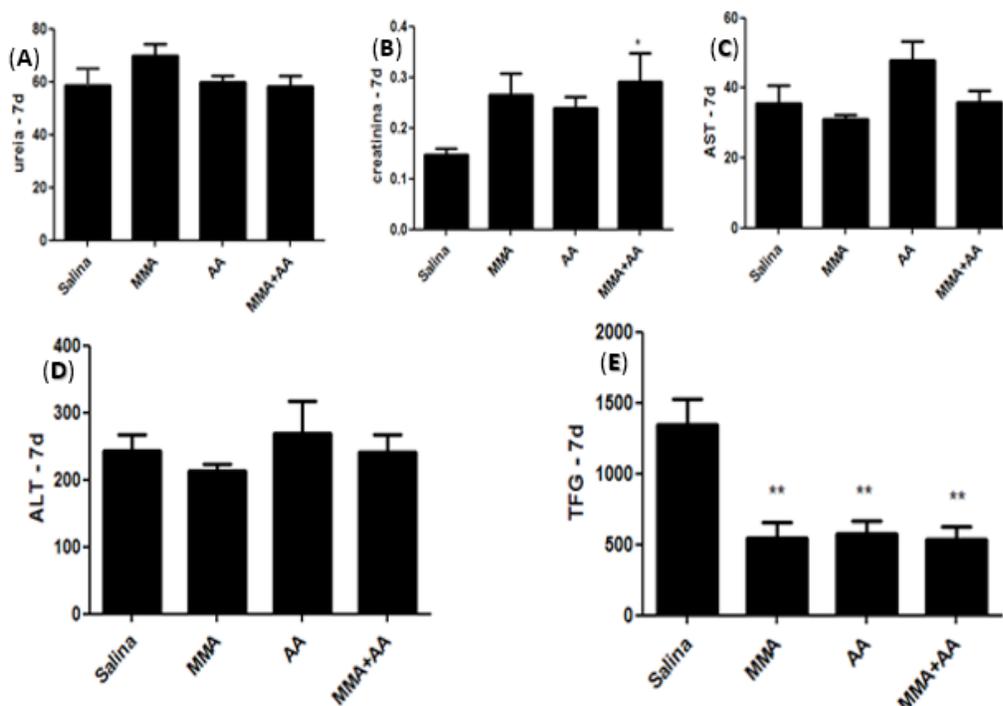
Figura 1 - efeito da administração de salina, MMA (1,67 $\mu\text{mol/g}$ s.c.) e AA (2,5 $\mu\text{mol/g}$ i.p.), sobre parâmetros da função renal e hepática

Figura 1 - efeito da administração de MMA (1,67 $\mu\text{mol/g}$ s.c.) e AA (2,5 $\mu\text{mol/g}$ i.p.), sobre a atividade de alguns parâmetros da função renal medida pela taxa de ureia (A), creatinina (B) e taxa de filtração glomerular (E). A função hepática foi estimada através da atividade das enzimas AST (C) e ALT (D), na presença ou ausência de AA (2,5 $\mu\text{mol/g}$ i.p.), para um grupo de animais com sete dias de vida. A significância estatística foi definida anova de uma via (One ANOVA), seguida do teste *post hoc* de Tukey de múltiplas comparações * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle.

Tabela II - Níveis de ureia, creatinina – AST, ALT, TFG – para o grupo de animais com quinze dias

Grupos	Ureia	Creatinina	AST	ALT	TFG.
Salina	45,2±4,86	0,19±0,05	63,87±10,06	287,65±175,41	491,65±325,7
MMA	50±5,95	0,24±0,03	74,18±14,01	383,88±95,22	430,63±76,04
AA	59,2±8,16	0,28±0,05	81,66±18,57	430,66±88,31	329,53±106,57
MMA+AA	67±14,96	0,32±0,04	74,5±10,63	399,25±73,36	276,92±92,23

Dados expressos em média \pm erro padrão para 30 animais por grupo.

Os testes de função renal, do grupo de animais com quinze dias, quanto à taxa de ureia, creatinina, AST, ALT e à taxa de filtração glomerular, expostos na figura 2, não mostraram significância estatística quando comparados ao grupo controle, muito embora

as taxas de ALT tenham sido discretamente elevadas em todos os grupos quando comparadas ao controle. As mesmas afirmações podem ser auferidas na redução da taxa de filtração glomerular, para os grupos AA e MMA+AA.

Figura 2 - efeito de MMA (1,67 µmol/g s.c.) e AA (2,5 µmol/g. i.p.), sobre a atividade da função renal e hepática

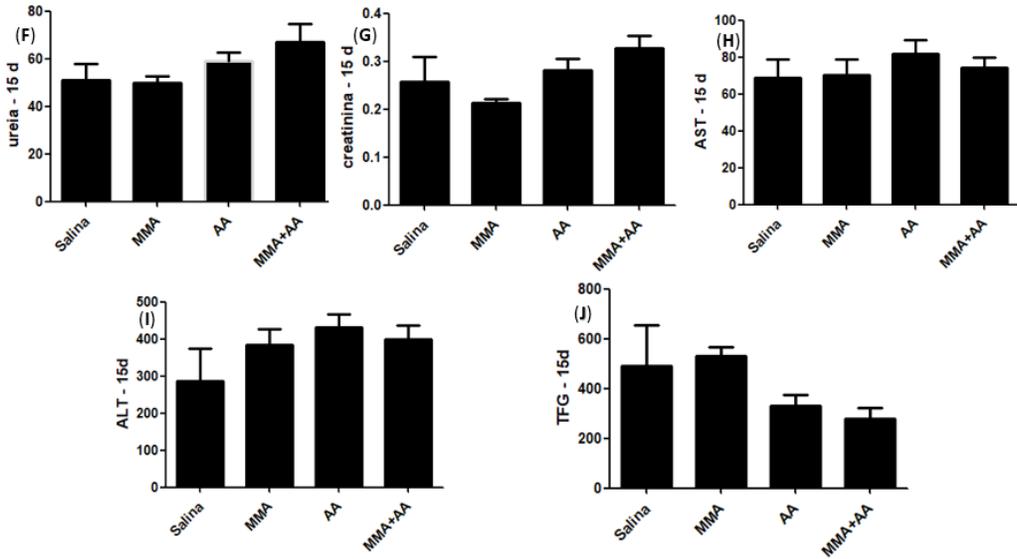


Figura 2 - efeito de MMA (1,67 µmol/g s.c.) e AA (2,5 µmol/g. i.p.), sobre a atividade da função renal medida pela taxa de ureia (F), creatinina (G) e taxa de filtração glomerular (J). A função hepática foi estimada através das taxas das enzimas AST (H) e ALT (I), na presença ou ausência de AA (2,5 µmol/g. i.p.), para um grupo de vinte e oito animais com quinze dias de vida. A significância estatística foi definida anova de uma via (One ANOVA) seguido do teste *post hoc* de Tukey de múltiplas comparações *p<0,05; **p<0,01, comparado ao grupo controle.

Tabela III - Níveis de ureia, creatinina, AST, ALT, TFG para o grupo de animais com trinta dias

Grupos	Ureia	Creatinina	AST	ALT	TFG.
Salina	48,8±5,21	0,17±0,02	259±10,81	64,6±2,6	584,25±13
MMA	42,8±6,61	0,32±0,01	269±59,70	68,36±15	253,2±82
AA	44,2±10	0,38±0,13	257,86±60	65,2±7,6	292,82±15
MMA+AA	48,6±11	0,51±0,11	344,6±57	70,2±13	189±86

Dados expressos em média ± erro padrão para 30 animais por grupo.

Em relação à análise histológica do tecido renal, para o grupo de animais com quinze dias de vida, não evidenciadas no grupo controle, o grupo MMA mostrou desestruturação celular, vacuolizações citoplasmáticas nos túbulos proximais e retração glomerular. No tecido hepático para o grupo MMA, evidenciaram-se vacuolizações e tumefação celular. Grupo AA e MMA+AA apresentou

eosinofilia, vacuolizações e tumefação acentuada. Em todos se observam cordões de hepatócitos, veia centrolobular e capilares sinusoidais.

Na figura 3 estão expostos os achados para o grupo de animais com trinta dias de vida. Quanto às taxas de ureia, não mostrou significância estatística comparada ao grupo controle. No entanto, os resultados das

Figura 3 - Efeito de MMA (1,67 µmol/g s.c.) e AA (2,5 µmol/g. i.p.) sobre a atividade da função renal e hepática

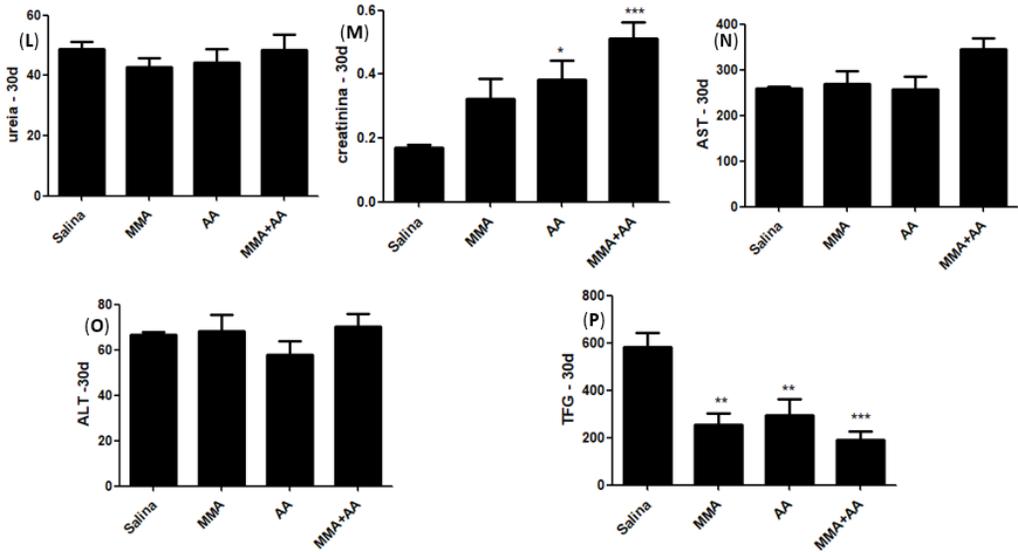


Figura 3 - mostra o efeito de MMA (1,67 µmol/g s.c.) e AA (2,5 µmol/g. i.p.) sobre a atividade da função renal medida pela taxa de ureia (L), creatinina (M) e taxa de filtração glomerular (P), além da função hepática determinada através das taxas das enzimas AST (N) e ALT (O), na presença ou ausência de AA (2,5 µmol/g. i.p.), para oito animais por grupo, com trinta dias de vida. A significância estatística foi definida anova de uma via (One ANOVA), seguido do teste *post hoc* de Tukey de múltiplas comparações *p<0,05, **p<0,01; ***p<0,001, comparado ao grupo controle.

taxas de creatinina mostram que há aumento com significância estatística ($p<0,05$) para AA e ($p<0,001$) para o grupo que recebeu MMA+AA combinados, quando comparados com o grupo controle. Muito embora não tenha apresentado significância estatística, o grupo MMA também mostra creatinina sérica aumentada quando comparada ao grupo controle. As enzimas AST e ALT não mostraram alterações consideradas estatisticamente significativas. A estimativa da taxa

de filtração glomerular mostrou significância estatística $p<0,05$ para MMA e AA; $p<0,001$, para o grupo MMA+AA, comparada ao grupo controle.

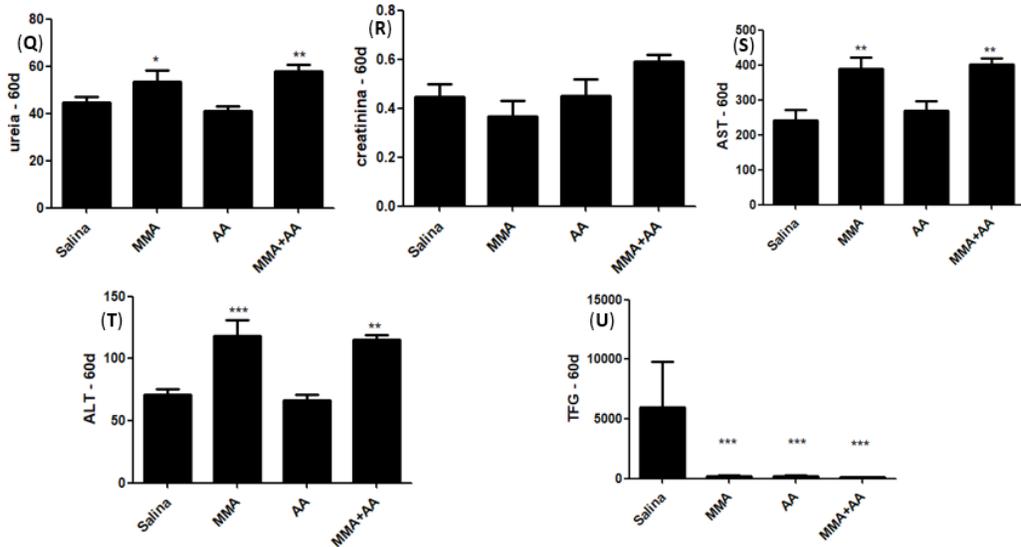
A análise histológica de segmento de rim de ratos com trinta dias de vida, não evidenciadas no grupo controle, no grupo mostra células dos túbulos proximais alargados e discreta alteração da morfologia do glomérulo, aumento do espaço de Bowman. O grupo AA mostra dilatação tubular. Grupo MMA+AA

Tabela IV - Níveis de ureia, creatinina, AST, ALT, TFG, para o grupo de animais com sessenta dias

Grupos	Ureia	Creatinina	AST	ALT	TFG.
Salina	42,8±3,7	0,43±0,05	234,76±67,43	67,7±12,5	5998,56±965
MMA	53,4±10,6	0,38±0,05	388,2±77,35	118±28,9	225±138,62
AA	42,8±3,11	0,45±0,14	291,7±50,61	69,92±7,08	214,55±78,29
MMA+AA	57,8±6,01	0,59±0,06	401,34±39,29	115,2±8,28	131,1±24,71

Dados expressos em média ± erro padrão para 30 animais por grupo.

Figura 4 - efeito de MMA (1,67 $\mu\text{mol/g}$ s.c.) e AA (2,5 $\mu\text{mol/g}$ i.p.) sobre a atividade da função renal e hepática



A figura 4 - mostra o efeito de MMA (1,67 $\mu\text{mol/g}$ s.c.) e AA (2,5 $\mu\text{mol/g}$ i.p.) sobre a atividade da função renal medida pela taxa de ureia (Q), creatinina (R) e TFG (U). A função hepática foi determinada através das taxas das enzimas AST (S) e ALT (T), na presença ou ausência de AA (2,5 $\mu\text{mol/g}$ i.p.), para oito animais por grupo, com sessenta dias de vida. A significância estatística foi definida anova de uma via (One ANOVA), seguido do teste *post hoc* de Tukey de múltiplas comparações * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle.

combinados mostram retrações glomerulares e desintegração da sua arquitetura, aumento do espaço de Bowman e tumefação tubular. No tecido hepático os principais achados foram eosinofilia, vacuolizações e tumefação acentuada para os grupos MMA e MMA+AA. Em todos se observam cordões de hepatócitos.

Os testes de função renal, expostos na figura IV, para o grupo de animais com sessenta dias em relação à taxa de ureia, mostraram aumento estatisticamente significativo para o grupo MMA ($p < 0,05$) e ($p < 0,01$) para o grupo MMA+AA, quando comparados ao grupo controle. No entanto, a taxa de creatinina não mostrou significância estatística, comparada ao grupo controle. Quanto às provas de função hepática, a enzima (AST) para os grupos MMA e MMA+AA mostrou significância estatística ($p < 0,01$); ALT também mostrou significância estatística ($p < 0,001$); ($p < 0,01$) para o grupo MMA+AA combinados. A

estimativa da taxa de filtração glomerular mostrou significância estatística ($p < 0,001$) para os grupos MMA, AA e MMA+AA.

As principais alterações no tecido renal, verificadas com o estudo histológico para o grupo MMA, no grupo de animais com sessenta dias e não encontradas no grupo controle, foram tumefação glomerular, desestruturação, dilatação dos túbulos e ausência de núcleos em algumas áreas dos túbulos proximais. Grupo AA apresentou congestão vascular, tumefação tubular, presença de neutrófilos e redução do espaço de filtração glomerular. Grupo MMA+AA apresentou alterações das estruturas dos túbulos proximais e distais e redução do espaço de filtração, além de estruturas corticais desestruturadas e dilatação tubular. No tecido hepático, para o mesmo grupo de animais idade e condições de tratamento, o Grupo MMA apresentou congestão das estruturas da veia centro lobular e no tecido intersticial, além de tumefação

hepatocítica com focos inflamatórios dificultando a visualização dos capilares sinusóides. Grupo AA e MMA+AA mostrou eosinofilia, vacuolizações e tumefação acentuada. Em todos se observa cordões de hepatócitos, veia centrolobular e capilares sinusoidais.

Discussão

Inicialmente, foi possível mostrar que o MMA, isoladamente ou associado a AA nas concentrações definidas na metodologia, alterou a atividade da função renal para animais com sete, trinta e sessenta dias de vida, mostrados através das taxas de creatinina e TFG. Estes dados são compatíveis com os achados de Humer et al (2014) quando descrevem a ocorrência de síndrome urêmica em aproximadamente 50% dos casos de pessoas acometidas pelo distúrbio da função da enzima metilmalonil-CoA mutase ou da síntese da coenzima adenosilcobalamina (cblC). Segundo Manoli (2013), a acidemia metilmalônica, além de outras complicações devidas ao sistema nervoso e distúrbios metabólicos, apresenta como complicações secundárias nefrite túbulo intersticial e doença renal progressiva. No estudo atual, os achados histológicos mostraram alterações das estruturas dos túbulos proximais e distais e redução do espaço de filtração, desestruturação cortical e tubular, possivelmente justificando as alterações bioquímicas. Fischer et al. (2014) descrevem que a recuperação da função renal é pouco significativa quando a sintomatologia não oferecer 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, principalmente, com perda da função excretora renal (BOUITS et al., 2010). Brassier et al. (2013) referem que a função renal nem sempre é recuperada após transplante em pa-

cientes com MMA e que nestes foi observada fibrose intersticial, atrofia tubular mantendo a toxicidade sistêmica para alguns pacientes no pós-operatório expressos dos níveis de creatinina sérica.

Manolli et al. (2016) destacam que pacientes portadores do cofator adenosilcobalamina podem receber alimentos isentos de metionina e com alto teor de leucina, formulados para pacientes com defeitos oxidativos isolados do propionato.

Para pacientes com síndrome urêmica, Brassier et al. (2020) relatam melhora dos resultados metabólicos e de qualidade de vida após transplante renal e hepático. Kiykim et al. (2021) descrevem que pacientes com episódios agudos e recorrentes de hiperamonemia podem ser tratados eficazmente com N-carbamilglutamato. No entanto, citam que o efeito, assim como a eficácia a longo prazo do medicamento, é pouco conhecido.

Disfunção tubular renal com progressão para nefrite tubulointersticial crônica foi observada na final doença renal. Esta característica é manifestação comum na MMA além de pancreatite, acidente vascular cerebral, atrofia do nervo óptico, disfunção imune e especialmente a doença renal (MANOLI et al., 2013). A mesma fonte descreve ainda que a perda da massa muscular observada nos pacientes com MMA pode ser estimada através de marcadores laboratoriais de rotina, como a creatinina, conferindo status de preditor do início e da evolução doença renal.

Possivelmente, justificando as dificuldades para o diagnóstico e tratamento, Schafingen et al. (2015) citam algumas peculiaridades da função enzimática, descrevendo que algumas enzimas catalisam apenas uma reação fisiológica e outras catalisam diferentes atividades em uma única cadeia polipeptídica. Beld et al (2015) descrevem que a catalisação de ácidos graxos compreende sete diferentes atividades enzimáticas no metabo-

lismo do acetil-CoA redutase para malonil-CoA e NADPH e estas funções poderiam justificar as dificuldades para o diagnóstico e subsequente tratamento da sintomatologia.

Muito embora não tenhamos encontrado dados homogêneos entre os grupos, foi possível demonstrar alterações estatisticamente significativas na atividade das enzimas AST e ALT, em animais com 60 dias de vida, para os grupos MMA e MMA+AA, associados a alterações da histologia hepática, vindo de encontro ao estudo conduzido por Melo et al (2012), onde os autores citam que o MMA não alterou a função da AST. Provavelmente as alterações encontradas no estudo atual sejam compatíveis em portadores crônicos de MMA, em que o efeito quantitativo e cumulativo determinam alterações hepáticas mais contundentes. Pei et al. (2015) demonstraram que em crianças com defeito no ciclo de ureia, em acompanhamento clínico não houve diferenças significativas no crescimento e desenvolvimento. Contudo, no estudo citado acima, foi possível observar desnutrição, microcefalia, além de deficiência intelectual, em humanos. Adicionalmente, neste estudo, indicadores bioquímicos como citrulina, albumina e proteínas totais não mostraram significância estatística.

Demonstrando a heterogeneidade, quanto aos achados bioquímicos, alterações das taxas das enzimas hepáticas AST e ALT foram descritas por Chu et al. (2019) em estudo de triagem de recém-nascidos com acidemia metilmalônica, além de elevadas taxas de amônia (NH₃). Por outro lado, a heterogeneidade também se manifesta através de déficits neuropsicológicos definidos por déficits de linguagem e motricidade voluntária em alguns participantes, acentuadamente na expressão verbal e de inteligência para Adultos (CHAPMAN et al., 2022).

Outras manifestações clínicas foram apresentadas por Forny et al. (2019), em que descreverem a ocorrência de neoplasia hepática

maligna em cinco pacientes com acidemia metilmalônica grave e precoce. Atribuem o desenvolvimento dos efeitos oncometabólicos à disfunção mitocondrial, comprometimento do ciclo do ácido tricarbóxico e ao estresse oxidativo. Estes achados mostram a heterogeneidade da sintomatologia, das manifestações clínicas, bem como das alterações objetivas determinadas por marcadores bioquímicos, entre outros fatores.

Chanprasert e Scaglia (2015) encontraram insuficiência hepática aguda. Em decorrência desta complicação houve comprometimento da função encefálica pelo aumento da amônia e inflamação crônica deste órgão. Veigas et al. (2014), em análise histológica de tecido cerebral após administração intracerebroventricular com MMA, encontraram vacuolizações, edema pericelular, isquemia, alterações do estado redox e anormalidades morfológicas do tecido cerebral em ratos. Algumas das alterações citadas acima são similares às encontradas na análise histológica do tecido renal, contidas nos resultados do estudo atual, onde se verificaram vacúolos, desestruturação celular com desintegração da sua estrutura, alteração do epitélio, retração glomerular, tumefação e edema também foram encontrados no tecido hepático.

Sokal et al. (2014) descrevem alterações na estrutura do parênquima hepático compatíveis com fibrose e hepatopatia crônica, além de alterações metabólicas, processo inflamatório crônico, necessitando de transplante hepático para a correção parcial da sintomatologia e do curso da doença, havendo similaridade, em alguns aspectos, com os achados do estudo atual, caracterizado por processo inflamatório. Para Ahrens-Nicklas et al. (2015) a sintomatologia heterogênea apresenta desafios para o diagnóstico e tratamento. Contudo, na adolescência, comumente, são encontrados episódicos de alterações do estado mental, perda da consciência, encefalopatia, falência de múltiplos órgãos,

colapso circulatório, queixas de cefaleia, dores abdominais, vômitos, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e da aprendizagem. O distúrbio no metabolismo glicêmico mais comum é a hipoglicemia e hiperglicemia como achado eventual (IMEN et al., 2012).

Complicações devidas ao comprometimento da função renal e hepática, como acidose metabólica e hiperamonemia, foram descritas por Leonard (2000), Als-Nielsen et al (2004), Seashore et al. (2009) e Vernon et al. (2014), além de outros sintomas pouco específicos que podem ter correlação com a disfunção renal e hepática como encefalopatia, coma e cardiomiopatia mostrando intervalo Q-T prolongado, em seres humanos (GRÜNERT et al., 2012; IMEN et al., 2012). Teixeira et al. (2014) efetuaram correlações entre processos inflamatórios e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares referindo que, em condições inflamatórias crônicas, a expressão limitada da enzima óxido nítrico sintase endotelial impõe redução na secreção de óxido nítrico pelo endotélio vascular, estimulando moléculas de adesão e aumento do risco de complicações vasculares pela formação de trombos. Jafari et al. (2013)

descrevem aumento do apoptose celular quando há hiperamonemia, indicando que este metabólito tem potencial para impor sofrimento ou morte celular. Contudo, os mesmos autores citam que este excreta pode não ser detectado no plasma e na urina e desta forma dificultar o diagnóstico podendo ser considerado importante para a patogênese na MMA.

Conclusões

Os resultados do estudo não seguiram padrões homogêneos, possivelmente em consequência das diferentes idades dos animais com que foram realizados os estudos. Quanto aos efeitos determinados pelos metabólitos, o MMA, isoladamente ou em associação com AA, ocasionou alterações marcadamente acentuadas sobre alguns parâmetros da função hepática e renal. Os dados apontam que a administração crônica do MMA ou associado ao AA foi suficiente para induzir, em um grupo, alterações nas enzimas AST e ALT, além de alterações da função renal visualizada através das taxas de ureia, creatinina e taxa de filtração glomerular.

REFERÊNCIAS

- AHRENS-NICKLAS, R.C.; SLAP, G.; FICICIOGLU, C. Adolescent Presentations of Inborn Errors of Metabolism. **Journal of Adolescent Health**, v. 56, p. 477-482, 2015.
- ALS-NELSEN, B.; GLUUD, L.L.; GLUUD, C. Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. **Bmj.**, v. 328, p.7447-1046, 2004.
- ALMÁSI, T.; GUEY, L.T.; LUKACS, C.; CSETNEKI, K.; VOKÓ, Z.; ZELEI, T. Systematic literature review and meta-analysis on the epidemiology of methylmalonic acidemia (MMA) with a focus on MMA caused by methylmalonyl-CoA mutase (mut) deficiency. **Orphanet J Rare Dis.**, v.14, n.1, p. 84, 2019.
- BAUMGARTNER, M.R.; HÖRSTER, F.; DIONISI-VICI, C.; HALILOGLU, G.; KARALL, D.; CHAPMAN, K.A.; HUEMER, M.; HOCHULI, M.; ASSOUN, M.; BALLHAUSEN, D.; BURLINA, A.; FOWLER, B.; GRÜNERT, S,C.; GRÜNEWALD, S.; HONZIK, T.; MERINERO,

- B.; PÉREZ-CERDÁ, C.; SCHOLL-BÜRGI, S.; SKOVBY, F.; WIJBURG, F.; MACDONALD, A.; MARTINELLI, D.; SASS, J.O.; VALAYANNOPOULOS, V.; CHAKRAPANI, A. Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia. **Orphanet J of Rare Diseases**, v. 2, p. 9-130, 2014.
- BELD, J.; LEE, D.J.; BURKART, M.D. Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering. **Mol Bio Syst.**, v.11, p.38-59, 2015.
- BOUITS, A.H.; ROOFTHOFT, M.T.R.; GAJJA, S.; SALOMONS, G.S.; DAVIN, J.C. CD-46 associated atypical hemolytic uremic syndrome with uncommon course caused by *cbfC* deficiency. **Pediatr Nephrol.**, v. 25, n. 12, p. 2547-2548, 2010.
- BRASSIER, A.; BOYER, O.; VALAYANNOPOULOS, V.; OTTOLENGHI, C.; KRUG, P.; COSSON, M.A.; TOUATI, G.J.B.; ARNOUX, J.B.; BARBIER, V.; BAHU-BUISSON, N.; DESGUERRE, I.; CHARBIT, M.; BENOIST, J.F.; 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**, v.110, p. 106-110, 2013.
- BRASSIER, A.; KRUG, P.; LACAILE, F.; PONTOIZEAU, C.; KRID, S.; SISSAOUI, S.; SERVAIS, A.; ARNOUX, J-P.; LEGENDRE, C.; CHARBIT, M.; SCEMLA, A.; FRANCOZ, C.; BENOIST, J-F.; SCHIFF, M.; MOCHEL, F.; TOUATI, G.; BROUÉ, P.; CANO, A.; TARDIEU, M.; QUERCIAGROSSA, S.; GRÉVENT, D.; BOYER, O.; DUPIC, L.; OUALHA, M.; GIRARD, M.; AIGRAIN, Y.; DEBRAY, D.; CAPITO, C.; OTTOLENGHI, C.; SALOMON, R.; CHARDOT, C.; LONLAY, P. Long-term outcome of methylmalonic aciduria after kidney, liver, or combined liver-kidney transplantation: The French experience. **J Inherit Metab Dis.**, v. 43, n. 2, p. 234-243, 2020.
- CHANDLER, R.J.; TARASENKO, T.N.; CUSMANO-OZOG, K.; SUN, Q.; SUTTON, V.R.; VENDITTI, C.P.; MCGUIRE, P.J. Liver-directed adeno-associated virus serotype 8 gene transfer rescues a lethal murine model of citrullinemia type 1. **Gene Ther.**, v. 20, n.12, p.1188-91, 2013.
- CHANPRASERT, S.; SCAGLIA, F. Adult liver disorders caused by inborn errors of metabolism: Review and update. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.114, p.1-10, 2015.
- CHAPMAN, K.; MACEACHERN, D.; COX, G.F.; WALLER, M.; FOGARTY, J.; GRANGER, S.; STEPANIANS, M.; WAISBREN, S. Neuropsychological endpoints for clinical trials in methylmalonic acidemia and propionic acidemia: A pilot study. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, v. 34, p. 1-9, 2023.
- CHU, T-H.; CHIEN, Y-H.; LIN, H-Y.; LIAO, H-C.; HO, H-J.; LAI, C-J.; CHIANG, C-C.; LIN, N-C.; YANG, C-F.; HWU, W-L.; LEE, N-C.; LIN, S-P.; LIU, C_S.; HU, R-H.; HO, M-C.; NIU, D-M. Methylmalonic acidemia/propionic acidemia - the biochemical presentation and comparing the outcome between liver transplantation versus non-liver transplantation groups. **Orphanet J Rare Dis.**, v. 14, n.1, p.73, 2019.
- DE BAULNY, H.O.; BENOIST, J.F.; RIGAL, O.; TOUATI, G.; RABIER, D.; SAUDUBRAY, J.M. Methylmalonic and propionic acidemias: management and outcome. **J Inherit Metab Dis.**, v. 28, n. 3, p. 415-23, 2005.
- DEODATO, F.; BOENZI, S.; SANTORELLI, F.M.; DIONISIO-VICI, C. Methylmalonic and propionic aciduria. **Am J Med Genet C Semin Med Genet.**, v.2, p.104-12, 2006.
- FENTON, W.A.; GRAVEL, R.A.A.; ROSENBLATT, D.S. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, p.2165-2193, 2001.
- 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, SZTRIHAI 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.**, v. 37, n. 5, p. 831-40, 2014.
- FOWLER, B.; LEONARD, J.V.; BAUMGARTNER, M.R. Causes of and diagnostic approach to methylmalonic acidurias. **J Inherit Metab Dis.**, v. 31, n. 3, p. 350-60, 2008.
- KIYKIM, E.; OGUZ, O.; DUMAN, C.; ZUBARIOGLU, T.; CANSEVER, M.S.; AYSE CIGDEM AKTUĞLU ZEYBEK, A.C.A. Long-term N-carbamylglutamate treatment of hyperammonemia in patients with classic organic acidemias. **Mol Genet Metab Rep.**, v. 26, 100715, 2021.
- GRADINGER, A.B.; BÉLAIR, C.; WORGAN, L.C.; LAVALLÉE, J.; ROQUIS, D.; WATKINS, D.; ROSENBLATT, D.S. Atypical methylmalonic aciduria: frequency of mutations in the methylmalonyl-CoA epimerase gene (MCEE). **Hum Mutat.**, v. 28, n.10, p.1045, 2007.
- GRÜNERT, S.C.; MÜLLERLEILE, S.; DE SILVA, L.; BARTH, M.; WALTER, M.; WALTER, K.; MEISSNER, T.; LINDNER, M.; ENSENAUER, R.; SANTER, R.; BODAMER, O.A.; BAUMGARTNER, M.R.; BRUNNER-KRAINZ, M.; KARALL, D.; HAASE, C.; KNERR, I.; MARQUARDT, T.; HENNERMANN, J.B.; STEINFELD, R.; BEBLO, S.; KOCH, H.G.; KONSTANTOPOULOU, V.; SCHOLL-BÜRGI, S.; VAN TEEFFELEN-HEITHOFF, A.; SUORMALA, T.; SPERL, W.; KRAUS, J.P.; SUPERTI-FURGA, A.; SCHWAB, K.O.; SASS, J.O. Propionic acidemia: neonatal versus selective metabolic screening. **J Inherit Metab Dis.**, v. 35, n.1, p. 41-9, 2012.
- 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**, v. 15, n. 9, p.161, 2014.
- IMEN, M.; HANENE, B.; ICHRAF, K.; AIDA, R.; ILHEMTK, N.G.K. Methylmalonic acidemia and hyperglycemia: an unusual association. **Brain Dev.**, v. 34, n. 2, p. 113-4, 2012.
- 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.**, v. 8, n.8, p. 4, 2013.
- LEAL, A. F.; FNU, N.; BENINCORE-FLÓREZ, E.; HERREÑO-PACHÓN, A.M.; ECHEVERRI-PEÑA, O.Y.; ALMÉCIGA-DÍAZ, C.J.; TOMATSU, S. The landscape of CRISPR/Cas9 for inborn errors of metabolism. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 138, n.1, p. 1-11, 2023.
- LEONARD, J.V.; MORRIS, A.A. Inborn errors of metabolism around time of birth. **The Lancet**, v. 356, n. 9229, p. 583-7, 2000.
- MANOLI, I.; VENDITTI, C.P. Long-term Rescue of a Lethal Murine Model of Methylmalonic Acidemia Using Adenoassociated Viral Gene Therapy Medical Genetics Information Resource. **Molecular Therapy**, v. 18, p. 11-16, 2010.
- MANOLI, I.; SYSOL, J.R.; LI, L.; HOUILLIER, P.; GARONE, C.; WANG, C.; ZERFAS, P.M.; CUSMANO-OZOG, K.; YOUNG, S.; TRIVEDI, N.S.; CHENG, J.; SLOAN, J.L.; CHANDLER, R.J.; ABU-ASAB, M.; TSOKOS, M.; ELKAHLOUN, A.G.; ROSEN, S.; ENNS, G.M.; BERRY, G.T.; HOFFMANN, V.; DIMAURO, S.; SCHNERMANN, J.; VENDITTI, C.P. Targeting proximal tubule mitochondrial dysfunction attenuates the renal disease of methylmalonic acidemia. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 110, n. 33, p.13552-7, 2013.
- MANOLI, I.; MYLES, J.G.; SLOAN, J.L.; CARRILLO-CARRASCO, N.; MORAVA, E.; STRAUSS, K.A.; MORTON, H.; VENDITTI, C.P. A critical reappraisal of dietary practices in methylmalonic acidemia raises concerns about the safety of medical foods. Part 2: cobalamin C deficiency. **Genetics in medicine**, v. 18, n. 4, p. 396-404, 2016.

- MELO, D.R.; MIRANDOLA, S.R.; ASSUNÇÃO, N.A.; CASTILHO, R.F. Methylmalonate Impairs Mitochondrial Respiration Supported by NADH-Linked. Substrates: Involvement of Mitochondrial Glutamate Metabolism. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, p. 1190-1199, 2012.
- NIZON, M.; OTTOLENGHI, C.; VALAYANNOPOULOS, V.; ARNOUX, J.B.; BARBIER, V.; HABAROU, F.; DESGUERRE, I.; BODDAERT, N.; BONNEFONT, J.P.; ACQUAVIVA, C.; BENOIST, J.F.; 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**, v. 23, n. 8, p.148, 2013.
- OLIVEIRA, A.C.; DE SANTOS, A.M.N.; MARTINS, A.M.; 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**, v. 119, n. 5, p.160-164, 2001.
- OLSEN, R.K.J.; CORNELIUS, N.; GREGERSEN, N. Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. **J Inherit Metab Dis.**, v. 38, n. 4, p.703-19, 2015.
- PEI, K.J.; RAJIKAN, R.B.; HOCK, N.L.; 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**, v. 2, p. 41-52, 2014.
- PANIS, C.; GROTO, D.; SCHMITT, G.C.; VALENTINI, J.; SCHOTT, K.L.; POMBLUM, J.V.; GARCIA, S.C. Physiopathology of vitamin B12 deficiency and its laboratorial diagnosis. **Jornal Brasileiro de patologia**, v. 41, n. 5, p. 169-174, 2005.
- SAUDUBRAY, J.M.; BERGHE, G.V.D.; WALTER, J.H. **Inborn Metabolic Diseases Diagnosis and Treatment**. Ed. 5. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2012.
- SCHAFTINGEN, E.V.; CUNHA, M.V.; LINSTER, C. Enzyme complexity in intermediary metabolism. **J Inherit Metab Dis.**, v. 38, n. 4, p.721-7, 2015.
- SCRIVER, C.R.; 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.**, v. 3, n.1, p. 61-78, 2009.
- SOKAL, E.M. Treating inborn errors of liver metabolism with stem cells: current clinical development. **J Inherit Metab Dis.**, v. 37, n. 4, p. 535-9, 2014.
- TEIXEIRA, B.C.; LOPES, A.L.; MACEDO, R.C.O.; CORREA, C.S.; RAMIS, T.R.; RIBEIRO, J.L.; OLIVEIRA, A.R. Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos Cardiovasculare. **J Vasc Bras.**, v. 2, p. 108-115, 2014.
- VERMON, H.J.; VERNON, H.J.; SPERATI, C.J.; KING, J.D.; PORETTI, A.; MILLER, N.R.; SLOAN, J.L.; CAMERON, A.M.; MYERS, D.; VENDITTI, C.P.; VALLE, D. A detailed analysis of methylmalonic acid kinetics during hemodialysis and after combined liver/kidney transplantation in a patient with muto methylmalonic acidemia. **J Inherit Metab Dis.**, v. 6, p. 899-907, 2014.
- VIEGAS, C.M.; ZANATTA, Â.; GRINGS, M.; HICKMANN, F.H.; MONTEIRO, W.O.; SOARES, L.E.; SITTA, Â.; LEIPNITZ, G.; DE OLIVEIRA, F.H.; 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.**, v. 6, p. 659-69, 2014.
- ZWICKLER, T.; HAEGE, G.; RIDERER, A.; HÖRSTER, F.; HOFFMANN, G. F.; BURGARD, P.; KÖLKE, S. Metabolicdecompensation in methylmalonic aciduria:which biochemical parameters are discriminative? **JInherit Metab Dis.**, v. 35, p. 797-806, 2012.