

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ANDRÉ DE CARVALHO AFFONSO

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ÁCIDO
METILMALÔNICO EM PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS
EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS A DANO RENAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo da Costa
Ferreira

CRICIÚMA, AGOSTO DE 2012.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A257e Affonso, André de Carvalho.

Efeitos da administração aguda de ácido metilmalônico em parâmetros neuroquímicos em ratos jovens submetidos a dano renal / André de Carvalho Affonso ; orientador: Gustavo da Costa Ferreira. – Criciúma : Ed. do Autor, 2012.

53 f. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2012.

1. Insuficiência renal. 2. Acidemia metilmalônica.
3. Ácido metilmalônico. 4. Erros inatos do metabolismo.
I. Título.

CDD. 22^a ed. 616.614

Folha informativa

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biologia Celular e Molecular e do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa 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 N° 1.919 de 03.06.2005

ATA DA 152ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata da Defesa Pública de Dissertação do Mestrado de André de Carvalho Affonso. Aos dezoesseis dias do mês de agosto do ano de dois mil e doze, às 10h e 30 min, na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, reuniram-se os membros da Banca Examinadora, composta pelos senhores professores: Dra. VANESSA MORAES DE ANDRADE (Membro - UNESC), Dr. JOÃO LUCIANO DE QUEVEDO (Membro - UNESC) e Dr. RAFAEL BORBA ROSA (Membro - UNISINOS) e designados pelo Colegiado de Coordenação, a fim de argüirem a dissertação de Mestrado de André de Carvalho Affonso, subordinado ao título: “Efeitos da administração aguda de ácido metilmalônico em parâmetros neuroquímicos em ratos jovens submetidos a dano renal”. Aberta a sessão pelo Presidente da mesma, coube ao candidato, de forma regimental, expor o tema de sua dissertação, findo o que, dentro do tempo regulamentar, foi questionada pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida, procedeu às explicações que se faziam necessárias. Após esse procedimento, a Banca Examinadora reuniu-se individualmente, para a avaliação final do candidato. Retornando à sessão, o Presidente, lendo o Termo de Apresentação de Dissertação, declarou, André de Carvalho Affonso, aprovado com conceito B.

ALTERAÇÕES SUGERIDAS PELA BANCA EXAMINADORA:

Ver sugestões de cada membro

Emílio Luiz Streck
Prof. Dr. EMÍLIO LUIZ STRECK (Presidente do Colegiado de Coordenação)

Gustavo da Costa Ferreira
Prof. Dr. GUSTAVO DA COSTA FERREIRA (Orientador)

BANCA EXAMINADORA:

Vanessa Moraes de Andrade
Profa. Dra. VANESSA MORAES DE ANDRADE (Membro - UNESC)

João Luciano de Quevedo
Prof. Dr. JOÃO LUCIANO DE QUEVEDO (Membro - UNESC)

Rafael Borba Rosa
Prof. Dr. RAFAEL BORBA ROSA (Membro - UNISINOS)

CANDIDATO: André de Carvalho Affonso
ANDRÉ DE CARVALHO AFFONSO

Criciúma, SC, 16 de agosto de 2012.

*À minha família, na qual me apoio e busco
inspiração para todas as realizações da
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À minha querida e amada esposa Carla, que desde o início apoiou, incentivou e lutou junto para que eu pudesse realizar este sonho, muitas vezes com abdicação e sacrifício próprio.

Aos meus amados filhos Amanda, Alice e Lucas, que permitiram meus dias de distância e entenderam quando não podia acompanhá-los.

Aos meus pais, que me ensinaram o valor da luta e da simplicidade, sempre me incentivando a estudar mais e me aperfeiçoar no meu trabalho.

Às amigas Daniele Guilhermano e Fernanda Malgarin, que sempre me ajudaram nas horas de dificuldade no preparo deste trabalho.

Aos alunos e pesquisadores que participaram dos experimentos, com toda a dedicação e zelo pelo fiel resultado a seguir exposto.

À professora Alexandra Zugno e seus colaboradores do Neurolab, que com imensa presteza nos permitiram vários experimentos antes nesta dissertação.

À querida amiga, professora e co-orientadora (extra-oficial) e amiga Fernanda Schuck, que durante todo o trabalho ajudou no preparo, organização, nos testes, e em todos os outros detalhes que foram essenciais para que este trabalho fosse concluído.

Ao mais que amigo, orientador, professor e irmão Gustavo da Costa Ferreira, que desde o início desta empreitada foi parceiro e conselheiro, compreendendo todas as dificuldades, ausências, impontualidades e falhas. Que sempre foi uma âncora diante dos desânimos e um estrategista na hora de poupar-me viagens e desgastes quando desnecessários. Que sempre tem uma palavra de ânimo e coragem e proporcionou que todo o esforço valesse a pena.

À todos os amigos, colegas, professores, funcionários da universidade e outros que de forma direta ou indireta contribuíram para que tudo fosse realizado.

Meu imenso OBRIGADO!

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”

Johann Wolfgang von Goethe

RESUMO

O acúmulo tecidual de ácido metilmalônico (MMA) é o principal achado bioquímico da acidemia metilmalônica. Clinicamente, a doença é caracterizada por deterioração neurológica progressiva e insuficiência renal, cuja fisiopatologia ainda encontra-se indefinida. No presente estudo investigamos o efeito da administração aguda de MMA em alguns parâmetros importantes de neurotransmissão no córtex cerebral de ratos. Os parâmetros avaliados foram, a atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase, ATPases insensíveis a ouabaína e atividade da acetilcolinesterase, na presença ou na ausência de lesão renal induzida pela administração de gentamicina. Os ratos Wistar com 30 dias de idade foram divididos em quatro grupos: grupo controle (salina / salina); MMA (salina / $1,67 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de MMA); gentamicina (70 mg.kg^{-1} de gentamicina / salina) e MMA juntamente com gentamicina (gentamicina / MMA). Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de salina ou de gentamicina e, uma hora após, os animais receberam três injeções subcutâneas consecutivas de MMA ou de salina, com um intervalo de 11 horas entre injeções. Uma hora após a última injeção os animais foram mortos e o córtex cerebral isolado. A administração de MMA não foi capaz de modificar as atividades da Na^+/K^+ -ATPase, das ATPases insensíveis a ouabaína ou da acetilcolinesterase no córtex cerebral de ratos jovens. Nos ratos que receberam gentamicina simultaneamente com MMA, observou-se um aumento na atividade da acetilcolinesterase no córtex cerebral, sem nenhuma alteração na atividade das outras enzimas estudadas. Consequentemente, pode-se especular que o desequilíbrio colinérgico pode exercer um papel na patogênese dos danos cerebrais que ocorrem nesta doença. Além disso, a fisiopatologia dos danos teciduais não pode ser atribuída exclusivamente à toxicidade do MMA, e o controle da função renal deve ser considerado como uma prioridade no cuidado destes pacientes, especificamente

durante episódios de descompensação metabólica, quando os níveis de MMA são mais elevados.

Palavras-chave: ácido metilmalônico, insuficiência renal, parâmetros neuroquímicos, cérebro.

ABSTRACT

Tissue methylmalonic acid (MMA) accumulation is the biochemical hallmark of methylmalonic acidemia. Clinically, the disease is characterized by progressive neurological deterioration and renal failure, whose pathophysiology is still undefined. In the present study we investigated the effect of acute MMA administration on some important parameters of brain neurotransmission in cerebral cortex of rats, namely Na⁺/K⁺-ATP-ase, ouabain-sensitive ATPases and acetylcholinesterase activities, in the presence or absence of kidney injury induced by gentamicin administration. Thirty-day old Wistar rats were divided into four groups: control group (saline /saline); MMA (saline /MMA 1.67 $\mu\text{mol.g}^{-1}$); gentamicin (gentamicin 70 mg.kg^{-1} /saline) and MMA plus gentamicin (gentamicin / MMA). Animals received one intraperitoneal injection of saline or gentamicin and, one hour after, the animals received three consecutive subcutaneous injections of MMA or saline, with an 11 hours interval between injections. One hour after the last injection the animals were killed and the cerebral cortex isolated. MMA administration by itself was not able to modify Na⁺/K⁺-ATPase, ATPases ouabain-sensitive or acetylcholinesterase activities in cerebral cortex of young rats. In rats receiving gentamicin simultaneously with MMA, it was observed an increase in the acetylcholinesterase activity in cerebral cortex, without any alteration in the activity of the other studied enzymes. Therefore, it may be speculated that cholinergic imbalance may play a role in the pathogenesis of the brain damage occurring in this disorder. Furthermore, the pathophysiology of tissue damage cannot be exclusively attributed to MMA toxicity, and control of kidney function should be considered as a priority in the management of these patients, specifically during episodes of metabolic decompensation, when MMA levels are higher.

Keywords: methylmalonic acid, renal failure, neurochemical parameters, brain

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	25
1.1.2 Acidemias Orgânicas.....	25
1.1.3 Acidemia Metilmalônica	26
<i>1.1.3.1 Defeito bioquímico</i>	<i>26</i>
1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	26
1.2.1 Diagnóstico	27
1.2.2 Tratamento	27
1.2.3 Fisiopatologia.....	28
1.3 ACETILCOLINESTERASE	30
1.3.1 Acetilcolinesterase e erros inatos do metabolismo.....	30
1.3.2 Na ⁺ /K ⁺ -ATPase e ATPases insensíveis à ouabaína	31
2 OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVO GERAL	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. ANIMAIS	34
3.2. EXPERIMENTOS IN VIVO	34
3.3. EXPERIMENTOS IN VITRO	35
3.4. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CREATININA	35
3.5.PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS SINÁPTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DA NA⁺/K⁺-ATPASE E DAS ATPASES INSENSÍVEIS À OUABAÍNA	35
3.6.DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA NA⁺/K⁺-ATPASE E DAS ATPASES INSENSÍVEIS À OUABAÍNA	36
3.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	37
3.8. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA	37
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4. RESULTADOS.....	38
5. DISCUSSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) caracterizam-se por mutações genéticas que determinam erros na codificação de proteínas importantes nas rotas metabólicas, provocando assim, o acúmulo e/ou falta de substratos, podendo até gerar desvios das vias metabólicas e acarretando em toxicidade celular. Tais erros moleculares geralmente ocorrem em nível de enzimas, receptores e transportadores e podem aparecer de formas fenotípicas diferentes, dependendo do local e tipo da mutação, sendo comum aparecerem as primeiras manifestações já na infância do indivíduo afetado (Scriver et al., 2001).

É importante ressaltar o caráter hereditário deste grande grupo de doenças, que são divididas em 3 subgrupos de acordo com o padrão fenotípico. O grupo I compreende as doenças do metabolismo intermediário, geralmente caracterizadas pelo acúmulo de componentes tóxicos próximos ao bloqueio metabólico, compreendendo as aminoacidopatias e acidemias orgânicas. No grupo II, podemos encontrar as doenças ocasionadas por alterações na utilização de substratos energéticos nas células, com alterações mitocondriais, do metabolismo de corpos cetônicos ou de lipídios. Finalmente, o grupo III é representado por erros no metabolismo de moléculas complexas, onde pode ser observada uma piora progressiva dos sintomas clínicos. Dentre as doenças deste grupo é possível citar as doenças de depósito lisossomal e peroxissomal (Saudubray et al., 2012).

1.1.2 Acidemias Orgânicas

As acidemias orgânicas são um grupo heterogêneo de doenças metabólicas hereditárias envolvendo tipicamente vias metabólicas participantes na degradação dos aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos. Estas doenças são caracterizadas por um acúmulo de ácidos orgânicos e seus derivados nos tecidos, sangue, urina e outros líquidos corporais. As acidemias orgânicas produzem, em grande parte, também acidúria por excreção dos metabólitos acumulados, como tentativa de compensação e eliminação de metabólitos tóxicos (Wajner et al., 2001).

1.1.3 Acidemia Metilmalônica

1.1.3.1 Defeito bioquímico

A acidemia metilmalônica é uma acidemia orgânica causada pela deficiência da enzima L-metilmalonil-CoA mutase ou de seu cofator, a cianocobalamina. Aproximadamente 50% dos casos se devem a um defeito na enzima e podem se apresentar de duas formas: *mut(0)*, quando a enzima não tem qualquer atividade e que não responde a altas doses de cobalamina (vitamina B12), e *mut(-)*, em que a enzima tem uma pequena atividade quando o paciente recebe uma suplementação de vitamina B₁₂. Os demais casos se devem a defeitos na síntese, ativação (*cblA*, *cblB*, *cblC*, *cblD* e *cblE*) ou transporte da cobalamina. Os pacientes que apresentam a forma *mut(0)* e defeitos de *cblB* apresentam um fenótipo mais grave e uma maior frequência de complicações do que as outras formas (Horster et al., 2007). Até o presente momento, quatro genes foram descritos como causadores de acidemia metilmalônica isolada, *MUT*, *MMAA*, *MMAB* e *MMADHC* (Diünder et al., 2012), que são responsáveis pela deficiência da L-metilmalonil-CoA mutase e defeitos da *cblA*, *cblB* e *cblD*, respectivamente (Jansen et al., 1989; Dobson et al., 2002a,b; Coelho et al., 2008). As mutações identificadas nestes genes são molecularmente heterogêneas (Lerner-Ellis et al., 2004; Yang et al., 2004; Acquaviva et al., 2005; Lerner-Ellis et al., 2006; Worgan et al., 2006). Todos estes defeitos levam ao acúmulo do ácido metilmalônico (MMA) e de seus metabólitos, ácidos propiônico, 2-metilcítrico e tíglico (Fenton, 2001; Cornejo e Raiman, 2003). A acidemia metilmalônica é uma das acidemias orgânicas mais frequentes, com prevalência estimada de 1:48.000 nascidos vivos (Scriver et al., 2001).

1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas da acidemia metilmalônica normalmente ocorrem na primeira semana de vida e são predominantemente neurológicas, como encefalopatia aguda grave ou crônica, letargia, hipotonia, retardo mental, atrofia cerebral, anormalidades no eletroencefalograma, apatia, coma e convulsões. Além das manifestações neurológicas, os pacientes apresentam insuficiência renal crônica, caracterizada por nefrite tubulointersticial com acidose tubular e diminuição da filtração glomerular (Cornejo e Raimann, 2003). Também ocorre recusa à alimentação, vômitos,

desidratação, episódios de cetoacidose, apneia e taquipneia (Lehnert et al., 1994; Fenton et al., 2001). Os pacientes que sobrevivem às crises apresentam um grau variável de atraso no desenvolvimento psicomotor e no 3º nível de cognição (Van der Meer et al., 1994; Olgier de Baulny et al., 2005).

1.2.1 Diagnóstico

O diagnóstico da acidemia metilmalônica é feito fundamentalmente pela detecção de altas concentrações de MMA na urina dos pacientes afetados. No plasma, as concentrações de MMA podem alcançar 2,9 mM, enquanto que, em pessoas normais, este ácido é praticamente indetectável. Análises enzimáticas realizadas utilizando fibroblastos cultivados podem ser realizados para se determinar se o defeito é na metilmalonil-CoA mutase ou no metabolismo da cobalamina (Fenton et al., 2001).

1.2.2 Tratamento

O tratamento da acidemia metilmalônica é feito basicamente através da utilização de um leite especial pobre em aminoácidos precursores do MMA em neonatos, bem como através de dieta com restrição proteica, ou preferencialmente por redução da ingestão dos aminoácidos precursores do propionato em infantes (Thomas, 1994). Outra estratégia terapêutica é baseada na administração parenteral de altas quantidades de vitamina B12, visto que alguns pacientes respondem a esta terapia (variantes cblA, cblB, cblC, cblD e cblE). Episódios de cetoacidose devem ser tratados por retirada total de proteínas da dieta e administração parenteral de bicarbonato de sódio, bem como de glicose, que é necessária para evitar o catabolismo, o que levaria a um maior aumento nas concentrações de MMA. As crises, particularmente aquelas acompanhadas por hiperamonemia, podem ser tratadas por diálise peritoneal e/ou hemodiálise. Nutrição parenteral total tem sido usada em pacientes gravemente doentes. A administração de altas doses (100 mg/Kg) de L-carnitina (Boehmer e Bremer, 1968; Olgier de Baulny et al., 2005) e antibioticoterapia (que elimina a flora intestinal e contribui para a elevação das concentrações plasmáticas de propionato) também podem ser utilizados no tratamento desta doença (Thomas, 1994; Cornejo e Raimann, 2003; Olgier de Baulny et al., 2005).

1.2.3 Fisiopatologia

A fisiopatogenia dos danos teciduais característico dos pacientes afetados pela acidemia metilmalônica ainda é pouco conhecida. Estudos utilizando culturas de células de córtex e estriado de cérebro de embriões de ratos mostraram que a exposição destas células a 10 mM de MMA por 24 horas causou uma mortalidade neuronal superior a 90%, sendo que as células corticais foram as mais vulneráveis (McLaughlin et al., 1998). Um decréscimo na relação ATP/ADP também foi observado após o tratamento das células com MMA, que foi atribuído à produção de malonato, um inibidor clássico da cadeia respiratória e do ciclo de Krebs, a partir de MMA (McLaughlin et al., 1998). Outros estudos demonstraram a inibição do metabolismo energético pelo MMA e alterações no transporte de substratos para dentro da mitocôndria (Wajner e Coelho, 1997; Brusque et al., 2002; Marisco et al., 2003; Royes et al., 2003; Fleck et al., 2004; Ostergaard et al., 2005; Pettenuzzo et al., 2006; Mirandola et al., 2008).

Por outro lado, foi verificado que a administração intraestriatal de MMA em ratos provoca diminuição no conteúdo de fosfocreatina, além de convulsões mediadas pelos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Tais efeitos são prevenidos quando os animais são pré-tratados com antagonistas destes receptores (de Mello et al., 1996; Royes et al., 2003) e atenuados quando os animais são pré-tratados com ácido ascórbico ou α -tocoferol, o que pode indicar o envolvimento de espécies reativas nos episódios convulsivos (Fighera et al., 1999). No entanto, outros investigadores não encontraram uma inibição direta do MMA sobre a cadeia respiratória, atribuindo o efeito demonstrado por este ácido à formação endógena de ácido malônico (Okun et al., 2002; Kolker et al., 2003). Outros estudos mostraram que o MMA altera vários parâmetros do sistema glutamatérgico, bem como estimula a produção de espécies reativas de oxigênio *in vitro* (Fontella et al., 2000; Brusque et al., 2001). Também foram observadas alterações cognitivas (aprendizado e memória espacial) em ratos que receberam cronicamente a administração de MMA, e tais alterações foram prevenidas pela administração concomitante de ácido ascórbico (Pettenuzzo et al., 2003). Um estudo conduzido por Kashtan e colaboradores (1998) demonstrou que o tratamento crônico com MMA em ratos causou proteinúria e injúria renal tubular, bem como edema mitocondrial e desorganização das cristas no epitélio tubular, sugerindo que uma disfunção mitocondrial pode estar envolvida no dano renal encontrado nesta doença.

Modelos animais têm contribuído para a compreensão da patogênese da acidemia metilmalônica, ajudando a desvendar os mecanismos envolvidos no dano tecidual, bem como o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Um modelo químico agudo para a acidemia metilmalônica foi proposto por Patel e colaboradores (1976), no qual ratos com uma semana de vida recebiam três injeções intraperitoneais de MMA, com duas horas de intervalo entre as aplicações. O grupo controle, mantido sob as mesmas condições, recebia injeções de solução salina (NaCl 0,9%). O modelo, embora satisfatório em mimetizar a doença para os fins propostos, causou a morte de 10% dos animais do grupo experimental, provavelmente devido à administração de altas concentrações de ácido metilmalônico.

Outro modelo experimental crônico de acidemia metilmalônica foi descrito por Dutra e colaboradores (1991), e consistia na administração através de injeções subcutâneas de MMA, duas vezes ao dia, do 5° ao 28° dia de vida, mimetizando os dois principais picos pós-prandiais de MMA encontrados nos pacientes com esta acidemia. As concentrações plasmáticas e cerebrais de MMA provocadas por este modelo foram de, respectivamente, 2,0-2,5 mM e 0,8-1,0 $\mu\text{mol/g}$ (equivalente a aproximadamente 1 mM).

Peters e colaboradores (2003) desenvolveram um modelo nocaute de acidemia metilmalônica baseado na homologia do locus da L-metilmalonil-CoA mutase humana com o locus da L-metilmalonil-CoA mutase do camundongo. Neste modelo, os autores, utilizando técnicas de genes alvos, inativaram o locus da L-metilmalonil-CoA mutase do camundongo no domínio crítico para a ligação à coenzima A. No entanto, nesse modelo os animais morriam cerca de 24 horas de vida pós-natal, impossibilitando estudos bioquímicos ou comportamentais.

Recentemente, foi proposto que o dano renal e a neurodegeneração apresentados pelos pacientes portadores de acidemia metilmalônica estariam associados (Morath et al., 2008, 2012). Entretanto, praticamente nada se tem investigado sobre esta hipótese. É possível que o aumento de MMA durante as crises de descompensação metabólica, aliado à disfunção renal apresentada pelos pacientes, possa ter um papel importante na fisiopatologia do dano cerebral apresentados pelos pacientes.

1.3 ACETILCOLINESTERASE

A acetilcolinesterase é uma importante enzima no controle da transmissão dos impulsos nervosos através das sinapses colinérgicas, localizando-se na membrana plasmática celular, principalmente de hemácias, terminações nervosas (sinapses) e placa motora muscular. Tal enzima degrada a acetilcolina em colina e acetato, contribuindo para a integridade e mudanças de permeabilidade da membrana durante a transmissão e condução sinápticas.

A enzima encontra-se anexada à membrana plasmática com sua parte ativa exposta na face externa. Por causa da ampla distribuição das funções colinérgicas, se houver acúmulo de acetilcolina (por inatividade da acetilcolinesterase), efeitos tóxicos afetarão as atividades simpáticas, parassimpáticas, motoras e do sistema nervoso central. Nos déficits enzimáticos de acetilcolinesterase poderão surgir sintomas como: bradicardia, hipotensão, secreções excessivas (como sialorréia), broncoconstrição, sufocamento, hipermotilidade gastrintestinal, redução da pressão intraocular e miose.

1.3.1 Acetilcolinesterase e erros inatos do metabolismo

Alguns EIM apresentam sinais e sintomas relacionados à disfunção neuronal, incluindo a acidemia metilmalônica. O papel da homeostase colinérgica é alvo de pesquisa em doenças com manifestações neurológicas referentes à alteração da atividade motora, comportamento, aprendizagem e memória, secundariamente à ação da acetilcolina como neurotransmissor no controle da excitabilidade no SNC (Anglade e Larabi-Godinot, 2010). Na fenilcetonúria, um EIM com manifestações clínicas importantes do SNC provocado por uma deficiência na via catabólica do aminoácido essencial fenilalanina, foi observada uma diminuição na atividade desta enzima em membranas de eritrócitos de pacientes sem controle dietético adequado (Tsakiris et al., 2002). Além disso, em camundongos geneticamente modificados para mimetizar a deficiência de ornitina transcarbamilase, outro exemplo de EIM, observou-se que a acetilcolinesterase não apresentava alterações (Ratnakumari et al., 1995). Por outro lado, foi demonstrado que a administração combinada dos aminoácidos homocisteína e metionina, que encontram-se elevados na homocistinúria, provoca um aumento da acetilcolinesterase em cérebro de ratos (Schulpis et al., 2006). Da mesma forma, foi demonstrado que altas concentrações de guanidinoacetato, o principal metabólito acumulado na deficiência de

guanidinoacetato metiltransferase, provoca um aumento da atividade desta enzima *in vivo* (Zugno et al., 2008).

1.3.2 Na⁺/K⁺ -ATPase e ATPases insensíveis à ouabaína

Para a manutenção da homeostase celular é necessário ocorrer um fluxo adequado dos íons sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) intra e extracelulares. Esta enzima capta a energia derivada da hidrólise do ATP para o transporte de três íons Na⁺ para fora da célula, e dois íons potássio para o interior celular. A saída de Na⁺ capacita as células animais a controlar osmoticamente seu conteúdo hídrico. Visto que três cargas positivas são transportadas para o meio extracelular e somente duas são transportadas para o meio intracelular, o fluxo de íons Na⁺ e K⁺ produz um gradiente eletroquímico através da membrana celular (Lingrel e Kuntzweiler, 1994). Tal gradiente é utilizado nos processos de despolarização e repolarização do potencial de membrana, de manutenção e regulação do volume celular e para transporte ativo de neurotransmissores e outras moléculas (Geering, 1990). Todas as células eucarióticas superiores consomem o ATP por elas produzido para a manutenção das concentrações citosólicas e extracelulares de Na⁺ e K⁺, sendo que esse consumo pode ser da ordem de 40 a 60% nas células neuronais (Whittan, 1962). A Na⁺/K⁺-ATPase é invariavelmente composta por subunidades α e β (em vertebrados há também uma “subunidade γ ”, com função regulatória), todavia a subunidade “ α ” possui todos os domínios necessários para o transporte iônico. Esta enzima, além de permitir as trocas iônicas e a manutenção do equilíbrio elétrico, participa também do transporte de solutos, o que consome grande parte da energia celular (Gregg e Milligan, 1982; Milligan e Mcbride, 1985).

Tal regulação se mostra com grande importância no sistema nervoso central (SNC), onde o desequilíbrio pode causar graves consequências (Erecinska e Silver, 1994), tendo sido associadas à despolarização excessiva, instabilidade da membrana e descargas paroxísticas (Donalson et al., 1977). Recentemente, diversos estudos descreveram efeitos de alguns metabólitos que se acumulam em EIM e alterações na atividade desta enzima. Neste sentido, estudos *in vitro* demonstraram que alguns metabólitos inibem a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase, incluindo a fenilalanina e seus metabólitos desaminados (fenilpiruvato, fenilacetato e fenilactato) (Wyse et al., 1995). Bürger (1998) demonstrou semelhante inibição para leucina, valina, isoleucina e seus cetoácidos, compostos acumulados na doença do xarope do

bordo. A diminuição provocada pela fenilalanina sobre esta atividade enzimática foi confirmada em estudos *in vivo* utilizando um modelo de hiperfenilalaninemia experimental produzida pela administração crônica de fenilalanina (Wyse et al., 1995). Efeito semelhante foi verificado na administração de MMA, onde houve redução da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (Ribeiro et al., 2009). Finalmente, outro estudo demonstrou que tanto a administração crônica de ácido propiônico (*in vivo*), como a presença desse ácido no meio de incubação (*in vitro*), inibem a atividade da Na^+/K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos (Wyse et al., 1998). Experimentalmente, a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase pode ser diferenciada da atividade das outras ATPases pela adição de ouabaína ao meio de incubação, uma vez que este glicosídeo cardiotônico é um inibidor específico da enzima Na^+/K^+ -ATPase.

Considerando que vários estudos demonstram uma associação entre altas concentrações de metabólitos acumulados em diferentes EIM e alterações da atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e acetilcolinesterase no SNC em modelos animais destas doenças, podemos especular que alterações nestes parâmetros neuroquímicos estejam relacionadas à fisiopatologia dos danos teciduais na acidemia metilmalônica, uma doença em que os pacientes afetados apresentam uma importante sintomatologia neurológica.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração sistêmica de MMA sobre importantes parâmetros neuroquímicos em ratos, na presença ou ausência de dano renal induzido pela administração de gentamicina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito *in vivo* da administração aguda de MMA ($1,67 \mu\text{mol.g}^{-1}$) sobre a atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ em córtex cerebral de ratos jovens (30 dias de vida);
- Avaliar o efeito *in vivo* da administração aguda de MMA ($1,67 \mu\text{mol.g}^{-1}$) sobre a atividade das ATPases insensíveis a ouabaína em córtex cerebral de ratos jovens (30 dias de vida);
- Avaliar o efeito *in vivo* da administração aguda de MMA ($1,67 \mu\text{mol.g}^{-1}$) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos jovens (30 dias de vida);
- -Avaliar a interação *in vivo* entre a disfunção renal induzida por gentamicina (70mg.kg^{-1}) sobre os efeitos provocados pela administração sistêmica aguda de MMA nas atividades das enzimas $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$, ATPases insensíveis a ouabaína e acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos jovens (30 dias de vida);
- Avaliar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de MMA (0,5- 5,0 mM) sobre atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos jovens (30 dias de vida).
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos de 30 dias de vida, fornecidos pelo Biotério da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais tiveram livre acesso à água e ao alimento. A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996). O presente projeto obteve aprovação do CEUA local sob o protocolo número **115/2011**.

3.2. EXPERIMENTOS IN VIVO

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, com 6 animais por grupo, como segue:

- Grupo controle: recebeu 4 injeções intraperitoneais de NaCl 0,9 g%;
- Grupo MMA: recebeu 1 injeção intraperitoneal de NaCl 0,9 g% e 3 injeções intraperitoneais de MMA $1,67 \mu\text{mol.g}^{-1}$;
- Grupo gentamicina: recebeu 1 injeção intraperitoneal de gentamicina 70mg.kg^{-1} e 3 injeções intraperitoneais de NaCl 0,9 g%;
- Grupo MMA + gentamicina: recebeu 1 injeção intraperitoneal de gentamicina 70mg.kg^{-1} e 3 injeções intraperitoneais de MMA $1,67 \mu\text{mol.g}^{-1}$.

Os animais receberam a primeira (gentamicina ou salina) e a segunda (salina ou MMA) injeções com intervalo de uma hora. As outras duas injeções (salina ou MMA) ocorreram com intervalo de 11 horas. Vinte e quatro horas após a primeira injeção (gentamicina ou salina), os ratos sofreram eutanásia e o córtex cerebral e o soro foram coletados. Os modelos de acidemia metilmalônica e de insuficiência renal foram realizados de acordo com modelos de acidemia metilmalônica (Dutra et al., 1991) e insuficiência renal (Petronilho et al., 2009) previamente descritos na literatura e mimetizando as condições dos pacientes.

3.3. EXPERIMENTOS IN VITRO

Com objetivo de avaliar se o MMA atua diretamente sobre os parâmetros neuroquímicos ou se a possível alteração é fruto do efeito indireto do MMA sobre o metabolismo cerebral realizamos os testes *in vitro* com adição direta de MMA em diferentes concentrações.

Para tal avaliação, os homogeneizados de córtex cerebral foram incubados na ausência de MMA (grupo controle) em algumas amostras e nas demais com a presença de diferentes concentrações de ácido metilmalônico (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 mM) por 60 minutos a 37°C antes das determinações bioquímicas serem realizadas.

3.4. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CREATININA

Os níveis de creatinina foram avaliados em soro utilizando kit comercial (Labtest, Brasil), o qual utiliza como base a reação de Jaffé, que foi descrita em 1886 e relata a formação de um complexo de cor vermelha quando a creatinina reage com picrato em meio alcalino (Killorn et al., 2011)

3.5. PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS SINÁPTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DA NA⁺/K⁺-ATPASE E DAS ATPASES INSENSÍVEIS À OUABAÍNA

As membranas foram preparadas de acordo com o método de Jones e Matus (1974). Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia.

O cérebro foi rapidamente removido e dissecado sobre placa de Petri em gelo para a obtenção do córtex cerebral, de onde todo o sangue visível foi removido com auxílio de um papel filtro. O córtex cerebral foi então pesado e homogeneizado em 10 volumes de uma solução contendo 0,32 mM de sacarose, 5,0 mM de HEPES e 0,1 mM de EDTA. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 x g por 10 minutos a 4°C.

A solução sobrenadante foi separada e novamente centrifugada a 12000 x g por 20 minutos a 4°C. O sedimento resultante foi suspenso em uma solução hipotônica de Tris-HCl 5 mM pH 8,1, sendo mantido em gelo durante 30 minutos para que ocorresse a lise dos sinaptossomas. Sobre este lisado foi montado um gradiente descontínuo de sacarose constituído de três camadas de diferentes concentrações (48, 28,5 e

10%). Este gradiente, contendo a amostra misturada à fração mais densa de sacarose (48%), foi centrifugado a 69000 x g por 2 horas a 4°C.

Conforme Jones e Matus (1974), após esta centrifugação, a fração de menor concentração (sacarose 10%) é composta basicamente por mielina; a fração intermediária é constituída principalmente por membranas plasmáticas sinápticas (situadas na interface das soluções 28,5 e 48%) e a última fração (sedimento), composta por mitocôndrias. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a fração intermediária foi aspirada e suspensa em tampão Tris-HCl 5 mM pH 8,1, sendo centrifugada a 37000 x g durante 20 minutos a 4°C, para remoção da sacarose residual.

O sedimento, contendo as membranas plasmáticas sinápticas purificadas, foi suspenso no tampão anteriormente citado de modo a obter-se uma concentração final de proteínas entre 0,15 e 0,25 mg/mL. As amostras foram então separadas em alíquotas e armazenadas a -70°C até o momento da determinação enzimática.

3.6.DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA Na⁺/K⁺-ATPASE E DAS ATPASES INSENSÍVEIS À OUABAÍNA

As atividades da Na⁺/K⁺-ATPase e das ATPases insensíveis à ouabaína foram avaliadas conforme o método de Tsakiris e Deliconstantinus (1984). O meio de reação continha cloreto de magnésio 5 mM, cloreto de sódio 80 mM, cloreto de potássio 20 mM, Tris-HCl 40 mM pH 7,4 em um volume final de 200 µL. A atividade de outras ATPases foi medida na presença de ouabaína 1 mM (inibidor específico da Na⁺/K⁺-ATPase). A atividade da Na⁺/K⁺-ATPase foi então calculada como sendo o resultante da diferença entre a atividade obtida pelas ATPases no meio sem ouabaína e a atividade das ATPases do meio contendo ouabaína. As amostras de membranas sinápticas foram adicionadas ao meio em um volume de 10 µL (0,015 - 0,03 µg de proteína) e pré-incubadas na presença (grupos teste) e ausência (grupos controle) das substâncias a serem testadas a 37°C durante 10 minutos. A reação foi iniciada pela adição de ATP 3 mM e o término, após 5 minutos de incubação a 37°C, ocorreu pela adição de 200 µL de TCA 10%. O fosfato inorgânico (Pi) liberado durante a incubação foi medido pelo método de Chan, Delfert e Junger (1986). A atividade enzimática foi expressa em nmol de Pi liberado/(min . mg de proteína).

3.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

A atividade da enzima acetilcolinesterase foi realizada de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1961). Foi avaliada a hidrólise da acetilcolina em uma concentração de 0,8 mM em 1 mL de uma solução contendo 100 mM de tampão fosfato, pH 7,5, e 1 mM de DTNB. Cinquenta microlitros de amostra foram adicionados à solução e pré-incubados por 3 minutos a 25°C. A hidrólise foi monitorada pela formação do ânion tiolato de DTNB a 412 nm por 3 minutos em intervalos de 30 segundos a 25°C. As amostras foram avaliadas em duplicatas e os resultados foram expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.8. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA

O conteúdo proteico foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos por média \pm erro padrão da média e analisados utilizando-se o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 16.0 em um computador PC compatível. Os testes estatísticos utilizados foram análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de múltipla amplitude de Duncan quando o valor de F foi significativo. Considerou-se estatisticamente significativo quando $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Primeiramente, avaliaram-se os níveis séricos de creatinina, um importante marcador bioquímico de função renal, após o tratamento em todos os animais utilizados neste trabalho. Observa-se que os animais que receberam administração de gentamicina ou a coadministração de gentamicina e MMA apresentaram níveis significativamente maiores quando comparados aos animais que receberam solução salina (controles) ou apenas MMA (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito da administração aguda de ácido metilmalônico (MMA) e gentamicina sobre os níveis séricos de creatinina em ratos de 30 dias de vida.

Grupo	Níveis Séricos de Creatinina
Controle	1,334 ± 0,033
MMA	1,386 ± 0,057
Gentamicina	1,547 ± 0,058*
Gentamicina + MMA	1,606 ± 0,076**

Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam média ± erro padrão da média e estão expressos em mg/dL (n=7-8). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle (Teste dos raios múltiplos de Duncan).

Investigaram-se, então, os efeitos da administração aguda de MMA e/ou gentamicina sobre as atividades da Na^+/K^+ -ATPase e das ATPases insensíveis à ouabaína em córtex cerebral de ratos. Pode-se observar na Figura 1 que a administração de MMA e gentamicina, associados ou não, não alteraram as atividades das ATPases avaliadas [$F_{(3,29)} = 0,67$; $P > 0,05$; $F_{(3,29)} = 0,38$; $P > 0,05$, respectivamente].

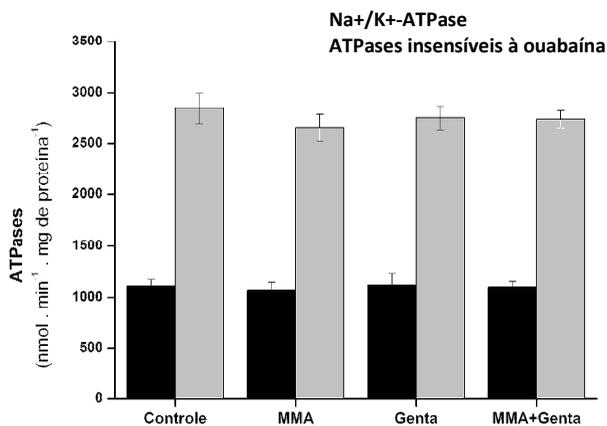


Figura 1. Efeito da administração aguda de ácido metilmalônico (MMA) e gentamicina (Genta) sobre as atividades enzimáticas da Na⁺/K⁺-ATPase e das ATPases insensíveis à ouabaína em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em nmol . min⁻¹ . mg de proteína⁻¹ (n=7-8). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA).

O próximo passo foi investigar os efeitos da administração aguda de MMA associado e não associado à administração de gentamicina sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase também em córtex cerebral de ratos. A Figura 2 mostra que a administração de MMA ou de gentamicina isoladamente não afetam a atividade desta enzima. Entretanto, quando combinados, exerceram um efeito positivo sobre a atividade da acetilcolinesterase, isto é, induziram um aumento da atividade desta enzima de aproximadamente 45% [$F_{(3,25)} = 6,08$; $P < 0,001$].

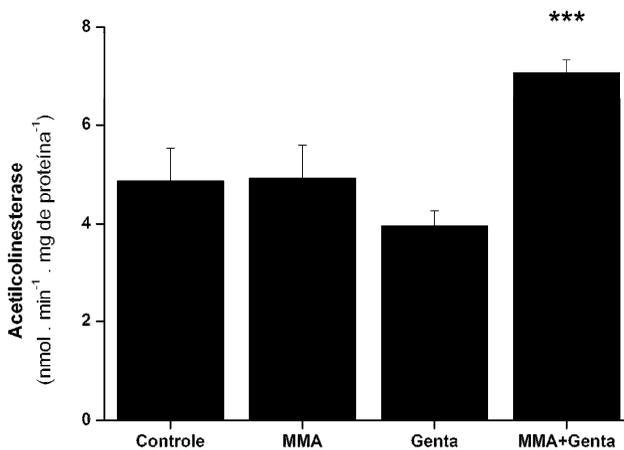


Figura 2. Efeito da administração aguda de ácido metilmalônico (MMA) e gentamicina (Genta) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ ($n=6-7$). *** $P < 0,001$ em relação ao grupo controle (Teste dos raios múltiplos de Duncan).

Finalmente, determinou-se a atividade da enzima acetilcolinesterase na presença e na ausência (controle) de altas concentrações (0,5, 1, 2,5 e 5 mM) de MMA *in vitro* por 1 hora em córtex cerebral de ratos jovens (Figura 3). Observa-se que o MMA *in vitro* não alterou significativamente a atividade enzimática da acetilcolinesterase [$F_{(4,28)} = 0,749$; $P > 0,05$].

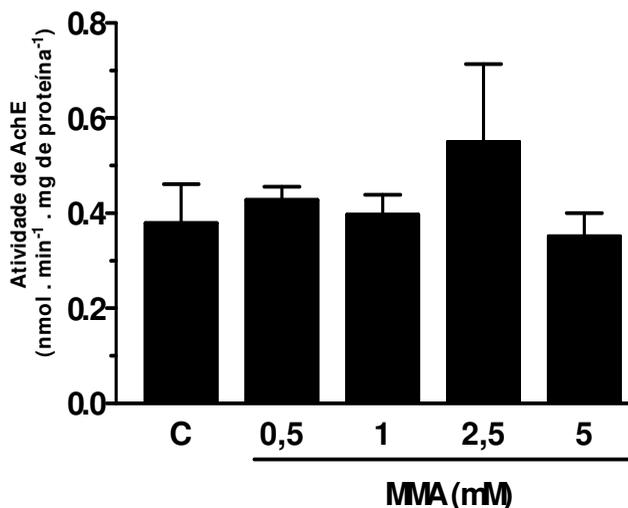


Figura 3. Efeito *in vitro* de ácido metilmalônico (MMA) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ ($n=5-6$). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA).

5. DISCUSSÃO

O MMA é o principal metabólito acumulado na doença causada por uma deficiência da atividade da enzima metilmalonil-CoA mutase, conhecida como acidemia metilmalônica (Fenton et al., 1982). A manifestação clínica dos pacientes pode variar, dependendo da extensão da deficiência da atividade dessa enzima, que pode ser parcial ou total. É mais comum que o início dos sintomas apareçam no período neonatal, embora alguns pacientes apresentem início tardio no curso da doença (Dionisi-Vici et al., 2006). Estes pacientes são normais no nascimento, mas podem desenvolver vômito, letargia, hipotonia e encefalopatia (Nicolaides et al., 1998; Fenton et al., 2001). A ocorrência da lesão renal na acidemia metilmalônica também foi relatada em pacientes (D'Angio et al., 1991; Van calcar et al., 1998; Srinivas et al., 2001; Morath et al., 2008).

Até o presente momento, a fisiopatologia da disfunção cerebral subjacente aos sintomas neurológicos em pacientes afetados pela acidemia metilmalônica ainda é incerta. Neste intuito, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito do MMA sobre alguns parâmetros neuroquímicos importantes, tais como a atividade das enzimas Na^+K^+ -ATPase, ATPases insensíveis à ouabaína e da enzima acetilcolinesterase. Uma vez que foi demonstrado anteriormente que o MMA inibe a atividade da Na^+K^+ -ATPase no córtex cerebral de ratos jovens após administração crônica sistêmica (Wyse et al., 2000), foi inicialmente investigado se a atividade da enzima Na^+K^+ -ATPase é também afetada no córtex cerebral dos animais após a administração sistêmica aguda deste ácido orgânico. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, não foi observada nenhuma interferência do MMA na atividade dessa enzima.

Além disso, a atividade das ATPases insensíveis à ouabaína também não foi afetada por MMA. A mesma ausência de efeito sobre estas atividades enzimáticas também foi observada em estriado de ratos jovens, após administração aguda intraestriatal de MMA (observações não publicadas). Tomados em seu conjunto, estes dados sugerem que concentrações cronicamente elevadas de MMA são necessárias para inibir a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase no cérebro de ratos jovens. Por outro lado, foi demonstrado que injeções agudas intraestriatais de MMA em ratos mais velhos foram capazes de afetar a atividade da Na^+/K^+ -ATPase nesta estrutura (Malfatti et al., 2003), indicando que este efeito pode ser dependente do estágio de desenvolvimento do cérebro do animal.

Recentemente, foi demonstrado que os pacientes com distúrbios do metabolismo do propionato, incluindo acidemia metilmalônica, apresentaram uma diminuição na atividade da butirilcolinesterase (Ribas et al., 2012), uma enzima colinesterase análoga da acetilcolinesterase encontrada no soro. O próximo passo foi, então, avaliar a influência da administração aguda sistêmica de MMA em ratos jovens sobre a atividade da acetilcolinesterase no córtex cerebral. Esta enzima está envolvida na neurotransmissão colinérgica e amplamente relatada por estar envolvida em distúrbios neurológicos observados em algumas doenças neurodegenerativas (Beerl et al., 1995; García-Ayllón et al., 2008). Não foram identificadas alterações significativas na atividade dessa enzima provocada pelo MMA nas condições experimentais testadas.

Considerando que foi recentemente levantada a possibilidade de que alguns mecanismos fisiopatológicos subjacentes aos sintomas cerebrais e renais na acidemia metilmalônica podem estar relacionados ao comprometimento do transporte de ácidos dicarboxílicos, inibição metabólica e estresse oxidativo (Morath et al., 2008), foi avaliada a influência de insuficiência renal aguda induzida pela administração de gentamicina, sobre os efeitos ocasionados por níveis elevados de MMA em córtex cerebral de ratos. Os animais que apresentavam simultaneamente concentrações elevadas de MMA e lesão renal não apresentaram uma diminuição nas atividades da Na^+ / K^+ -ATPase e ATPases insensíveis à oubaína.

Interessantemente, observou-se que a administração de MMA e a insuficiência renal induzida por gentamicina aumentou a atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos jovens, embora este parâmetro não tenha sido afetado pela administração isolada de qualquer um destes compostos. Os dados indicam uma interação entre modelos experimentais de acidemia metilmalônica e de disfunção renal, resultando em um aumento da atividade da acetilcolinesterase; o que não foi visto no experimento *in vitro* onde foi avaliada a possibilidade de efeito direto do MMA sobre a atividade da acetilcolinesterase, sugerindo etapas intermediárias na patogenia do MMA sobre o sistema colinérgico.

Considerando que a atividade desta enzima está envolvida nos processos de memória e aprendizado (Easton et al., 2012), podemos especular que uma alteração no sistema colinérgico esteja envolvida nas alterações de memória provocadas pela administração crônica de MMA (Pettenuzzo et al., 2003a,b).

Ainda que esta interação não esteja precisamente esclarecida, deve ser enfatizado que a enzima acetilcolinesterase desempenha um papel crucial como uma enzima envolvida na regulação da cessação (término) da sinalização colinérgica, e que o desenvolvimento do cérebro envolve alteração/modulação do sistema colinérgico (Herlenius e Lagercrantz, 2004). Neste contexto, moléculas de sinalização podem atuar interferindo na transcrição e tradução através de um mecanismo de feedback (Salgado et al., 2001; Keseler et al., 2005), modulando os níveis de proteínas, produtos enzimáticos, ou outras moléculas relacionadas com a ação da proteína codificada pelo gene considerado (Khishna et al., 2006). Dessa forma, o aumento da atividade da acetilcolinesterase pode resultar de interações entre as redes genéticas e metabólicas. Alternativamente, pode ser secundária a diferenças nos níveis cerebrais de MMA em ratos jovens após a exposição aos diferentes tratamentos empregados, visto que a barreira hematoencefálica é praticamente impermeável aos ácidos dicarboxílicos tais como MMA (Hoffmann et al., 1993) e foi mostrado que a lesão renal aguda produz alterações na integridade da barreira hematoencefálica (Liu et al., 2008).

No momento, não podemos determinar a relevância fisiopatológica exata de nossas descobertas. Entretanto, deve ser mencionado que as condições empregadas no presente trabalho foram baseadas nas características clínicas e bioquímicas observadas em pacientes afetados pela acidemia metilmalônica, predominantemente lesão renal e níveis de MMA elevados em tecidos e fluidos corporais. Além disso, foi previamente demonstrado que a atividade da acetilcolinesterase pode também ser modulada por metabólitos que se acumulam em outras doenças metabólicas hereditárias com envolvimento neurológico (Ratnakumari et al., 1995; Schulpis et al., 2006; Zugno et al., 2008). No entanto, não podemos descartar a possibilidade deste efeito atuar como um mecanismo protetor uma vez que, dada a grande variedade de funções em que o sistema colinérgico está envolvido, em caso de hiperfunção colinérgica, os efeitos tóxicos envolveriam, além do sistema nervoso central, os sistemas simpático, parassimpático e motor (Sussman et al., 1991; Lotti, 1995).

Concluindo, o presente estudo fornece evidência de que a atividade da acetilcolinesterase é aumentada no córtex cerebral de ratos expostos simultaneamente à administração de MMA e gentamicina. Considerando que o aumento da atividade da acetilcolinesterase tem sido relacionada com um progressivo declínio neurológico (Beerl et al., 1995; García-Ayllón et al., 2008), presume-se que alterações do sistema

colinérgico possam estar envolvidas na fisiopatologia dos sintomas neurológicos observados em pacientes afetados pela acidemia metilmalônica. No entanto, diversos mecanismos devem ser melhor investigados antes que se proponha uma terapia com moduladores da neurotransmissão colinérgica para estes pacientes, incluindo a investigação dos efeitos da combinação destes tratamentos sobre os mecanismos envolvidos no controle dos níveis de acetilcolina na fenda sináptica (síntese, liberação, degradação e recaptação deste neurotransmissor), bem como sobre a quantidade, distribuição e funcionalidade dos diferentes tipos de receptores colinérgicos. Neste caso, poder-se-ia especular que a patogênese da lesão cerebral que ocorre nesta doença não possa ser atribuída exclusivamente às alterações induzidas diretamente pelo MMA no cérebro, e que o controle da função renal deve ser considerado como sendo uma prioridade no manejo desses pacientes, especialmente durante episódios de descompensação metabólica quando os níveis de MMA são mais elevados.

REFERÊNCIAS

- Acquaviva C, Benoist JF, Pereira S, Callebaut I, Koskas T, Porquet D, Elion J. Molecular basis of methylmalonyl-CoA mutase apoenzyme defect in 40 European patients affected by mut(o) and mut- forms of methylmalonic acidemia: identification of 29 novel mutations in the MUT gene. *Hum Mutat.* 2005; 25:167-76.
- Anglade P; Larabi-Godinot Y. Historical landmarks in the histochemistry of the cholinergic synapse perspectives for future researches. *Biomed. Res.* 2010; 31:1-12.
- Beeri R, Andres C, Lev-Lehman E, Timberg R, Huberman T, Shani M, Soreq H. Transgenic expression of human acetylcholinesterase induces progressive cognitive deterioration in mice. *Curr Biol.* 1995; 5:1063-71.
- Boehmer T, Bremer J, Propionylcarnitine. Physiological variations *in vivo*. *Biochim Biophys Acta.* 1969; 152: 559-67.
- Brusque AM, Borba Rosa R, Schuck PF, Dalcin KB, Ribeiro CA, Silva CG, CM Wannmacher, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Briones P, Wajner M. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int.* 2002; 40:593-601.
- Brusque AM, Rotta LN, Tavares RG, Emanuelli T, Schwarzbald CV, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wannmacher CMD, De Souza DOG, Wajner M. Effects of methylmalonic and propionic acids on glutamate uptake by sinaptosomes from cerebral cortex of rats. *Brain Res.* 2001; 920:194-201.
- Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem.* 1986; 157:375-380.
- Coelho D, Suormala T, Stucki M, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS, Newbold RF, Baumgartner MR, Fowler B. Gene identification for the cblD defect of vitamin B12 metabolism. *N Engl J Med.* 2008; 358:1454-64.
- Cornejo V, Raimann E. Errores innatos del metabolismo de los aminoácidos. In: Colombo C, Cornejo V, Raimann E. editores. Errores inatos em el metabolismo del niño. 2^a ed. Santiago de Chile: Editorial Universitaria; 2003; 92-8.
- D'Angio CT, Dillon MJ, Leonard JV. Renal tubular dysfunction in methylmalonic acidemia. *Eur J Pediatr.* 1991; 150:259-63.
- de Mello CF, Beghini J, Jiménez-Bernal RE, Rubin MA, de Bastiani J, da Costa E Jr, Wajner M *Brain Res.* 1996; 721:120-25.
- Dionisi-Vici C, Deodato F, Roschinger W, Rhead W, Wilcken B. Classical' organic acidurias, propionic aciduria, methyl- malonic

- aciduria and isovaleric aciduria: long-term outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis.* 2006; 29:383-9.
- Dobson CM, Wai T, Leclerc D, Kadir H, Narang M, Lerner-Ellis JP, Hudson TJ, Rosenblatt DS, Gravel RA. Identification of the gene responsible for the cblB complementation group of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. *Hum Mol Genet.* 2002a; 11:3361-9.
- Dobson CM, Wai T, Leclerc D, Wilson A, Wu X, Doré C, Hudson T, Rosenblatt DS, Gravel RA. Identification of the gene responsible for the cblA complementation group of vitamin B12-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002b; 99:15554-9.
- Donaldson J, St-Pierre J, Minich J, Barbeal A. Seizures in rats associated with divalent cation inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase. *Can. J. Biochem.* 1977; 49:1217-24.
- Dündar H, Özgül RK, Güzel-Ozantürk A, Dursun A, Sivri S, Aliefendioğlu D, Coşkun T, Tokatli A. Microarray based mutational analysis of patients with methylmalonic acidemia: identification of 10 novel mutations. *Mol Genet Metab.* 2012;106:419-23.
- Dutra JC, Wajner M, Wannmacher CM, Wannmacher LE, Pires RF, Rosa-Júnior A. Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. *Braz J Med Bio Res.* 1991; 24:595-605.
- Easton A, Douchamps V, Eacott M, Lever C. A specific role for septohippocampal acetylcholine in memory? *Neuropsychologia.* 2012; *in press.*
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; 7:88-95.
- Erecinska M; Silver IA. Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 1994; 43:37-71.
- Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001; 2165-93.
- Figuera MR, Queiroz CM, Stracke MP, Brauer MCN, González-Rodríguez LL, Frussa-Filho R, Wajner M, Mello CF. Ascorbic acid and α -tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. *Neuroreport.* 1999; 10:2039-43.
- Fleck J, Ribeiro MC, Schineider CM, Sinhorin VD, Rubin MA, Mello CF. Intraatrial malonate administration induces convulsive behavior in rats. *J Inher Metab Dis.* 2004; 27:211-9.

- Fontella F, Pulronick V, Gassen E, Wannmacher CMD, Klein AB, Wajner M, Dutra-filho CS. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport*. 2000; 11:541-4.
- García-Ayllón MS, Cauli O, Silveyra MX, Rodrigo R, Candela A, Campañ A, Jover R, Pérez-Mateo M, Martínez S, Felipo V, Sáez-Valero J. Brain cholinergic impairment in liver failure. *Brain*. 2008; 131:2946-56.
- Geering K. Subunit assembly and functional maturation of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Membrane Biol*. 1990; 155:109-21.
- Gregg VA, Milligan LP. In vitro energy costs of Na⁺, K⁺-ATPase activity and protein synthesis in muscle from calves differing in age and breed. *Br J Nutr*. 1982; 48:65-71.
- Herlenius E, Lagercrantz H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology* 2004; 190:S8-S21.
- Hoffmann GF; Meier-Augenstein W; Stocker S; Surtees R; Rating D; Nyhan WL. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluids. *J Inher Metab Dis*. 1993; 16:648-66.
- 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; 62:225-30.
- Jansen R, Kalousek F, Fenton WA, Rosenberg LE, Ledley FD. Cloning of full-length methylmalonyl-CoA mutase from a cDNA library using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 1989; 4:198-205.
- Jones DH, Matus AI. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta*. 1974; 356:276-87.
- Keseler IM, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Ingraham J, Paley S, Paulsen IT, Peralta-Gil M, Karp PD. EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33:334-7.
- Khishna S, Andersson AM, Semsey S, Sneppen K. Structure and function of negative feedback loops at the interface of genetic and metabolic networks. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34:2455-62.
- Killorn E, Lim RK, Rieder M. Apparent elevated creatinine after ingestion of nitromethane: interference with the Jaffe reaction. *Ther Drug Monit*. 2011; 33:1-2.
- Kölker S, Schwab M, Hörster F, Sauer S, Hinz A, Wolf NI, Mayatepek E, Hoffmann GF, Smeitink JA, Okun JG. *J Biol Chem*. 2003; 278:47388-93.

- Lehnert W, Sperl W, Suormala T, Baumgartner CR. Propionic acidemia: Clinical, biochemical and therapeutic aspects. Experience in 30 patients. *Eur J Pediatr*. 1994; 153:68-80.
- Lerner-Ellis JP, Dobson CM, Wai T, Watkins D, Tirone JC, Leclerc D, Doré C, Lepage P, Gravel RA, Rosenblatt DS. Mutations in the MMAA gene in patients with the cblA disorder of vitamin B12 metabolism. *Hum Mutat*. 2004; 24:509-16.
- Lerner-Ellis JP, Gradinger AB, Watkins D, Tirone JC, Villeneuve A, Dobson CM, Montpetit A, Lepage P, Gravel RA, Rosenblatt DS. Mutation and biochemical analysis of patients belonging to the cblB complementation class of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. *Mol Genet Metab*. 2006; 87:219-25.
- Lingrel JB, Kuntzweiler T. Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biochem Chem*. 1994; 69:196599-662.
- Liu M, Liang Y, Chigurupati S, Lathia JD, Pletnikov M, Sun Z, Crow M, Ross CA, Mattson MP, Rabb H. Acute kidney injury leads to inflammation and functional changes in the brain. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:1360-70.
- Lotti M. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clin. Chem*. 1995; 41:1814-8.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-75, 1951.
- Malfatti CR, Royes LF, Francescato L, Sanabria ER, Rubin MA, Cavalheiro EA, Mello CF. *Epilepsia*. 2003; 44:761-7.
- Marisco PC, Ribeiro MC, Bonini JS, Lima TT, Mann KC, Brenner GM, Dutra-Filho CS, Mello CF. Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBA-RS production. *Experimental Neurology*. 2003; 182:455-60.
- McBride BW, Milligan LP. Influence of feed intake and starvation on the magnitude of Na⁺/K⁺-ATPase (EC 3.6.1.3) - dependent respiration in duodenal mucosa of sheep. *Br J Nutr*. 1985;53:605-14.
- Mclaughlin BA, Nelson D, Silver IA, Erescinska M, Chesselet MF. Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience*. 1998; 86: 279-90.
- Mirandola SR, Melo DR, Schuck PF, Ferreira GC, Wajner M, Castilho RF. Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. *J Inherit Metab Dis*. 2008; 31:44-54.
- Morath MA, Hörster F, Sauer SW. Renal dysfunction in methylmalonic acidurias: review for the pediatric nephrologist. *Pediatr Nephrol*. 2012, *In press*.

- Morath MA, Okun JG, Müller IB, Sauer SW, Hörster F, Hoffmann GF, Kölker S. Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria - A pathophysiological approach. *J Inher Metab Dis*. 2008; 31:35-43.
- Nicolaides P, Leonard J, Surtees R. Neurological outcome of methylmalonic acidemia. *Arch Dis Child*. 1998; 78:508-12.
- 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; 277:14674-80.
- Olgier de Baulny H, Benoist JF, Rigal O, Touati G, Rabier D, Saudubray JM. Methylmalonic and propionic acidemias: management and outcome. *J Inherited Metab Dis*. 2005; 28:415-23.
- Ostergaard E, Wilbrand F, Orngreen BS, Vissing J, Horn N. Impaired energy metabolism and abnormal muscle histology in *mut(-)* methylmalonic aciduria. *Neurology*. 2005; 65:931-3.
- Patel MS, Owen OE, Raefsky C. Effect of methylmalonate on ketone body metabolism in developing rat brain. *Life Sci*. 1976; 19:41-7.
- Peters H, Nefedov M, Sarsero J, Pitt J, Fowler KJ, Gazeas S, Kahler SG, Ioannou PA. *J Biol Chem*. 2003; 278:52909-13.
- Petronilho F, Constantino L, de Souza B, Reinke A, Martins MR, Fraga CM, Ritter C, Dal-Pizzol F. Efficacy of the combination of N-acetylcysteine and desferrioxamine in the prevention and treatment of gentamicin-induced acute renal failure in male Wistar rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24:2077-82.
- Pettenuzzo LF, Ferreira GC, Schmidt AL, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M. Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complex activities in rat tissues. *Inter J Devel Neurosc*. 2006; 24:45-52.
- Pettenuzzo LF, Schuck PF, Wyse AT, Wannamacher CM, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wajner M. Ascorbic acid prevents water maze behavioral deficits caused by early postnatal methylmalonic acid administration in the rat. *Brain Res*. 2003a; 976:234-42.
- Pettenuzzo LF, Wyse AT, Wannamacher CM, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wajner M. Evaluation of the effect of chronic administration of drugs on rat behavior in the water maze task. *Brain Res. Brain Res. Protoc*. 2003b; 12:109-15.
- Ratnakumari L, Qureshi IA, Maysinger D, Butterworth RF. Developmental deficiency of the cholinergic system in congenitally

- hyperammonemic mice: effect of acetyl-L-carnitine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 274: 437-43.
- Ribas GS, Manfredini V, Mari JF De, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, Sitta A, Deon M, Wajner M, Vargas CR. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of l-carnitine supplementation. *Int J Dev Neurosci.* 28:127-132, 2010.
- Ribeiro LR, Figuera MR, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ferreira AP, Saraiva AL, Souza MA, Lima FD, Magni DV, Dezengrini R, Flores EF, Butterfield DA, Ferreira J, dos Santos AR, Mello CF, Royes LF. Methylmalonate-induced seizures are attenuated in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Int J Dev Neurosci.* 2009; 27:157-63.
- Royes LF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, Da Silva LG, Malfatti CR, Schneider PH, Braga A, Wajner M, Mello CF. Creatine protects against the convulsive behavior and the lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience.* 2003; 118:1079-90.
- Salgado H, Santos-Zavaleta A, Gama-Castro S, Millan-Zarate D, Diaz-Peredo E, Sanchez-Solano F, Perez-Rueda E, Bonavides-Martinez C, Collado-Vides J, Regulon DB. Regulon DB (version 3.2): transcriptional regulation and operon organization in *Escherichia coli* K-12. *Nucl Acids Res.* 2001; 29:72-4.
- Saudubray JM, Berghe GVD, Walter JH. Inborn metabolic diseases. Diagnosis and Treatment. 5^a ed. Germany: Springer; 2012.
- Schulpis KH, Kalimeris K, Bakogiannis C, Tsakiris T, Tsakiris S. The effect of in vitro homocystinuria on the suckling rat hippocampal acetylcholinesterase. *Metab Brain Dis.* 2006; 21:21-8.
- Scriver CR, Beaudet A, Sky WS, Valale D. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8^a ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- Srinivas KW, Want MA, Freigoun OS, Balakrishna N. Methylmalonic acidemia with renal involvement: a case report and review of literature. *Saudi J Kidney Dis Transplant.* 2001; 12:49-53.
- Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science.* 1991; 253:872-9.
- Thomas E. A study of the response to protein-modified diets for propionic acidemia in twelve patients. *Brain and Development.* 1994; 16:58-63.

- Tsakiris S, Deliconstantinos G. Influence of phosphatidylserine on (Na^+ + K^+)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes. *Biochem. J.* 1984; 220:301-7.
- Tsakiris S, Schulpis KH, Tjamouranis J, Michelakakis H, Karikas GA. Reduced acetylcholinesterase activity in erythrocyte membranes from patients with phenylketonuria. *Clin. Biochem.* 2002; 35:615-9.
- Van Calcar SC; Harding CO; Lyne P; Hogan K; Banerjee R; Sollinger H; Rieselbach RE; Wolff JA. Renal transplantation in a patient with methylmalonic acidemia. *J Inher Metab Dis.* 1998; 21:729-37.
- Van Der Meer SB, Poggi F, Spada M, Bonnefont JP, Orgier H, Hubert P, Depondt E, Rapport D, Rabier D, Charpentier C, Parvy P, Bardet J, Kamoun P, Saudubray JM. Clinical outcome of long-term management of patients with vitamin B12 unresponsive methylmalonic acidemia. *J Pediatr.* 1994; 125: 903-8.
- Wajner M, Coelho JC. Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production. *J Inherited Metab Dis.* 1997; 20:761-8.
- Wajner M, Vargas CR, Burin M, Giugliani R, Coelho JC. Investigação de erros inatos do metabolismo. *Revista HCPA.* 2001; 3:343-60.
- Whittan R. The dependence of the respiration of brain cortex on active cation transport. *Biochem J.* 1962; 82:205-12.
- Worgan LC, Niles K, Tirone JC, Hofmann A, Verner A, Sammak A, Kucic T, Lepage P, Rosenblatt DS. Spectrum of mutations in mutant methylmalonic acidemia and identification of a common Hispanic mutation and haplotype. *Hum Mutat.* 2006; 27:31-43.
- Wyse AT, Streck EL, Barros SV, Brusque AM, Zugno AI, Wajner M. Methylmalonic administration decreases Na^+ , K^+ -ATPase activity in cerebral cortex of rats. *NeuroReport.* 2000; 11:2331-34.
- Wyse ATS, Bolognesi G, Brusque AM, Wajner M, Wannmacher CMD. Na^+ , K^+ -ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. *Med Sci Res.* 1995; 23:261-2.
- Wyse ATS, Brusque AM, Silva CG. et al. Inhibition of Na^+ / K^+ -ATPase from brain cortex by propionic acid. *Neuroreport.* v. 9, p. 17179-1721, 1998.
- Yang X, Sakamoto O, Matsubara Y, Kure S, Suzuki Y, Aoki Y, Suzuki Y, Sakura N, Takayanagi M, Iinuma K, Ohura T. Mutation analysis of the MMAA and MMAB genes in Japanese patients with vitamin B(12)-responsive methylmalonic acidemia: identification of a prevalent MMAA mutation. *Mol Genet Metab.* 2004; 82:329-33.

Zugno AI, Pereira LO, Mattos C, Scherer EBS, Netto C.A., Wyse ATS. Guanadinoacetato administration increases acetylcholinesterase activity in striatum of rats and impairs retention of an inhibitory avoidance task. *Metab Brain Dis.* 2008; 23:189-98.