



**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MICHELE MANZON COELHO GOEDERT

**EFEITOS DA VITAMINA D EM CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM UM
MODELO ANIMAL DA DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO**

**CRICIÚMA
2023**

MICHELE MANZON COELHO GOEDERT

**EFEITOS DA VITAMINA D EM CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM UM
MODELO ANIMAL DA DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC - para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emílio Luiz Streck

**CRICIÚMA
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

G594e Goedert, Michele Manzon Coelho.

Efeitos da vitamina D em citocinas
inflamatórias em um modelo animal da Doença da
Urina do Xarope do Bordo / Michele Manzon Coelho
Goedert. - 2024.

47 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Ex-
tremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, Criciúma, 2024.

Orientação: Eduardo Pacheco Rico.

1. Vitamina D - Uso terapêutico. 2. Doença da
Urina do Xarope de Bordo - Tratamento. 3. Neu-
roinflamação. I. Título.

CDD 23. ed. 615.328

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



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 430

Com início às 10 (dez) horas do dia 02 (dois) de fevereiro de 2024 (dois mil e vinte e quatro), realizou-se, na Sala 227/Bloco S, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **MICHELE MANZON COELHO GOEDERT**, sob a orientação do **Prof. Dr. Emilio Luiz Streck**, intitulada **“EFEITOS DA VITAMINA D EM PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS EM UM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO”**. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Prof. Dr. Guilhian Leipnitz (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 12h (doze) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 02 (dois) de fevereiro de 2024 (dois mil e vinte e quatro).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Samiris Albano Pereira
Secretária

Dissertação elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biomedicina Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Dedico esta pesquisa à memória dos meus amados e sagrados pais, Ledir e Gilberto, cujo amor e apoio moldaram meu caminho. E ao grande amor da minha vida, meu querido Gilberto, que sempre esteve ao meu lado, inspirando-me a alcançar os meus sonhos. Esta pesquisa é uma expressão do amor, gratidão e comprometimento que tenho por vocês.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que desempenharam um papel fundamental no meu percurso até a conclusão desta etapa da minha vida.

Primeiramente, agradeço a Deus, a Jesus e a toda a Espiritualidade de Luz, assim como aos meus anjos de guarda, por sua iluminação constante ao longo desta jornada: sinto-me profundamente grata por sua orientação divina que me conduziu por esse caminho.

Quero fazer uma referência muito especial de gratidão a minha Mentora Maria Ignez Figueiredo que, desde 2018, faz parte da minha vida e me guia lindamente pelos caminhos do bem, ensinando-me a cada dia mais sobre o amor incondicional. Ela chegou em minha vida num dos momentos em que eu mais estava debilitada e precisei de forças para seguir adiante.

A Família CELE e TERRA DO SOL são muito especiais e fazem parte da minha vida. Com seu encanto e beleza, eles me trazem, a cada amanhecer, um entusiasmo novo para a realização deste projeto.

Quero agradecer também em especial aos amados e sagrados pais Ledir e Gilberto (em memória), principalmente pelo seu grande exemplo de vida, de conduta pautada em valores divinos, valores de amor, fé, força e coragem. Meu pai, mesmo doente, sempre esteve muito ativo e lucido quanto as minhas atividades do mestrado.

Agradeço também pelo meu grande amor Gilberto, pela força, dedicação, carinho, companheirismo, amor e pela amizade. Ele me ensina a cada dia mais, o verdadeiro caminho a seguir. Obrigada meu amor por ter me oportunizado chegar até aqui. Obrigada pela coragem que me deste a partir da tua fé, me direcionando e caminhando comigo, lado a lado, para o sucesso de todos os meus desafios.

Agradeço a minha irmã Karen, ao meu cunhado Pablo e aos meus dois amores, Davi Miguel e Pedro Inácio, meus sobrinhos queridos, por entenderem minha ausência.

Agradeço a minha amada amiga Mentora Mareli pelas orientações e ensinamentos. À minha querida colega e amiga enfermeira Rosane por sua disponibilidade e ajuda e acolhida incondicional em todos os momentos desta caminhada, principalmente nos mais difíceis.

E como não poderia deixar de mencionar, meus queridos colegas enfermeiros Aline, Ana Paula e Cleber, fiéis e inseparáveis desde os nossos encontros em Brusque até nossas idas para Criciúma, dando-me forças para continuar a trajetória com garra e vontade, para que conseguisse chegar ao meu objetivo com muita alegria a sucesso.

Aos colegas de turma pelo apoio mútuo e por compartilharem suas experiências e expectativas.

Em especial à minha equipe de trabalho na Unidade de Saúde, por dar andamento nas atividades com os usuários mesmo nas minhas ausências, conduzindo tudo da melhor maneira possível.

Ao meu querido Orientador Professor Emílio, por ter acreditado em mim, pelo companheirismo, pelos ensinamentos, pelo carinho, pelo exemplo, pela conduta fantástica que teve comigo, e por tudo o que fez para que eu chegasse até aqui.

À Isabela, pela aprendizagem, carinho, dedicação e companheirismo durante os experimentos e pesquisas. A todos os alunos companheiros do Mestrado, doutorado e pós-doutorado, alunos de Iniciação Científica que se disponibilizaram em me ajudar nos experimentos, à Micaela e a Pauline pela atenção e carinho.

À parceria das universidades UNIFEBE E UNESC que nos oportunizaram a realização deste curso.

À Secretaria de Saúde pela que nos possibilitou a qualificação profissional.

RESUMO

A Doença da Urina de Xarope de Bordo (DXB) é um erro inato do metabolismo (EIM) onde ocorre o acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e de seus α -cetoácidos de cadeia ramificada. Seu acúmulo leva à toxicidade no organismo devido a estes AACR atravessarem a barreira hematoencefálica (BHE) gerando danos cerebrais como encefalopatia nas primeiras semanas de vida, edema cerebral e desmielinização com lesão cerebral crônica. A inflamação tem sido considerada fator de risco para doenças neurodegenerativas, onde marcadores inflamatórios se relacionam cada vez mais com declínio cognitivo e demência. Estudos anteriores demonstram que processos inflamatórios possuem papel importante na fisiopatologia dos EIM, sendo demonstrado que pacientes que possuem DXB, tratados com dieta restritiva, possuem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, mostrando que mecanismos imunológicos podem estar associados a fisiopatologia da DXB. Dessa forma, a vitamina D (Vit. D), já conhecida por sua função de homeostase osteomineral, atua em diversos tecidos, sendo apontada como tendo potencial efeito de neuroproteção, e sua deficiência apontada como um componente importante no desenvolvimento de doenças do sistema neurológico. A presente pesquisa, de cunho experimental, objetivou avaliar os efeitos da Vit. D sobre parâmetros inflamatórios, sendo avaliados pelos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) no córtex cerebral de animais submetidos a um modelo de DXB. Para isso, foram utilizados ratos *Wistar* machos, divididos em 4 grupos: controle, DXB, Vit. D e DXB + Vit. D. Com relação aos resultados encontrados, identificou-se aumento estatisticamente significativo quanto ao TNF- α no grupo DXB + Vit. D comparado com os grupos salina controle e DXB controle. Já nas citocinas IL-1 β e IL-6, foi observado um aumento nos grupos vit. D e DXB controle comparados com o grupo controle, bem como aumento no grupo DXB + Vit. D quando comparado com os grupos controle e DXB. O presente estudo aponta informações que corroboram com a atividade inflamatória aumentada na presença da DXB e aponta necessidade de maiores estudos em torno da ação da Vit. D, para melhor análise e entendimento de seus efeitos na DXB.

Palavras-chave: Doença da Urina do Xarope de Bordo; Vitamina D; Neuroinflamação.

ABSTRACT

The Maple Syrup Urine Disease (MSUD) is an inborn error of metabolism (IEM) characterized by the accumulation of branched-chain amino acids (BCAA) and their corresponding branched-chain α -ketoacids. This accumulation leads to organism toxicity as these BCAAs cross the blood-brain barrier (BBB), causing brain damage such as encephalopathy in the early weeks of life, cerebral edema, and demyelination with chronic brain injury. Inflammation has been considered a risk factor for neurodegenerative diseases, where inflammatory markers are increasingly associated with cognitive decline and dementia. Previous studies demonstrate that inflammatory processes play a crucial role in the pathophysiology of IEMs. It has been shown that patients with MSUD, treated with a restrictive diet, exhibit high levels of pro-inflammatory cytokines, indicating that immunological mechanisms may be associated with MSUD pathophysiology. Thus, Vitamin D (Vit. D), known for its role in osteomineral homeostasis, acts in various tissues and is suggested as an important component in the development of immune system diseases and as a potential neuroprotective agent. This experimental study aimed to evaluate the effects of vitamin D on inflammatory parameters measured by the levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin 1 beta (IL-1 β), and interleukin 6 (IL-6) in the cerebral cortex of animals subjected to an MSUD model. Wistar rats were divided into four groups: control, MSUD, Vit. D, and MSUD + Vit. D. Regarding the results, we identified an increase in TNF- α in MSUD + vit. D compared to the control and MSUD control groups. For cytokines IL-1 β and IL-6, we observed an increase in the vit D and MSUD control groups compared to the control and also an increase in MSUD + vit. D compared to the control and MSUD control groups. This study provides information that corroborates the increase in inflammatory activity in MSUD and points out that more studies related to the action of vitamin D are needed to better understand its effects on MSUD.

Keywords: Maple Syrup Urine Disease; Vitamin D; Neuroinflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Metabolismo dos AACR	13
Figura 2 – Metabolismo Vitamina D	20
Figura 3 - Esquema experimental	25
Figura 4 – Efeito da vitamina D sobre TNF- α no córtex cerebral de ratos expostos a um modelo de DXB	28
Figura 5 – Efeito da vitamina D sobre IL-1 β no córtex cerebral de ratos expostos a um modelo de DXB	28
Figura 6 – Efeito da vitamina D sobre IL-6 no córtex cerebral de ratos expostos a um modelo de DXB	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACR - Aminoácidos de Cadeia Ramificada
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHE - Barreira Hematoencefálica
CDCCR - Complexo Alfa-Cetoácido Desidrogenase de Cadeira Ramificada
CEUA - Comitê de Ética para o Uso de Animais
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DXB - Doença da Urina do Xarope de Bordo
EIM - Erros Inatos de Metabolismo
FTC β - Fator Transformador de Crescimento β
IFN- γ - Interferon- γ
IL- 1 β – Interleucina 1 Beta
IL-6 – Interleucina-6
IL-10 - Interleucina-10
LPS - Lipopolissacarídeo
MMPs - Metaloproteinases de matriz
NK – Células Natural Killer
PNTN - Programa Nacional de Triagem Neonatal
TCE - Traumatismo Cranioencefálico
TNF – Fator de Necrose Tumoral
VDR – Receptor de vitamina D (do inglês *Vitamin D Receptor*).
Vit. D – Vitamina D

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	13
1.2 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DE BORDO	14
1.3 RESPOSTA INFLAMATÓRIA E DXB	19
1.4 VITAMINA D E SUAS FUNÇÕES ANTIINFLAMATÓRIAS	21
1.5 JUSTIFICATIVA	24
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS	26
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL	26
3.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO	27
3.4 DESCARTE DE RESÍDUOS	28
3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	28
3.5.1 Dosagem de proteínas	28
3.5.2 Parâmetros de Inflamação	29
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4 RESULTADOS	30
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DE METABOLISMO

Erros inatos de metabolismo (EIM) são doenças de natureza genética que envolvem a deficiência de alguma via metabólica, causando falha da síntese, degradação, armazenamento e/ou transporte destas moléculas envolvidas e que leva ao mau funcionamento do metabolismo e/ou ao acúmulo de metabólitos intermediários tóxicos (El Husny e Fernandes-Caldato, 2006; Mak et al., 2013; Romão et al., 2017).

O termo EIM foi citado pelo médico inglês Archibald Garrod em 1909 em seu livro com o mesmo nome. No livro, Garrod descreve casos de indivíduos que apresentavam na urina grandes quantidades do ácido homogentísico levando ao EIM chamado alcaptonúria que foi identificado em 1908. Ainda, descreve doenças como o albinismo, porfiria e pentosúria. A partir da investigação e descrição destas doenças, Garrod identificou sua correlação com alterações genéticas e observou que estas doenças eram transmitidas segundo as Leis de Mendel, dando então início à genética bioquímica (Garrod, 1996; Souza, 2002).

Os EIM são classificados em duas categorias de acordo com as alterações encontradas, sendo a classificação mais utilizada a descrita por Saudubray e Charpentier em 1995: Categoria 01: aqueles que envolvem alterações em um único sistema orgânico ou órgão, que normalmente tem sintomas mais específicos, de identificação mais facilitada. A Categoria 02 inclui as doenças cujo defeito metabólico compromete uma via metabólica que envolve diversos órgãos e que apresentam manifestações sistêmicas diversas. A Categoria 02, por apresentar diversidade sistêmica de manifestações, ainda são divididas em três grupos, conforme se apresentam suas características de fenótipo e de fisiopatologia: o Grupo I é composto por aquelas que apresentem distúrbios da síntese de moléculas complexas; o Grupo II aquelas que geram acúmulo de metabólitos intermediários e geram toxicidade aguda e/ou crônica e, por fim, o Grupo III é composto por aquelas que apresentam deficiência na produção e/ou uso de energia para seus processos metabólitos (Araújo, 2004).

A manifestação clínica dos EIM é variável e correlacionada diretamente com a rota metabólica afetada. As crianças portadoras de muitos EIM, como aqueles

de manifestação aguda, parecem perfeitamente normais ao nascimento. A sintomatologia habitualmente é percebida quando há alteração do equilíbrio bioquímico mantido até o momento pelo indivíduo e normalmente já ocorre nos primeiros dias, semanas, meses e em alguns casos anos de vida de uma criança. Variam de sintomas leves à graves e apresentam sintomas muitas vezes inespecíficos, como letargia, recusa alimentar, icterícia, vômitos, diarreia, retardo de crescimento, alterações do desenvolvimento psicomotor, sintomas inclusive muito associados a outros diagnósticos como doenças infecciosas. Alguns EIM também apresentam sintomatologia discreta, de difícil percepção (Herber et al., 1996; Levin, 1999).

As Diretrizes para Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras do Ministério da Saúde, em 2014, apontam um aumento destas doenças para 550 e estima que no país tenham 3000 novos casos de EIM a cada ano (Brasil, 2014). Ainda, quanto ao diagnóstico e acompanhamento, no Brasil, o Sistema Único de Saúde criou em 06 de junho de 2001 o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), o qual em 2014 atingia cerca de 84% dos recém-nascidos no país e que, gratuitamente, através do Teste do Pezinho identifica e dá seguimento ao acompanhamento dos portadores dos seguintes EIM: fenilcetonúria e deficiência de biotina (Brasil, 2016). Os demais EIM são identificados apenas no teste do pezinho do sistema privado e/ou por testes genéticos ofertados dentro do PNTN.

1.2 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DE BORDO

A DXB é considerada um EIM e foi descrita pela primeira vez em 1954 por Menkes como uma doença neurodegenerativa de início rápido. É causada por um defeito no metabolismo no que concerne à atividade do complexo alfa-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR). Este complexo é responsável pela degradação dos AACR: leucina, isoleucina e a valina (Edelmann et al., 2001; Strauss e Morton, 2003). O defeito é transmitido em um padrão autossômico recessivo (Edelmann et al., 2001).

A análise do soro e da urina de pacientes com os mesmos sintomas em 1957, realizada por Westall, Dancis e Miller, demonstrou o aumento de três AACR, leucina, isoleucina e valina. Já em 1959, Menkes isolou os alfacetoácidos destes AACR, α -cetoisocapróico, ácido α -ceto- β -metil valérico e ácido α -cetoisovalérico na urina e no plasma de pacientes. O acúmulo de AACR e cetoácidos presente em

pacientes com a DXB é causado pela deficiência da atividade do CDCCR, responsável pelo processo de metabolismo dos AACR (Menkes, 1959). A Figura 1 esquematiza a fisiopatologia da DXB:

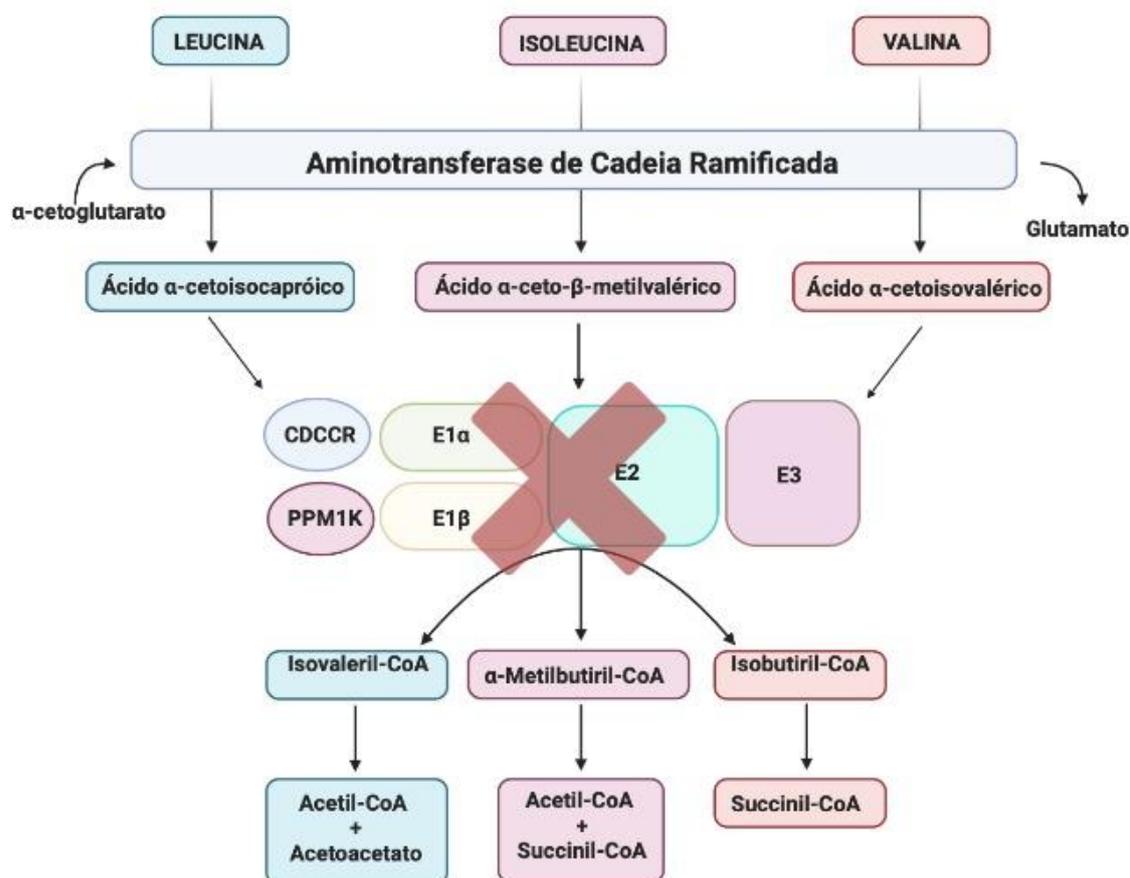


Figura 1 – Metabolismo dos AACR - Os aminoácidos são transaminados em seus α -cetoácidos pela aminotransferase de cadeia ramificada, estes passam por uma descarboxilação oxidativa catalisada pelo CDCCR. Fonte: Adaptado de Blackburn et al., 2017.

Estima-se uma incidência aproximada de 01 caso para cada 185.000 nascidos vivos, que afeta tanto homens como mulheres e há uma incidência maior em indivíduos nascidos de pais com consanguinidade (Edelmann et al., 2001; Strauss e Morton, 2003). No Brasil o único estudo encontrado acerca do perfil da DXB aponta incidência aproximada de 01 caso para cada 100.000 nascidos vivos (Herber et al., 2015).

A descoberta inicial da DXB ocorreu por volta de 1954 pelo neurologista pediátrico austríaco-americano Menkes, que descreveu no mesmo ano a observação de alterações neurodegenerativas em 04 pessoas da mesma família, onde os sintomas iniciaram na primeira semana de vida e todos foram a óbito nos 3 primeiros

meses de vida. Cabe destaque à sintomatologia em que Menkes observou a presença de odor da urina semelhante ao xarope de bordo: odor adocicado, parecido com açúcar queimado/caramelo, o que deu origem do nome da DXB (Menkes, 1954).

Em bebês que apresentam a doença, já nas primeiras 48 horas de vida, podem ser observados sintomas e achados de cetonúria, dificuldades alimentares e irritabilidade, evoluindo para, com aproximadamente 5 dias de vida, a progressão e desenvolvimento dos danos neurológicos, apresentando letargia, irritabilidade, apneia e, em alguns casos, o odor na urina característico da doença (Strauss e Morton, 2003; Hassan e Gupta, 2022). Por volta dos 7 a 10 dias de vida, caso o paciente não seja tratado, costuma evoluir para coma e insuficiência respiratória, podendo levar a óbito. Nos casos mais leves da doença, aqueles que não evoluem para óbito, costumam desenvolver sinais de atraso no desenvolvimento neurológico, como atraso dos marcos de desenvolvimento neuropsicomotor (deficiência cognitiva, alterações motoras) e atrofia cerebral (Chuang e Shih, 2001; Hassan e Gupta, 2022).

Estas manifestações clínicas são variáveis de acordo com os subtipos da doença e são definidas pelos diferentes fenótipos, que vão estar correlacionados com diferenças no defeito da atividade enzimática. Estes fenótipos são classificados em: forma clássica, intermediária, intermitente, responsivo à tiamina e subtipos de deficiência de lipoamida desidrogenase E3. Clinicamente, estes fenótipos são diferenciados a partir da idade de início, apresentação clínica e da atividade residual do CDCCR (Edelmann et al., 2001; Blackburn, 2017).

No fenótipo clássico, aproximadamente até 2% da atividade do CDCCR é mantida, o que pode ser detectado nas primeiras horas de vida. Além disso, pode ocorrer a presença de um odor semelhante a xarope de bordo no cerúmen e na urina durante a primeira semana de vida. Quando não ocorre a identificação e tratamento precoce, podem desenvolver irritabilidade, má alimentação, letargia, apneia intermitente, opistótono e movimentos de bicicleta, coma e óbito. Em bebês e crianças há presença de náuseas, anorexia, distonia e ataxia. Em crianças maiores, há presença de comprometimento cognitivo, hiperatividade, distúrbios do sono, alucinações, distonia focal, coreoatetose e ataxia (Levin et al., 1993; Strauss et al., 2010; Blackburn, 2017). Nesta forma, há elevação de AACR e aloisoleucina no plasma, bem como elevação de alfa-cetoácidos de cadeia ramificada na urina (Blackburn, 2017). Esta é a forma mais prevalente, observada em cerca de 80% dos casos, e é considerada a mais grave (Chuang et al., 2019).

A forma intermediária por sua vez, tem sintomas iniciados por volta dos 5-7 meses de vida, com sinais e sintomas semelhantes à forma clássica, porém com sintomatologia menos grave, podendo apresentar odor do xarope de bordo no cerúmen e na urina e, em crianças maiores, problemas de alimentação e crescimento deficiente. Os indivíduos com esta forma têm cerca de até 30% da atividade da CDCCR (Chuang e Shih, 2001; Chuang et al., 2019).

Os pacientes com DXB com o fenótipo intermitente, por sua vez, possuem em sua maioria crescimento e desenvolvimento neurológico normais, porém em situações de estresse podem apresentar encefalopatia, bem como apresentam AACR normais quando os pacientes se encontram estáveis. Quando em situações de estresse, a sintomatologia e marcadores bioquímicos costumam ser semelhantes à forma clássica (Chuang e Shih, 2001; Strauss et al., 2010).

A DXB, quando na sua forma responsiva à tiamina, apresenta as manifestações clínicas de maneira branda e rara. Apresentam cerca de 2 a 40% da atividade enzimática presente. Os indivíduos que têm este fenótipo apresentam sintomas semelhantes à forma intermediária, podendo apresentar atraso no desenvolvimento físico e motor, intolerância a alimentos com proteína, piora neurológica na vigência de febre ou infecções, baixo peso, vômitos, além de cetoacidose, apesar deste último ser uma complicação com pouca frequência (Chuang e Shih, 2001; Chuang et al., 2004).

O fenótipo de subtipos de deficiência de lipoamida desidrogenase E3, considerado o mais raro dos fenótipos da DXB, possui como alteração bioquímica e enzimática elevação dos AACR, da aloisoleucina, aumento de lactato, piruvato e alanina no plasma, e alfa-cetoácidos de cadeia ramificada elevados e α -cetogluturato na urina (Chuang e Shih, 2001). Esta forma ainda apresenta como sintomatologia neurológica já de início precoce: hipotonia, atraso no desenvolvimento, êmese, hepatomegalia, letargia, convulsões, espasticidade, síndrome de Leigh, retardo de crescimento, além de fenótipo hepático: náusea, êmese, hepatomegalia, encefalopatia hepática (Chuang e Shih, 2001).

Em todas suas formas, a atividade enzimática estará relacionada diretamente ao defeito genético, porém não exclusivamente, pois o fenótipo da doença estará diretamente relacionado a fatores como ingestão calórica, proteica, infecções, estresse e crescimento (Chuang e Shih, 2001; Strauss et al., 2010).

O diagnóstico da DXB, normalmente, é solicitado a partir da presença de manifestações clínicas sugestivas da doença, na presença de história familiar prévia e/ou na triagem positiva para DXB (Chuang e Shih, 2001; Strauss et al., 2006). A triagem neonatal para DXB, ainda não ofertada pelo SUS, está disponível na rede privada pelo Teste do Pezinho Ampliado, o qual permite identificar a DXB por meio de espectrometria de massa em tandem (MS/MS), enquanto o paciente ainda está assintomático, favorecendo o início do tratamento precoce (Simon et al., 2006).

A confirmação diante de sintomatologia clínica ou teste de triagem alterado é realizada laboratorialmente através de dosagens quantitativas dos aminoácidos séricos e urinários. Especialmente, dosagem de concentrações plasmáticas de leucina, isoleucina e valina, bem como seus respectivos alfa-cetoácidos (Chuang et al., 2006; Wajner e Vargas, 2002).

Uma vez diagnosticada, a DXB é tratada através de terapia nutricional, a qual deve ser iniciada o mais precoce possível, restringindo os AACR da dieta do indivíduo (Strauss e Morton, 2003; Serra et al., 2010). No que concerne à terapia nutricional, associada à dieta, pode haver a indicação de suplementação via nutrição enteral composta por aminoácidos restritos em leucina, isoleucina e valina, combinados com glicose, lipídeos e vitaminas, visando melhorar os quadros de descompensação nutricional (Rogers et al., 1962; Wendel et al., 1982; Ramon e Jauregui, 2005). Em estágios agudos e graves da doença, a hemofiltração e diálise são opções exógenas de tratamento (Nelson e Cox, 2013). Algumas pesquisas têm apontado o transplante de fígado como opção viável e razoável em termos de eficácia global e proteção contra a progressão da doença (Strauss et al., 2006; Skvorak, 2009; Friedrich et al., 2012). O transplante hepático pode aumentar em cerca de 10% da atividade do CDCCR no organismo, valor este sendo considerado suficiente para manter o equilíbrio, aumentando a tolerância do paciente à ingestão mínima de proteínas e, associado à dieta, evitar a descompensação da doença e melhorar o padrão de ingesta nutricional seguro ao paciente (Strauss et al., 2016).

1.3 RESPOSTA INFLAMATÓRIA E DXB

A resposta inflamatória representa uma resposta adaptativa ao dano tecidual, visando a restauração do tecido e sua homeostase (Parkin e Cohen, 2001; Okin e Medzhitov, 2012). Okin e Medzhitov (2012) descrevem que a resposta inflamatória é heterogênea por natureza, pois pode ser desencadeada por diversos estímulos, incluindo lesões e infecções, e envolve diferentes células e mediadores no processo. A resposta inflamatória gera um alto custo-benefício: pode salvar vidas, porém uma resposta excessiva pode desencadear danos aos tecidos e em suas funções, podendo desencadear doenças neurodegenerativas (Okin e Medzhitov, 2012).

A resposta inflamatória típica caracteriza-se por alguns mecanismos: mecanismo de indução inflamatória, mecanismo sensor (receptores que reconhecem padrões de dano), bem como pelo mecanismo de ativação das vias inflamatórias, liberação de mediadores inflamatórios e o recrutamento celular para o tecido alvo (Medzhitov, 2008; Medzhitov, 2010). Dependendo da natureza dos indutores, as células com sensores irão produzir combinações e quantidades diferentes de mediadores, criando respostas únicas para o estímulo e que poderá variar de acordo com a injúria e tecido afetados (Medzhitov, 2008; Medzhitov, 2010; Chen et al., 2018).

Como mediadores na condução da resposta inflamatória, as citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares produzidas por diversos tipos celulares no local da injúria tecidual, geralmente são produzidas em cascatas (Lin, Calvano e Lowry, 2000; Zhang e Na, 2007). As citocinas são mediadores essenciais para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização adequada da ferida (Lin, Calvano e Lowry, 2000; Sommer e White, 2010). Estas citocinas desempenham funções diversas, influenciando principalmente atividades de diferenciação e proliferação celular, bem como na produção de outras citocinas que podem aumentar (pró-inflamatória) ou atenuar a resposta inflamatória (anti-inflamatória). Citocinas pró-inflamatórias incluem as interleucinas (IL) 1 β , 2, 6, 7 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) enquanto as anti-inflamatórias temos as IL 4, 10 e 13 e o fator transformador de crescimento β (FTC β) (Curfs, Meis e Hoogkamp-Korstanje, 1997, Sommer e White, 2010).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α , produzido principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T, desempenha um papel importante nas funções pró-inflamatórias, sendo também responsável pelo desencadeamento da apoptose celular (Lin, Calvano e Lowry, 2000; Zhang e An, 2007). Usualmente, o TNF- α é um dos mediadores mais precoces da resposta inflamatória, embora tenha uma meia vida plasmática de cerca de 20 minutos, provoca mudanças hemodinâmicas e plasmáticas, além de acionar a produção e outras citocinas da resposta inflamatória (Curfs, Meis e Hoogkamp-Korstanje, 1997). Entre essas ações, pode-se citar a ativação da coagulação, a liberação/expressão de moléculas de adesão, fator ativador de plaquetas, glicocorticóides, estimular a lipólise e influenciar/desencadear a apoptose celular (Curfs, Meis e Hoogkamp-Korstanje, 1997; Raeburn et al., 2022).

A citocina pró-inflamatória IL-1 β , por sua vez, é produzida por macrófagos e monócitos, sintetizada como uma proteína precursora (Pro-IL-1 β) e expressa em neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal (Lin, Calvano e Lowry, 2000; Raeburn et al., 2002; Zhang e An, 2007). Seu mecanismo de atuação ocorre através da ativação da ciclooxigenase-2, produzindo a prostaglandina-E2 no hipotálamo anterior, óxido nítrico (ativando a enzima óxido nítrico sintase e moléculas de adesão endotelial (Raeburn et al., 2002; Zhang e An, 2007; Wolf et al., 2008).

Por sua vez, a IL-6, como citocina pró-inflamatória e anti-inflamatória, é uma glicoproteína secretada por diversos tipos celulares, como macrófagos, linfócitos, monócitos, hepatócitos, glia, eosinófilos, sendo que o TNF- α e a IL- β são potentes indutores da sua expressão (Curfs, Meis e Hoogkamp-Korstanje, 1997; Sommer e White, 2010). A IL-6, enquanto pró-inflamatória, promove a ativação e maturação de neutrófilos, macrófagos e diferenciação de linfócitos-T citotóxicos e células natural *killer* (NK). Além disso, ativa astrócitos e micróglia, regulando a expressão de neuropeptídeos após lesão neuronal, contribuindo para sua regeneração (Curfs, Meis e Hoogkamp-Korstanje, 1997; Lin, Calvano e Lowry, 2000; Raeburn et al., 2002).

Na DXB, alguns estudos sugerem que os danos neurológicos causados na doença tenham correlação com inflamação sustentada e ativação do sistema imunológico (Mescka et al., 2015; Scaini et al., 2018). Vem-se observando que os níveis elevados de AACR aumentam as reações inflamatórias em pacientes e modelos experimentais (Rosa et al., 2016; Scaini et al., 2014; Scaini et al., 2018). Zhenyukh (et al., 2017) apontam, em pesquisa com análise *in vitro*, após administração de 10mmol/L de AACR (valores semelhantes ao de pacientes com DXB), a ativação do

fator nuclear- κ B e genes pró-inflamatórios. Segundo Bridi (et al., 2005), em estudo in vitro demonstrou que a incubação de AACR com córtex de rato estimulou a peroxidação lipídica e atuou na depleção das defesas antioxidantes. Em concordância com estes estudos, Mescka (et al., 2011; Mescka et al., 2016) também evidenciou desequilíbrio entre o dano oxidativo e a defesa antioxidante em ratos que receberam administração repetidamente de AACR por via subcutânea no qual também avaliou dano oxidativo, como peroxidação lipídica e de proteínas significativamente maiores no córtex de ratos modelo DXB em comparação ao grupo controle.

Scaini (et al., 2018) sugere em pesquisa que a inflamação pode desempenhar papel fundamental na fisiopatologia da DXB após investigar níveis de biomarcadores inflamatórios em plasma de 12 pacientes com diagnóstico de DXB e tratados. Nesta pesquisa identificaram que pacientes com dietas restritas em proteínas apresentavam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6). Já em pacientes DXB comparativamente à pacientes saudáveis, não foram identificadas alterações significativas quanto aos níveis plasmáticos de IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8 e IL-10. Embora estudos apontem a correlação dos danos da DXB com fatores inflamatórios a nível neurológico, ainda são poucas pesquisas na área.

1.4 VITAMINA D E SUAS FUNÇÕES ANTIINFLAMATÓRIAS

A descoberta da Vit. D ocorreu juntamente com a elucidação do raquitismo por volta do século XVII, doença caracterizada por perturbações no metabolismo do cálcio e do fósforo e que apresenta alterações físicas, especialmente em ossos e dentes (Silva, 2007). Em 1928, Adolf Windaus conseguiu apresentar sua estrutura química e sua correlação com o tratamento de doenças, em especial o raquitismo (Deluca, 2004; Silva, 2007).

A Vit. D é constituída de um pró-hormônio não esteróide lipossolúvel e, apesar de diferentes formas nutricionais, duas formas são de relevância científica: colecalciferol ou Vitamina D3, originada de fontes animais e considerada a mais importante a nível nutricional e nas funções biológicas e o ergocalciferol ou vitamina D2, que é de origem vegetal e é obtida, principalmente, por exposição solar (Silva, 2007; Wimalawansa, 2012; Lichtenstein et al., 2013).

Ambas as formas são inertes para o organismo humano e precisam ser convertidas para sua forma ativa através de raios solares, mais precisamente dos raios ultravioleta (Kimball, Fuleihan e Vieth, 2008; Castro, 2011; Borges, 2014). A vitamina D₃ é produzida na pele por mediação destes raios Ultravioleta B (UVB), cujo comprimento de onda está na faixa de 290-315nm, convertendo então 7-diidrocolesterol ao precursor da vitamina D₃ chamada pré-vitamina D₃. Este precursor então sofre outra reação não enzimática e produz, na pele, uma isomerização térmica atingindo um pico de Vit. D em 30-60 dias após a exposição solar. Após este período, a vitamina D₃ vai para corrente sanguínea, chegando ao fígado onde é convertida em 25-hidroxivitamina-D₃ ou 25(OH)D₃ (calcidiol) através da família de enzimas do citocromo P450 (Kimball, Fuleihan e Vieth, 2008; Castro, 2011). Então a 25(OH)D₃ é convertida em 1,25-diidroxitamina D ou 1,25(2OH) D₃ (calcitriol) pela enzima mitocondrial CYP27B1-hidroxilase das células epiteliais dos túbulos proximais renais e este metabólito é o que se liga aos receptores teciduais e que irá modular a expressão gênica e ações subsequentes (Castro, 2011; Lichtenstein et al., 2013).

O processo metabólito da Vit. D fica melhor explícito na Figura 2:

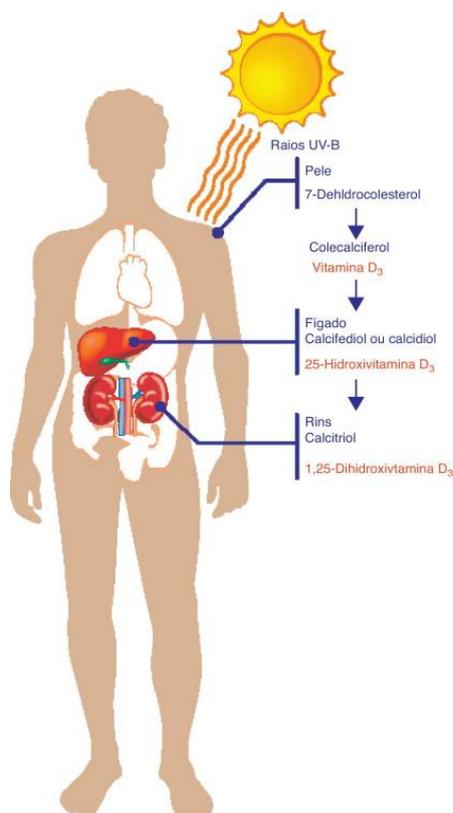


Figura 2 – Metabolismo Vit. D. Fonte: Lichtenstein et al., 2013.

Sabe-se que o papel mais relevante e conhecido da Vit. D até o momento é acerca da homeostase do cálcio e fosfato, que são elementos essenciais no metabolismo e síntese óssea (Castro, 2011; Borges, 2014). Porém, várias são as pesquisas que apontam que, na hipovitaminose da Vit. D, há correlação com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes e doenças neurodegenerativas (Dobnig et al., 2008; Kunadian et al., 2014; Ashtari et al., 2015; Tao et al., 2017; Plantone et al., 2023).

Quanto ao metabolismo osteomineral, o calcitriol atua diretamente no intestino, promovendo a absorção ativa de cálcio na região do duodeno e absorção passiva no jejuno, através da estimulação de proteínas presentes nos enterócitos que, por sua vez, promovem captação de cálcio. Atua também na absorção intestinal de fosfato, envolvendo a ativação de proteínas e fatores de crescimento nas porções do duodeno e jejuno (Castro, 2011).

Quanto às ações não relacionadas ao metabolismo osteomineral, sabe-se que as funções biológicas da Vit. D ocorrem a partir da ligação ao seu receptor de Vit. D (VDR), que está presente no núcleo das células alvo. Esses receptores foram identificados em 36 tecidos, que são capazes de responder fisiologicamente à Vit. D, o que sugere sua correlação fisiológica com diversas patologias, como as já citadas previamente: doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes entre outras (Norman, 2008; Castro, 2011; Schug e Garcia, 2011; Bouillio, 2011). Dentre esses tecidos, pode-se citar a presença de seus receptores nos rins, glândulas paratireóides, intestino, osso, próstata, mama, cólon, pâncreas, células do sistema imune, cérebro, tecido muscular entre outros (Schug e Garcia, 2011; Bouillio, 2011).

A deficiência de Vit. D está associada à pesquisas em diversas áreas e diferentes comorbidades. Dentre elas vem associando-se a hipovitaminose D a condições imunológicas como a esclerose múltipla, Diabetes Mellitus tipo I, artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, também se associa a distúrbios de humor e alguns cânceres, sendo que estas são associações, porém não estabelecem relação causal (Misra, 2013).

Mais especificamente no sistema imunológico Hewison (2010a) descreve que a 1,25 (OH)₂D apresenta papel imunorregulatório autócrino em várias células (CD4⁺, CD8⁺, Linfócitos T e células apresentadoras de antígenos). O autor ainda aponta que a 1,25 (OH)₂D participa da regulação das células precursoras em células mais especializadas do sistema monocítico-macrofágico. Em concentrações baixas

de 25(OH)D, o sistema imunológico favorece o desenvolvimento de células T autorreativas direcionadas contra os próprios tecidos e a síntese de IL-12 e interferon gama que são citocinas pró-inflamatórias, predispondo à um aumento de desenvolver doenças autoimunes (Hewison, 2010b).

No tecido cerebral de camundongos embrionários, Marini (et al., 2010) demonstrou que a ativação dos VDR apresenta ações estimulatórias, crescimento neural e moduladoras do desenvolvimento cerebral. Eyles (et al., 2005) propõe a partir de estudo moleculares que, como várias células do cérebro humano expressam o VDR, a 1,25(OH)₂D exerce ações autócrinas e parácrinas na regulação de funções cerebrais como o sono, emocionais e cognitivas. Porém, pontua que as informações são insuficientes para descrever como este processo ocorreria ou para definir causalidade associada a doenças neurodegenerativas.

1.5 JUSTIFICATIVA

Pacientes com diagnóstico de DXB possuem danos neurológicos, principalmente na cognição e aprendizagem, podendo evoluir para condições mais críticas de saúde, e até mesmo óbito. O acúmulo dos AACR é apontado como fator causal desses danos, pois promove, em estruturas cerebrais, processo de estresse oxidativo e inflamação por longos períodos, levando à hipótese de que a inflamação é um dos fatores de causalidade da fisiopatologia da DXB.

Outro ponto importante é a função da Vit. D no organismo como potencial neuroprotetor, função esta que aponta que a Vit. D tem papel fundamental na prevenção de danos aos tecidos cerebrais, bem como reestabelecimento da homeostase quando suplementada em indivíduos com hipovitaminose. No entanto, sua ação ainda não está totalmente elucidada em diversas doenças.

Dessa forma, pesquisas que envolvam a DXB e Vit. D são escassas. Assim, este projeto de pesquisa buscou aumentar o entendimento acerca da interferência que a Vit. D tem sobre as citocinas do processo inflamatório na DXB. Desta maneira, almejamos contribuir para o estudo de estratégias terapêuticas existentes e sua relação na fisiopatologia da DXB.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos da Vit. D sobre citocinas inflamatórias em um modelo da DXB.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α em animais submetidos a DXB e tratados com Vit. D.
- Avaliar os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 β em animais submetidos a DXB e tratados com Vit. D.
- Avaliar os níveis da citocina pró-inflamatória e anti-inflamatória IL-6 em animais submetidos a DXB e tratados com Vit. D.

3. METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

No presente experimento optou-se pelo uso de ratos da espécie *Rattus norvegicus* (ratos *Wistar*), devido a DXB ser uma doença rara, de difícil acesso aos pacientes para fins de pesquisa, bem como nas análises neuroquímicas há a necessidade de retirada das estruturas cerebrais, procedimento este inviável em humanos. Os animais foram expostos ao modelo de DXB, conforme descrito por Bridi (et al., 2006), e receberam um *pool* de AACR a cada 12hrs.

Foram utilizados um total de 32 ratos *Wistar*, machos, com 7 dias de vida. Estes animais provenientes do Biotério da UNESC, foram acondicionados com as mães até o desmame, ocorrido no 21º dia. Após isto, os animais foram acondicionados em caixas (quantidade de animais varia de acordo com a ninhada), sob ciclo claro-escuro de 12hrs (7:00hrs às 19:00hrs), com temperatura ambiente mantida constante entre 23°C, $\pm 1^\circ\text{C}$, através de exaustor de ar. As caixas foram trocadas semanalmente, bem como alimentação e água, ofertados *ad libitum*. O estudo seguiu as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob o protocolo 61/2021 (Anexo I).

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais do experimento foram divididos em 4 grupos experimentais:

- Grupo 1 – Salina controle (n=8) – receberam solução salina 0,9% via subcutânea e óleo de soja via gavagem;
- Grupo 2 - DXB controle (n=8) – receberam o pool de AACR (15,8 $\mu\text{L/g}$) via subcutâneo e óleo de soja via gavagem;
- Grupo 3 - Vit. D (n=8) – receberam solução salina 0,9% via subcutânea + vitamina D3 (100UI/Kg de peso corporal) via gavagem;
- Grupo 4 - DXB + Vit. D (n=8) – receberam o pool de AACR (15,8 $\mu\text{L/g}$) via subcutâneo + vitamina D3 (100UI/Kg de peso corporal) via gavagem.

O início do experimento se deu quando os animais completaram 7 dias de idade, sendo então iniciado o tratamento de acordo com o grupo experimental ao qual pertenciam conforme descrição anterior. Cabe salientar que o pool de AACR e a solução salina foram administrados via subcutânea de 12 em 12 horas, enquanto o tratamento com Vit. D ou óleo de soja via gavagem de 24 em 24 horas, durante 21 dias (Figura 3).

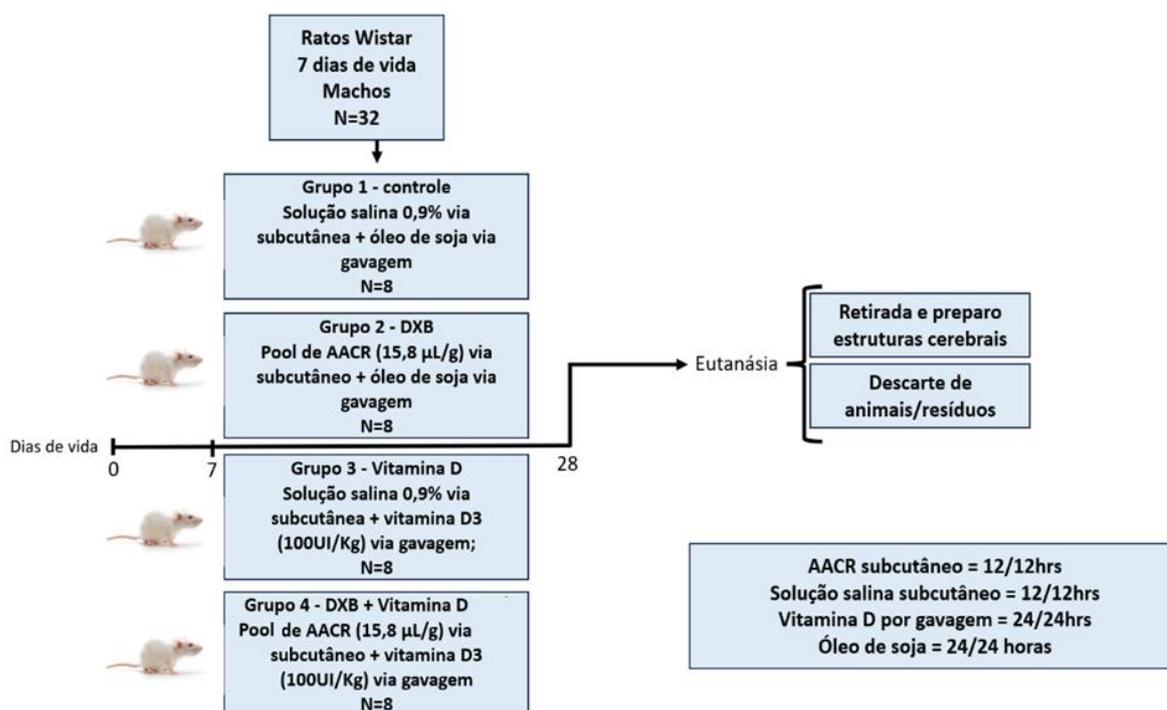


Figura 3 - Esquema experimental (Fonte: Autor)

Após 12 horas da última administração (21º dia), foi realizada a eutanásia e, sequencialmente, a dissecação do córtex cerebral para avaliação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6.

3.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO EXPERIMENTO

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Doenças Neurometabólicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, onde foram realizados os procedimentos que envolvem a indução do modelo animal, avaliação de parâmetros inflamatórios e análises estatísticas.

3.4 DESCARTE DE RESÍDUOS

Após a retirada da estrutura de córtex cerebral, o descarte dos animais seguiu-se da seguinte forma: os animais foram acondicionados em saco branco leitoso e encaminhados para conservação no freezer da universidade. Após conservação, as carcaças foram coletadas e transportadas por empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e posteriormente encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos seguiram conforme RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.5.1 Dosagem de proteínas

Foi realizada através do método modificado de Lowry e colaboradores (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão. O princípio do método é baseado na redução do reagente Folin-Ciocalteu na presença do catalisador cobre (II) quando reage com as proteínas de uma amostra. Dessa forma, as amostras foram homogeneizadas na proporção 1:10, em tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140mM pH 7,4 para posterior centrifugação a 3500rpm por 10 minutos a 4°C. Para a curva padrão, foi utilizada albumina bovina 1mg/mL, 1mL de reativo C formado pela mistura dos reagentes A, B1 e B2 (100:1:1) e água. Para as amostras, foi utilizado volume de 10uL, 1mL de reativo C e 190uL de água. Após pipetar todos os reagentes, foi misturado utilizando vórtex, e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Logo após, foi adicionado no escuro 100uL do reagente Folin-Ciocalteu 1N em todas as amostras e na curva, agitado no vórtex novamente e incubado novamente por 20 min no escuro a temperatura ambiente. Após incubação parte do volume foi colocado em placa de 96 poços para realização da leitura no *spectramax* a 650nm. Os valores foram expressos em mg.

3.5.2 Parâmetros de Inflamação

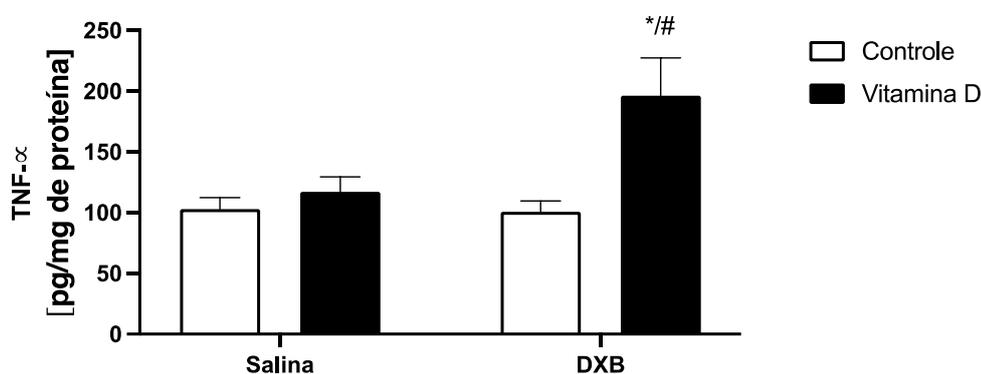
Para dosagem das citocinas TNF- α , IL1 β , IL6: foi utilizado o método enzyme-linked immunoabsorbent assay (DuoSet ELISA) de captura (R&D System, Inc., Minneapolis, USA). Para isso, inicialmente, a placa foi sensibilizada com anticorpo de captura e foi incubada *overnight* à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, o anticorpo de captura foi aspirado e foram realizadas 5 lavagens com o tampão de lavagem - tampão fosfato-salino PBS (pH 7,4) contendo 0.05% de tween 20. Após a remoção completa do tampão de lavagem, foi realizado o bloqueio com 300uL de 1% de albumina bovina, em temperatura ambiente, por 1 hora. Após foi novamente feita a lavagem e remoção completa de tampão conforme citado, para então ser adicionado 100uL de amostra ou padrão para curva e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Finalizado o tempo de incubação, foi lavado novamente e adicionado 100uL do anticorpo de detecção, sendo incubado por 2 horas. Foram repetidas as lavagens para a adição de 100uL estreptavidina conjugada à peroxidase (*Streptavidin*-HRP) e incubada por 20 minutos. Novamente foi realizada a lavagem e após, a adição de 100uL da solução de substrato TMB (reagente 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina), incubado por mais 20 minutos. Após o tempo, a reação foi parada pela adição de 50uL de ácido sulfúrico 2N e então foi feita a leitura em leitor de placa (*spectramax plus*) a 450nm. Os resultados estão expressos como pg/mg de proteína.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros inflamatórios foram analisados inicialmente pelo teste de normalidade e após, por meio da análise de variância de duas vias ANOVA, considerando $p \leq 0,05$, seguido de teste de Tukey como *post hoc*. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão, considerando os valores de $p \leq 0,05$ como significativos. Para a construção dos gráficos deste estudo, foi utilizado o *software GraphPad Prism*, versão 9.0.

4 RESULTADOS

Com relação aos parâmetros avaliados, pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de TNF- α no córtex cerebral entre animais dos grupos salina Vit. D e salina controle. Entretanto, houve aumento estatisticamente significativo entre o grupo DXB + Vit. D comparativamente ao grupo salina controle e DXB controle (Figura 4).



Dados expressos como média e desvio padrão, considerando $p < 0,05$ como significativo, sendo * comparado ao salina controle e # comparado ao grupo DXB controle (ANOVA de duas vias, seguido de *Post hoc* de Tukey).

A figura 5 mostra dados referentes às dosagens dos níveis de IL-1 β . Pode-se observar que houve aumento estatisticamente significativo nos níveis de IL-1 β nos animais do grupo salina Vit. D comparativamente o grupo salina controle. Também houve aumento estatisticamente significativo entre o grupo DXB + Vit. D comparativamente ao grupo salina controle e DXB controle.

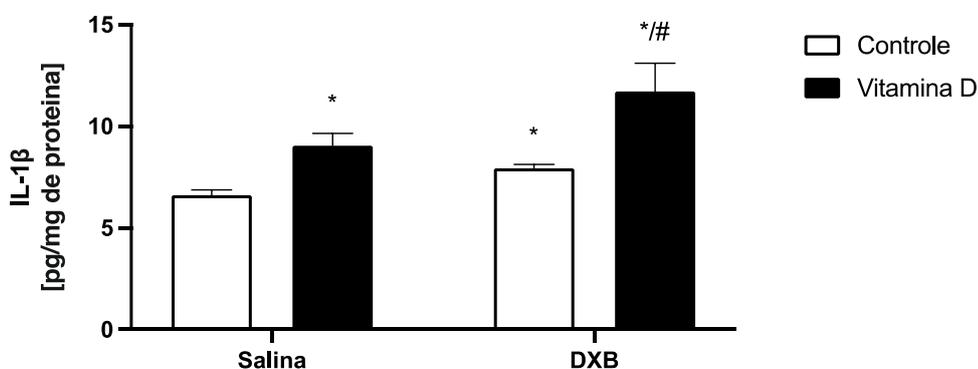


Figura 5 – Efeito da vitamina D sobre IL-1 β no córtex cerebral de ratos expostos a um modelo de DXB. Dados expressos como média e desvio padrão, considerando $p < 0,05$ como significativo, sendo * comparado ao salina controle e # comparado ao grupo DXB controle (ANOVA de duas vias, seguido de *Post hoc* de Tukey).

Por fim, a Figura 5 expõe os resultados encontrados quanto à IL-6, nesta análise é possível que houve aumento estatisticamente significativo nos níveis de IL-6 nos animais do grupo salina Vit. D comparativamente o grupo salina controle. Também houve aumento estatisticamente significativo entre o grupo DXB + Vit. D comparativamente ao grupo salina controle e DXB controle.

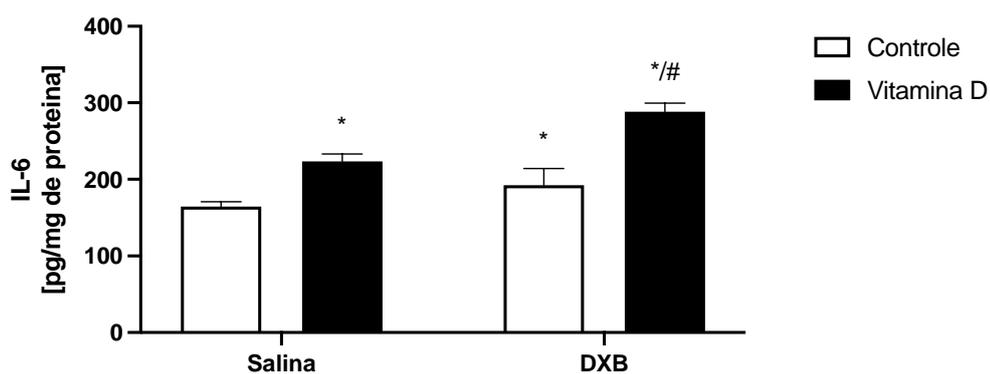


Figura 6 – Efeito da vitamina D sobre IL-6 no córtex cerebral de ratos expostos a um modelo de DXB. Dados expressos como média e desvio padrão, considerando $p < 0,05$ como significativo, sendo * comparado ao salina controle e # comparado ao grupo DXB controle (ANOVA de duas vias, seguido de *Post hoc* de Tukey).

5. DISCUSSÃO

A inflamação é uma resposta fisiológica do organismo frente a algum agressor ou patógeno, podendo desencadear diferentes respostas de acordo com o estímulo (Parkin e Cohen, 2001). É descrito que processos inflamatórios estão relacionados ao aparecimento de diversas doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington, podendo estar associado ao declínio cognitivo e aparecimento de doenças psiquiátricas (Okin e Medzhitov, 2012). Dessa forma, é demonstrado que os danos neurológicos nos EIM são relacionados a uma resposta inflamatória que pode possuir papel essencial na sua fisiopatologia. Assim, é visto que a presença de estresse oxidativo e inflamação é uma via comum de alguns EIM, como na DXB (Rabelo et al., 2023).

Como citado ao longo deste estudo, a DXB, um EIM, caracteriza-se pelo acúmulo de metabólitos tóxicos, no caso da DXB, dos AACR: sabe-se que a homeostase dos AACR é fundamental na fisiologia normal do cérebro, visto que são importantes nutrientes e sinalizadores que desempenham funções em todo o organismo (Simone et al., 2013). Em um estudo, Simone e colaboradores (2013) demonstram que a exposição prolongada à níveis altos de AACR altera as propriedades imunológicas da micróglia e sugere que estes atuam como moduladores da resposta imune central e, ainda, sugerem desequilíbrio neurotóxico. Assim, Mescka e colaboradores (2015) demonstram aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , interferon- γ (IFN- γ) e IL-6 em pacientes com DXB. Ainda Scaini e colaboradores (2018) apresentam não só o aumento dessas citocinas, como também de moléculas de adesão como ICAM (intercellular adhesion molecule 1) e VCAM (vascular cell adhesion molecule 1), relacionadas com disfunção endotelial e migração de leucócitos, levando a inflamação crônica de baixo grau (Mescka et al., 2015; Scaini et al., 2018).

Dessa forma, o presente estudo demonstra o aumento estatisticamente significativo de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no córtex cerebral de ratos Wistar infantis submetidos a um modelo de DXB, dados estes que corroboram com dados obtidos por Scaini e colaboradores (2018) em pacientes com diagnóstico de DXB. Esses achados sugerem que a inflamação possui papel importante na sua fisiopatologia da doença, bem como apresentam correlação positiva entre o número de crises metabólicas e os níveis aumentados de IL-1 β e sICAM (Scaini et al., 2018). Em concordância, Lemos et al. (2023) demonstram aumento de IL-1 β e IL-6, bem como

não apresentam alteração nos níveis de TNF- α no córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo de DXB. No estudo, os autores relacionam este aumento em citocinas pró-inflamatórias com o aparecimento de estresse oxidativo, alteração do sistema colinérgico e danos à memória nos ratos induzidos a DXB (Lemos et al., 2023). Além disso, Rabelo et al. (2023) demonstraram que administração aguda de alfa-cetoisocapróico, metabólito da leucina, principal composto neurotóxico na DXB, leva ao aumento da citocina inflamatória IFN- γ no córtex cerebral de ratos. Ainda, Wessler et al. (2019) apresentam aumento de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 no córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo de DXB (Wessler et al., 2019).

Sabe-se, através destes estudos, que os AACR têm papel importante na descompensação clínica de pacientes com diagnóstico de DXB, porém os mecanismos fisiopatológicos que levam à neurotoxicidade e, conseqüentemente, à sintomatologia são pouco compreendidos. Nesse contexto, Scaini et al. (2014) buscaram compreender melhor este processo e descrevem que a quebra da BHE é um fator relevante para a manutenção da inflamação cerebral de maneira crônica e que pode ter correlação com a disfunção cerebral na DXB.

Wessler et al. (2019) aprofundaram o entendimento da ruptura da BHE e a disfunção cerebral e cognitiva de indivíduos com DXB, e identificaram em ratos jovens em modelo animal de DXB que a inflamação cerebral estava caracterizada pelo aumento de IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ , bem como diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10 quando induzida por lipopolissacarídeo (LPS) associado a altos níveis de AACR, causando a ruptura da BHE por meio da hiperativação de metaloproteinases de matriz (MMPs). Além disso, Scaini et al. (2014) demonstram também quebra de BHE no hipocampo e córtex cerebral de ratos após teste com reagente azul de Evans, além de apresentarem um aumento de MMP-2 e MMP-9 no hipocampo dos animais, sendo essa área cerebral essencial para memória (Scaini et al., 2014).

As MMPs são enzimas que digerem proteínas da matriz extracelular e que, em algumas desordens do sistema neurológico, como a esclerose múltipla, por exemplo, há o aumento da sua expressão em células neuronais, e esse aumento está correlacionado com a promoção de neuroinflamação e ruptura da BHE (Araújo et al., 2011).

Ainda sobre a integridade da BHE e citocinas pró-inflamatórias, Carmono et al. (2015) ao analisar correlação da BHE e citocinas pró-inflamatórias no hipocampo

e córtex cerebral em ratos submetidos a meningite bacteriana, identificaram que no hipocampo houve o aumento de IL-1 β no tempo de 6, 12 e 24h após a indução, aumento de IL-6 na mesma região cerebral em 6, 24, 96h e TNF- α em 24 e 96h após a indução da meningite. Quanto à ruptura da BHE, a mesma ocorreu 12h após a indução e os resultados do autor sugeriram a correlação de citocinas pró-inflamatórias com a ruptura da BHE. Embora o modelo animal acima seja diferente do da DXB, os dados instigam a possibilidade de que o aumento das citocinas pró-inflamatórias do modelo DXB possam estar correlacionados com a ruptura da BHE e que leve aos danos neurológicos que os pacientes apresentam.

Em adição, Rosa et al. (2015), ao analisarem os níveis de citocinas pró-inflamatórias de maneira aguda e crônica em ratos infantis, apontaram que a administração aguda de AACR aumenta os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no córtex cerebral em ratos de 10 dias de idade. No entanto, divergindo dos resultados encontrados neste estudo, identificou a diminuição os níveis de IL-1 β e IL-6 no córtex cerebral de ratos após a administração crônica.

O presente estudo reforça o papel dos AACR na resposta inflamatória, observado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias em córtex cerebral de ratos neonatos. No entanto, não foram avaliadas citocinas anti-inflamatórias, o que poderia ser realizado em estudos futuros, visto que este equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias é fundamental na manutenção da homeostase celular.

O presente estudo ainda buscou avaliar os efeitos neuroprotetivos da Vit. D, visto que estudos apontam seu uso correlacionado ao sistema imunológico, especificamente no quesito proteção neurológica associada a efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (Lima et al., 2018; Zhang et al., 2020; Jiang et al., 2022).

Dentre esses estudos, Jiang et al. (2022) avaliaram estruturas cerebrais de modelos animais de Traumatismo Cranioencefálico (TCE) e observaram que a administração de Vit. D exibiu atividades efetivamente antioxidantes e anti-inflamatórias. Já Lima et al. (2018) também apontam neuroproteção conferida pela administração de Vit. D em ratos hemiparkinsonianos, identificada através da redução de estresse oxidativo e redução de TNF- α no corpo estriado. Contribuindo ainda com estudos, Zhang et al. (2020) identificaram redução de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α no hipocampo de ratos induzidos a um modelo de depressão após a administração de Vit. D, demonstrando que a Vit. D exerce papel anti-inflamatório.

Em experimento realizado com ratas com 60 dias de vida submetidas a um modelo de ovariectomia, observou-se o aumento nos níveis de IL-1 β e TNF- α , tanto no córtex frontal quanto no hipocampo. Este aumento foi revertido com o tratamento com Vit. D 420 UI/kg. Por outro lado, as ratas no mesmo modelo animal, após 8 meses, também apresentaram aumento nos níveis de IL-1 β no córtex frontal e hipocampo, porém não houve reversão deste aumento com o tratamento de Vit. D 420 UI/kg no hipocampo destes animais. Por fim, as ratas com 120 dias e submetidas a ovariectomia e tratadas após 1 mês mostraram aumento nos níveis de IL-1 β apenas no córtex frontal, mas este efeito foi revertido com o tratamento de vitamina D 420 UI/kg. Carvalho et al. (2023) demonstraram neste experimento descrito que a Vit. D tem potencial efeito neuroprotetor.

Como mencionado anteriormente, a excitotoxicidade, por meio do aumento de glutamato, pode estar correlacionado com a ruptura da BHE e os danos posteriores ao sistema neurológico. Pesquisadores apontam que evidências in vitro demonstram os efeitos neuroprotetores da Vit. D, parcialmente mediados pela sua influência na transcrição, afetando a produção de enzimas no sistema nervoso. No caso específico, observa-se que a hipovitaminose de Vit. D reduz os níveis de glutamato descarboxilase no cérebro, uma enzima responsável pela degradação do glutamato. Sua diminuição pode elevar os níveis deste transmissor, contribuindo assim para a neurotoxicidade e a ruptura da BHE (Tainura et al., 2006).

Além disso, estudos demonstram que a Vit. D possui papel essencial da regulação de processos apoptóticos e autofágicos, pela regulação de proteínas anti e pró-apoptóticas, bem como por suprimir a via do alvo da rapamicina em mamíferos, essa que atua em diversas vias. Ademais, seus efeitos anti-inflamatórios dependem da inibição de prostaglandinas e da sinalização de vias como a via MAPK e do fator nuclear kappa B (NFkB) (El-Sharkawy e Malki, 2020).

Diferentemente do esperado, o presente estudo, ao avaliar o efeito neuroprotetor através de atividade anti-inflamatória, não identificou redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1 β e IL-6) no córtex cerebral de animais modelo DXB tratados com Vit. D. Os valores encontrados inclusive, foram superiores aos animais submetidos ao modelo DXB. Uma hipótese para explicar esse aumento se dá devido ao efeito dose-resposta do tratamento utilizado, uma vez que os animais se encontravam no período neonatal, podendo a dose utilizada não ter sido apropriada.

Em estudos que visaram avaliar citocinas pró-inflamatórias associadas ao diabetes mellitus também trazem divergências em achados, nos quais alguns estudos apontam aumento de citocinas pró-inflamatórias (Clark e Mach, 2016; Garbossa e Folli, 2017; Dimitrov e Branco 2017) mas também há um estudo apontando a não identificação de efeitos benéficos acerca de citocinas inflamatórias (Berridge, 2017).

A administração exógena de Vit. D em humanos traz algumas preocupações, entre elas hipercalcemia, nefrocalcinose e cálculos renais, o que leva alguns profissionais a não indicarem ou a fazerem com muita precaução a suplementação de Vit. D. Associado a isto, a tendência de toxicidade prévia de algumas suplementações de vitaminas como a vitamina A, C e vitamina E, aumentam esta relutância quanto ao seu uso (Pludowski, 2018).

Ademais, não existem estudos que avaliem marcadores pró-inflamatórios associados à hipervitaminose por Vit. D, sendo que os estudos que avaliam a hipervitaminose costumam avaliar sintomatologia geral associada à dose administrada e à hipercalcemia (Shepard e Deluca, 1980). No estudo de Shepard e Deluca (1980), é sugerido que roedores toleram concentrações plasmáticas de 25(OH)D3 na faixa de 250-1000nmol/L; porém, baseado em uma série de estudos revisados sistematicamente por Jones (2008) acerca da toxicidade da Vit. D, são relatadas diferenças entre as várias espécies de mamíferos quanto à dose inicial para ocorrer toxicidade, mas, em sua maioria, são necessárias doses superiores à 375nmol/L.

Nesse sentido, Mokhtari-Zaer et al. (2020) demonstraram, em ratos submetidos a administração de LPS para indução de um modelo de dano cognitivo e tratados com 100 UI/kg de vitamina D3 (mesma dose utilizada no presente estudo), uma melhora nos parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo e comportamentais, apresentando efeitos protetores nessa dose. No entanto, vale ressaltar que, ao início do experimento, os animais apresentavam 8 semanas de vida, diferentemente da idade dos animais utilizados em nosso estudo (7 dias de vida), podendo, dessa forma, sugerir que embora a Vit. D apresente efeitos benéficos há uma clara necessidade de investigar curva-resposta. Assim, é necessário que se avalie uma dose eficaz, uma vez que aos sete dias de vida os animais ainda não possuem a BHE totalmente formada e ainda, devido a lipossolubilidade, a Vit. D consegue facilmente acessar o cérebro, podendo estar sendo tóxica nesta dose.

Além disso, Wan et al. (2022) apontam que crianças são mais susceptíveis a Hipervitaminose D, no entanto, os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda permanecem desconhecidos. Os autores sugerem que a suplementação em crianças deve levar em consideração o tamanho corporal, ainda podendo a Hipervitaminose D estar relacionada ao aparecimento de alteração do estado mental, calcificação patológica de vasos sanguíneos, pele e pulmão, por exemplo (Asif e Farooq, 2023; Wan et al., 2022).

O foco então volta-se para a definição de dose necessária e segura da Vit. D, a fim de melhor compreensão dos seus possíveis efeitos neuroprotetores na DXB. Ainda, para melhor elucidar os dados encontrados neste estudo, pode ser necessário especular se a hipervitaminose por administração de Vit. D está associada ao aumento de níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6.

6. CONCLUSÃO

O estudo fornece achados que corroboram com pesquisas prévias que demonstram que a DXB tem correlação direta com o aumento de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, os achados com relação à efeitos da Vit. D não mostram efeitos neuroprotetores com relação aos parâmetros avaliados. Nossos achados apontam então para a necessidade de realização de curva dose-resposta do uso da Vit. D em animais modelo da DXB.

A pesquisa de agentes neuroprotetores para o DXB continua a demonstrar promissor desenvolvimento. Isso envolve a exploração de compostos com potencial para intervir em diversas vias metabólicas e componentes distintos, oferecendo assim perspectivas multifacetadas para a intervenção terapêutica. Portanto, estudos futuros serão necessários para melhor compreensão dos achados e definição de dose-resposta da Vit. D em relação à expressão de citocinas pró-inflamatórias na DXB.

REFERÊNCIAS

Ashtari F, Tohghianifar N, zarkesh-esfahani SH, Mansourian M. Short-Term Effect of High-Dose Vitamin D on the Level of Interleukin 10 in Patients with Multiple Sclerosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Neuroimmunomodulation*. Sept 2015, 22 (6): 400–404.

Araujo APQC. Doenças metabólicas com manifestações psiquiátricas. *Rev Psiqu Clin*. 2004 Out 31(6).

Araújo RVS, Silva FO, Silva FO, Melo-Júnior MR, Porto AL. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. *R. Ci. md. biol., Salvador*, v.10, n.1, jan./abr. 2011: 82-88.

Berridge MJ. Deficiência de vitamina D e diabetes. *Bioquímica J*. 2017; 474:1321-1332.

Blackburn PR, Gass JM, Vairo FPE, Farnham KM, Atwal HK, Macklin S, Klee EW, Atwal PS. Maple syrup urine disease: mechanisms and management. *Appl Clin Genet*. 2017 Sep 6;10:57-66.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Coordenação Geral de Média e Alta Complexidade. Diretrizes para Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras no Sistema Único de Saúde – SUS / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Coordenação Geral de Média e Alta Complexidade. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Triagem Neonatal Biológica: Manual técnico. Brasília, 2016.

Bonvini A. Efeitos dos aminoácidos de cadeia ramificada na resposta inflamatória induzida por lipolissacarídeo em macrófagos de linhagem celular RAW 264.7. 2019. 87. Tese (Doutorado em ciência dos alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – São Paulo, 2019.

Borges JM. Suplementação com Vitamina D: uma revisão sistemática. Monografia – Universidade Federal da Bahia – BA. Fev 2014.

Bouillio R. Vitamin D and extraskeletal health. UpToDate. 2013;1–12.

Cantorna MT, Mahon B. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Bio Med (Maywood)* 2004; 229(11):1136-42.

Castro LCG. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011;55(8).

Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 2018.

Chuang DT, Shih VE, Max Wynn R. Maple Syrup Urine Disease (Branched-Chain Ketoaciduria). In: Valle DL, Antonarakis S, Ballabio A, Beaudet AL, Mitchell GA (eds) *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill Education, New York, NY, 2019, pp 1971-1995.

Carvalho AP, Keller GS, Santos MLC, Jesus LC, Medeiros EB, Boaventura A, Lidio AV, Bobinski F, Budni J. Envolvimento da neuroinflamação no efeito da Vitamina D e Donepezila em ratas ovariectomizadas adultas e envelhecidas. In: *Anais da Semana de Ciência e Tecnologia da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Anais...Criciúma(SC) Unesc*, .

Coëffier M, Miralles-Barrachina O, Le Pessot F, Lalaude O, Daveau M, Lavoine A, Lerebours E, Déchelotte P. Influence of glutamine on cytokine Production by human gut in vitro. *Cytokine*. Vol. 13, 2001, 148-154.

Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA – A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev*, 1997;10:742-780.

Deluca, HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (suppl 6). 2004, 1689S-1696S.

Dimitrov V, Branco JH. Sinalização da vitamina D na imunidade inata intestinal e na homeostase. *Endocrinol celular Mol*. 12 de abril de 2017. doi: 10.1016/j.mce.2017.04.010. [Epub antes da impressão]

Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, Boehm BO, Weihrauch G, Maerz W. Independent Association of Low Serum 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D Levels With All-Cause and Cardiovascular Mortality. *Arch Intern Med*. 2008;168(12):1340-1349.

Edelmann L, Wasserstein MP, Kornreich R, Sansaricq C, Snyderman SE, Diaz GA. Maple syrup urine disease: identification and carrier-frequency determination of a novel founder mutation in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet*. 2001 Oct;69(4):863-8.

El Husny, Antonette Souto EI; FERNANDES-CALDATO, Milena Coelho. Erros inatos do metabolismo: revisão de literatura. *Rev. Para. Med.*, Belém , v. 20, n. 2, p. 41-45, jun. 2006 .

Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanatomy*. 2005;29:21-30.

Garbossa SG, Folli F. Vitamina D, subinflamação e resistência à insulina. Uma janela sobre um papel potencial para a interação entre o metabolismo ósseo e a glicose. *Transtorno Rev Endocr Metab*. 2017; 18:243-258.

Garrod AE. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. 1902. *Mol Med*. 1996 May;2(3):274-82.

Herber I, Schwartz IVD, Nalin T, Oliveira Netto CB, Camelo Junior JS, Santos ML, Ribeiro EM, Schüler-Faccini L, Souza CFM. Doença da urina de xarope de bordo no

Brasil: um panorama das últimas duas décadas. *J. Pediatr. (Rio J.)* 91 (3) • May-Jun 2015. Jardim e Ashton-Prolla, 1996.

Bridi R., Braun CA, Zorzi GK, Wannmacher CM, Wajner M., Lissi EG, Dutra-Filho CS alfa-cetoácidos acumulados na doença da urina do xarope de bordo estimulam a peroxidação lipídica e reduzem as defesas antioxidantes no córtex cerebral de ratos jovens. *Metab. Cérebro Dis.* 2005; 20 :155–167.

Hewison M. Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. *Mol Cell Endocrinol.* 2010a;321(2):103-11.

Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010b;39(2):365-79.

Jiang HS, Yang X, Wang Y e Zhou C. A vitamina D protege contra lesões cerebrais traumáticas por meio da modulação da polarização microglial e neuroinflamação mediada pela via TLR4/MyD88/NF- κ B. *BioMed Research International.*

Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition.* Vol. 88, Issue 2, 2008, 582S-586S.

Kimball S., Fuleihan GEH., Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 45. 2008, 339-415.

Kunadian V, Ford GA, Bawamia B, Qiu W, Manson JE. Vitamin D deficiency and coronary artery disease: A review of the evidence. *American Heart Journal.* Vol.167, Issue 3, 2014; 283-291.

Lemos JC. Avaliação do perfil inflamatório, integridade da barreira hematoencefálica e sequelas cognitivas na vida adulta em modelo experimental de meningite neonatal por streptococcus agalactiae. Tese Doutorado. UNESC – Criciúma. 2015.

Lemos IDS, Torres CA, Alano CG, Matiola RT, de Figueiredo Seldenreich R, Padilha APZ, De Pieri E, Effting PS, Machado-De-Ávila RA, Réus GZ, Leipnitz G, Streck EL.

Memantine Improves Memory and Neurochemical Damage in a Model of Maple Syrup Urine Disease. *Neurochem Res.* 2023 Dec 16.

Lemire JM, Ince A, Takashima M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity* 1992; 12(2):143-8.

Levin ML, Scheimann A, Lewis RA, Beaudet AL. Edema cerebral na doença da urina em xarope de bordo. *J Pediatr.* 1993; 122 (1):167–168.

Lichtenstein A, Ferreira-Júnior M, Sales MM, Aguiar FB de, Fonseca LAM, Sumita NM, Duarte AJS. Vitamina D: ações extraósseas e uso racional. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 59 (5), 2013, 495-506.

Lima, L.A.R., Lopes, M.P., Costa, R.O. et al. Vitamin D protects dopaminergic neurons against neuroinflammation and oxidative stress in hemiparkinsonian rats. *J Neuroinflammation* 15, 2018, 249.

Lin E, Calvano SE, Lowry SF – Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, 2000;127:117-126.

Linker-Israeli M, Elstner E, Klinenberg JR, Wallace DJ, Koeffler HP. Vitamin D(3) and its synthetic analogs inhibit the spontaneous in vitro immunoglobulin production by SLE-derived PBMC. *Clin Immunol* 2001; 99:82-93.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275.

Martami F, Holton KF. Visando a neurotoxicidade do glutamato através da manipulação dietética: tratamento potencial para enxaqueca. *Nutrientes.* 2023; 15(18):3952.

Martins AM. *Erros Inatos do Metabolismo: Abordagem Clínica*, 2a ed. São Paulo, 2003.

Marini F, Bartoccini E, Cascianelli G, Voccoli V, Baviglia MG, Magni MV, et al. Effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in embryonic hippocampal cells. *Hippocampus.* 2010;20(6):696-705.

Mak CM, Lee HC, Chan AY, Lam CW. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013 Nov;50(6):142-62.

Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428–435 (2008).

Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010; 140: 771-776.

Menkes JH, Hurst PL, Craig JM. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics*. 1954 Nov;14(5):462-7.

Mescka C., Moraes T., Rosa A., Mazzola P., Piccoli B., Jacques C., Dalazen G., Coelho J., Cortes M., Terra M., et al. Efeito neuroprotetor in vivo da L-carnitina contra o estresse oxidativo na doença da urina do xarope de bordo. *Metab. Cérebro Dis*. 2011; 26 :21–28.

Mescka CP, Rosa AP, Schirmbeck G., da Rosa TH, Catarino F., de Souza LO, Guerreiro G., Sitta A., Vargas CR, Dutra-Filho CS L-carnitina previne o estresse oxidativo no cérebro de ratos Submetido a um modelo crônico induzido quimicamente de MSUD. *Mol. Neurobiol*. 2016; 53 :6007–6017.

Misra M. Vitamin D insufficiency and deficiency in children and adolescents. *UpToDate*. 2013;1–20.

Mokhtari-Zaer A. et al. Vitamin D3 attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in rats by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Life Sciences*, v. 253, p. 01-08, 2020.

Mueller ER, Moore GJ, Bunce AC, Mack J, Bigler DC, Morton DH, Strauss KA. Biochemical correlates of neuropsychiatric illness in maple syrup urine disease. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1809-1820.

Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am. J. Clin. Nutr.* [Internet]. 2008 Aug;88(2):491S–499S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18689389>.

Okin D, Medzhitov R. Evolution of inflammatory diseases. *Curr Biol.* 2012 Sep 11;22(17):R733-40.

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet.* 2001; 357:1777-89.

Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood–brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol.* 2002; 68:311-23.

Plantone D, Primiano G, Manco C, Locci S, Servidei S, De Stefano N. Vitamin D in Neurological Diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023; 24(1):87.

Pludowski P, Holick MF, Grant WB, Konstantynowicz J, Mascarenhas MR, Haq A, Povoroznyuk V, Balatska N, Barbosa AP, Karonova T, Rudenka E, Misiorowski W, Zakharova I, Rudenka A, Łukaszkiwicz J, Marcinowska-Suchowierska E, Łaszcz N, Abramowicz P, Bhattoa HP, Wimalawansa SJ. Vitamin D supplementation guidelines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018 Jan;175:125-135.

Rabelo F, Lemos IDS, Dal Toé CP, Casagrande DD, Freitas MLS, Quadra MR, Lima IR, Generoso JS, Michels M, Silveira PCL, Pizzol FD, Streck EL. Acute effects of intracerebroventricular administration of α -ketoisocaproic acid in young rats on inflammatory parameters. *Metab Brain Dis.* 2023 Jun;38(5):1573-1579.

Raeburn CD, Sheppard F, Barsness KA, Arya J, Harken AH. Cytokines for surgeons. *Am J Surg.* 2002 Mar;183(3):268-73.

Romão A, Simon PEA, Góes JEC, Pinto LLC, Giugliani R, Luca GR, Carvalho FLC. Apresentação clínica inicial dos casos de erros inatos do metabolismo de um hospital pediátrico de referência: ainda um desafio diagnóstico. *Rev. paul. pediatr.* 35 (3) • Jul-Sep 2017.

Rosa L. Avaliação dos parâmetros inflamatórios, permeabilidade da barreira hematoencefálica e atividade da Na⁺, K⁺ -ATPase no modelo animal da doença da urina do xarope do bordo tratado com dexametasona. Tese doutorado. UNESC – Criciúma, 2015.

Scaini G, Morais MOS, Galant LS, Vuolo F, Dall'Igna DM, Pasquali MAB, Ramos VM, Gelain DP, Moreira JCF, Schuck PF, Ferreira GC, Soriano FG, Dal-Pizzol F, Streck EL. Coadministration of Branched-Chain Amino Acids and Lipopolysaccharide Causes Matrix Metalloproteinase Activation and Blood–Brain Barrier Breakdown. *Mol Neurobiol* 50, 358–367 (2014).

Scaini, G., Tonon, T., Moura de Souza, C.F. *et al.* Evaluation of plasma biomarkers of inflammation in patients with maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 41, 631–640 (2018).

Scaini G, Tonon T, Souza CFM, Schuck PF, Ferreira GC, Quevedo J, Neto JS, Amorim T, Camelo Jr JS, Margutti AVB, Tresbach RH, Sperb-Ludwig F, Boy R, Medeiros PFV, Schwartz IVDS, Streck EL. Evaluation of plasma biomarkers of inflammation in patients with maple syrup urine disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. May 2018.

Schuch NJ, Garcia VC. Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;625–33.

Shepard RM, Deluca HF. Plasma concentrations of vitamin D₃ and its metabolites in the rat as influenced by vitamin D₃ or 25-hydroxyvitamin D₃ intakes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Volume 202, Issue 1, 1980, 43-53.

Silva, JME. Brief history of rickets and of the discovery of vitamin D. *Acta Reumatológica Portuguesa*, 32 (3). 2007, 205-229.

Silva RLB, Avaliação do impacto da vitamina D3 (1,25 (OH)₂ vitamina D3) em monócitos de pacientes com Esclerose Múltipla na forma Remitente Recorrente. UNIRIO, 2015.

Simone R, Vissicchio F, Mingarelli C, Nuccio C, Visentin S, Ajmone-cat MA, Minghetti L. Branched-chain amino acids influence the immune properties of microglial cells and their responsiveness to pro-inflammatory signals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Vol. 1832, Issue 5, 2013, 650-659.

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

Souza ICN. Triagem urinária para erros inatos do metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento [Tese – Mestrado]. São Paulo(SP): Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2002.

Streit WJ, Kincaid-Colton CA (1995) The brain's immune system. *Sci Am* 273(54–55):58–61

Strauss KA, Morton DH. Branched-chain Ketoacyl Dehydrogenase Deficiency: Maple Syrup Disease. *Curr Treat Options Neurol*. 2003 Jul;5(4):329-341.

Strauss KA, Wardley B, Robinson D, Hendrickson C, Rider NL, Puffenberger EG, Shellmer D, Moser AB, Morton DH. Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design. *Mol Genet Metab*. 2010 Apr;99(4):333-45.

Tainura H, Ito M, Sanada N, Kuramoto N, Ohno Y, Nakamichi N, Yoneda Y. Chronic vitamin D3 treatment protects against neurotoxicity by glutamate in association with upregulation of vitamin D receptor mRNA expression in cultured rat cortical neurons. *Journal of Neuroscience Research*. Vol 83:7. May 2006:1179-1189.

Tao S, Yuan Q, Mao L, Chen F, Ji F, Cui Z. Vitamin D deficiency causes insulin resistance by provoking oxidative stress in hepatocytes. *Oncotarget*. 2017; 8: 67605-67613.

Yokoyama WM, Kim S, French AR. The Dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:405-29.

Wang, Yuxi et al. Modulation of neuroinflammation by cysteinyl leukotriene 1 and 2 receptors: implications for cerebral ischemia and neurodegenerative diseases. *Neurobiology of aging*, v. 87, p. 1-10, 2020.

Wessler LB, de Miranda Ramos V, Bittencourt Pasquali MA, Fonseca Moreira JC, de Oliveira J, Scaini G, Streck EL. Administration of branched-chain amino acids increases the susceptibility to lipopolysaccharide-induced inflammation in young Wistar rats. *Int J Dev Neurosci*. 2019 Nov;78:210-214.

Wimalawansa S. Vitamin D in the New Millennium. *Current Osteoporosis Reports*, 10 (1). 2012, 4-15.

Wolf G, Livshits D, Beilin B, Yirmiya R, Shavit Y. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. *Brain Behav Immun*. 2008 Oct;22(7):1072-1077.

Wyss-Coray T., Mucke L. Inflammation in Neurodegenerative Disease -a Double Edged Sword. *Neuron* 2002; 35:419-432.

Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007 Spring;45(2):27-37.

Zhang W, Guo Y, Wang K, Chen L, Jiang P. Neuroprotective effects of vitamin D and 17 β -estradiol against ovariectomy-induced neuroinflammation and depressive-like state: Role of the AMPK/NF- κ B pathway. *International Immunopharmacology*. Vol. 86, 2020.

ANEXO I - Certificado de aprovação da pesquisa - CEUA – UNESC.



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 09/08/2022.

Título do projeto	Efeitos da vitamina D sob comportamento, na inflamação, metabolismo e estresse oxidativo na doença da urina do xarope do bordo em um modelo animal.
Project title	Acute effects of vitamin D on behavior, inflammation, metabolism and oxidative stress on maple syrup urine disease in animal model
Número do protocolo Protocol number	61/2021 adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	Emilio Luiz Streck
Pesquisadores Researchers	Alex Paulo Zeferino Padilha, Beatriz da Costa Chade, Caion Alves Rodrigues, Carolina Giassi Alano, Catharina de Bem Ribeiro, Isabela da Silva Lemos, Isabela Corrêa de Oliveira, Julia dos Santos Fragnani, Karoline Teixeira Fermo, Lara Resendes Cichella, Larissa Raupp Maciel, Laura Schmitt Quinsani, Laura Uggioni Elíbio, Maria Eduarda Mendes Botelho, Monique Cardoso André, Natália Maciel Andrade, Nicolay Serafim Martinello, Rafael Orestes Canarim, Rafaela Tezza Matiola, Rejane de Figueiredo Seldenreich, Thiago Amorim Cunha do Nascimento. Fernanda Daminelli Eugenio, Flávia Saccon Niero, Kevan Souza Cadorin, Laisa Nazário dos Santos, Laura de Araujo Borba, Leticia Manfredini Leonardo, Livia Simoni Maccari, Maria Eduarda Carlos Martins, Natália Colombo Bonassi, Thaine Possamai, Vitória Alexandre Costa.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/09/2021 a 25/09/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	7 dias / 20g
Número de animais	Masculino 136
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 09 de agosto de 2022.

Josiane Budni
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA