

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – UNASAU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS

THAIS CERESÉR VILELA

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MORTE CELULAR
POR APOPTOSE EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DO XAROPE
DO BORDO**

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2012

THAIS CERESÉR VILELA

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MORTE CELULAR
POR APOPTOSE EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DO XAROPE
DO BORDO**

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. Emílio Luiz Streck

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

V699a Vilela, Thais Caresér.

Avaliação dos mecanismos envolvidos na morte celular por apoptose em um modelo animal de doença do xarope do bordo. / Thais Caresér Vilela ; orientador: Emílio Luiz Streck. – Criciúma : Ed. do Autor, 2012.
60 f. : il. ; 21 cm.

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

1. Doença do xarope do bordo. 2. Apoptose. 3. Aminoácidos de cadeia ramificada. 4. Erros inatos do metabolismo. I. Título.

CDD 22. ed. 616.042

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 Bioenergética do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense em colaboração com o Centro de Estudos em Estresse Oxidativo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*Aos meus pais Mário e Walkyria, pela vida,
pelo amor e pelo apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família que sempre apoiou cada etapa da minha vida me dando coragem e principalmente amor. Mãe, pai, Ju e Maria Luiza, essa conquista também é de vocês!

Ao meu amor Stéfano, pelo companheirismo, dedicação, compreensão e carinho, sem os quais não teria concluído esse projeto.

A minha grande amiga Heloisa pelo incentivo e apoio.

A todas minhas colegas e amigas de laboratório Gabriela, Ândrea, Cinara, Camila, Dhébora e Giselli, pela imprescindível colaboração na realização deste trabalho, pela amizade, conversas, risadas e apoio durante todo esse tempo.

A todos os professores do Mestrado em Ciências da Saúde, que me ensinaram e orientaram ao longo do curso.

Ao meu orientador Emilio Streck, pela orientação com dedicação e objetividade permitindo meu crescimento profissional e pessoal através dos conhecimentos compartilhados durante a elaboração da dissertação.

A todos vocês meu muito obrigada!!

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein

RESUMO

A doença do xarope do bordo (DXB) é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência na atividade do complexo da desidrogenase dos α cetoácidos de cadeia ramificada. Como consequência desse bloqueio ocorre o acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina, bem como seus α cetoácidos e α hidroxíácidos correspondentes. As principais características clínicas apresentadas pelos pacientes com DXB incluem cetoacidose convulsões, apnéia, hipoglicemia, coma, ataxia, retardo psicomotor e retardo mental, bem como edema generalizado e hipomielinização/desmielinização, como evidenciado por estudos de ressonância magnética do sistema nervoso central (SNC). No entanto, os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelos sintomas neurológicos apresentados pelos pacientes com DXB ainda são pouco conhecidos. No presente estudo investigou-se os efeitos da administração aguda de um *pool* de AACR sobre o imunoconteúdo de alguns marcadores envolvidos na morte celular por apoptose (Bax, Bcl-2, Bcl-xL, caspase 3 e caspase 8), para melhor compreender a fisiopatologia da disfunção neurológica presente nos pacientes com DXB. Ratos Wistar de 10 e 30 dias de vida receberam três administrações de um *pool* de AACR (15,8 μ L/g de peso corporal), com intervalo de 1 hora entre as administrações, por via subcutânea (grupo teste). Os animais do grupo controle receberam três administrações de salina, com intervalo de 1 hora entre as administrações, por via subcutânea. Uma hora após a última administração, os ratos foram mortos por decapitação, o cérebro foi removido e o hipocampo e córtex cerebral foram isolados. A quantificação das proteínas Bax, Bcl-2, Bcl-xL e as caspases 3 e 8 foram mensuradas por Western blotting. Em ratos de 30 dias foi observado um aumento no imunoconteúdo do fator pró-apoptótico Bax e das caspases 3 e 8 no córtex cerebral, por outro lado, houve diminuição das caspases 3 e 8 concomitantemente com aumento dos fatores anti-apoptóticos Bcl-2 e Bcl-xL no hipocampo. Estes resultados sugerem que os AACR induzem apoptose, ativada pela via extrínseca, seguida da ativação da via intrínseca, no córtex cerebral, porém no hipocampo os parâmetros analisados não demonstram alterações. Os presentes resultados contribuem para explicar, pelo menos em parte, as sequelas neurológicas associadas às altas concentrações plasmáticas dos metabólitos acumulados na doença do xarope do bordo.

Palavras-chave: Doença do xarope do bordo, apoptose, aminoácidos de cadeia ramificada.

ABSTRACT

Maple syrup disease (MSUD) is an inborn error of metabolism caused by a deficiency of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex activity. This blockage leads to accumulation of the branched-chain amino acids (BCAA) leucine, isoleucine and valine, as well as their corresponding α -keto acids and α -hydroxy acids. The major clinical features presented by MSUD patients include convulsions, ketoacidosis, apnea, hypoglycemia, coma, ataxia, psychomotor delay and mental retardation, as well as generalized edema and hypomyelination/demyelination, as evidenced by magnetic resonance imaging studies of the central nervous system (CNS). However, the pathophysiological mechanisms of the neurological symptoms presented by MSUD patients are still poorly understood. In this study, we investigated the effects of acute administration of BCAA pool (leucine, isoleucine and valine) on immunoccontent of some markers involved in cell death by apoptosis (Bax, Bcl-2, Bcl-xL, caspase 3 and caspase 8), to better understand the pathophysiology of neurologic dysfunction seen in patients with MSUD. Wistar rats of 10 and 30 days received three subcutaneous administrations of the BCAA pool (15.8 μ L/g bodyweight at 1-h intervals) with one hour interval between administrations (test group). The control group received three injections of saline with 1 hour interval between injections, or saline alone (control group). One hour after the last administration, the rats were killed by decapitation, the brain was removed and hippocampus and cerebral cortex were isolated. Quantification of Bax, Bcl-2, Bcl-xL, caspase 3 and caspase 8 proteins were measured by Western blotting. In rats of 30 days was observed increase of pro-apoptotic factor Bax and caspase 3 and 8 immunoccontent in the cerebral cortex, on the other hand, decreased caspase 3 and 8 concomitant increase in anti-apoptotic factor Bcl-2 and Bcl-xL in the hippocampus. These results suggest that the AACR induce apoptosis, activated by extrinsic pathway, followed by activation of the intrinsic pathway in the cerebral cortex, however, in the hippocampus the parameters analyzed show no change. The present results help to explain, at least in part, neurologic sequelae associated with high plasma concentrations of metabolites accumulated in the disease of maple syrup.

Keywords: Maple Syrup Disease, apoptosis, branched chain amino acids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina.....	26
Figura 2. Vias de execução de apoptose: Via intrínseca (mitocondrial) e via extrínseca	29
Figura 3. Efeitos da administração aguda de um <i>pool</i> de AACR em ratos de 10 dias de vida sobre o imunoconteúdo de Bax no cérebro	35
Figura 4. Efeitos da administração aguda de um <i>pool</i> de AACR em ratos de 30 dias de vida sobre o imunoconteúdo de Bax no cérebro.....	36
Figura 5. Efeitos da administração aguda de um <i>pool</i> de AACR em ratos de 10 dias de vida sobre imunoconteúdo de Bcl-2 no cérebro	37
Figura 6. Efeitos da administração aguda de um <i>pool</i> de AACR em ratos de 30 dias de vida sobre o imunoconteúdo de Bcl-2 no cérebro.....	38
Figura 7. Efeitos da administração aguda de um <i>pool</i> de AACR em ratos de 10 dias de vida sobre o imunoconteúdo de Bcl-xL no cérebro.....	39
Figura 8. Efeitos da administração aguda de um <i>pool</i> de AACR em ratos de 30 dias de vida sobre o imunoconteúdo de Bcl-xL no cérebro.....	40
Figura 9. Efeitos da administração aguda de um <i>pool</i> de AACR em ratos de 10 dias sobre o imunoconteúdo de caspase3 no cérebro.....	41
Figura 10. Efeitos da administração aguda de um <i>pool</i> de AACR em ratos de 30 dias sobre o imunoconteúdo de caspase3 no cérebro.....	42
Figura 11. Efeitos da administração aguda de um <i>pool</i> de AACR em ratos de 10 dias de vida sobre o imunoconteúdo de caspase 8 no cérebro	43

Figura 12. Efeitos da administração aguda de um *pool* de AACR em ratos de 30 dias de vida sobre o imunoconteúdo de caspase 8 no cérebro.....44

LISTA DE ABREVIATURAS

AACR – aminoácidos de cadeia ramificada

AIF – fator indutor de apoptose

Apaf -1 – fator de ativação apoptótico protease 1 / apoptotic protease activating factor-1

Bad – antagonista de Bcl-2 associado a morte celular

Bax – proteína X associada a Bcl-2

Bcl-2 – proteínas de células B

Bcl-xL – linfoma de células B-extra grande

BHE – barreira hemato-encefálica

Bid – antagonista de domínio de morte associado a BH3

CCR – α cetoácidos de cadeia ramificada

CIC – ácido α -cetoisocapróico

CIV – ácido α -cetoisovalérico

CMV – ácido- α -ceto- β -metilvalérico

DCCR – desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada

DNA – ácido desoxirribonucléico

DXB – doença do xarope do bordo

E1 – α -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada

E2 – dihidrolipoil transacilase

E3 – dihidrolipoamida desidrogenase

EIM – erros inatos do metabolismo

FAD – dinucleótido de adenina e flavina

FADD – molécula adaptadora do domínio de morte

GABA – ácido gama aminobutírico

GABA_A – ácido gama aminobutírico

GFAP – proteína glial fibrilar ácida

HIC – ácido α -hidroxi-isocapróico

HIV – ácido α -hidroxi- isovalérico

HMV – ácido α -hidroxi- β -metilvalérico

IAP – proteínas inibidoras de apoptose

MOMP – permeabilização da membrana mitocondrial externa

NGF – fator de crescimento neural

PBS – Tampão fosfato-salino/ phosphate buffered saline

RE – retículo endoplasmático

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SNC – sistema nervoso central

TNF – fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Erros inatos do metabolismo	14
1.2 Doença do Xarope do Bordo	15
1.2.1 Histórico.....	15
1.2.2 Etiologia.....	15
1.2.3 Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada	16
1.2.4 Diagnóstico.....	18
1.2.5 Fenótipos Clínicos	19
1.2.6 Tratamento	21
1.2.7 Neuropatologia	22
1.2.8 Fisiopatologia	22
1.3 Apoptose	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 Geral.....	30
2.2 Específicos	30
3 METODOLOGIA.....	31
3.1 Animais experimentais	31

3.2 <i>Pool</i> de aminoácidos de cadeia ramificada	32
3.3 Administração do <i>pool</i> de AACR	32
3.4 Estudos <i>In vivo</i>	32
3.4.1 Administração aguda.....	32
3.5 Análise dos parâmetros de apoptose por <i>Western Blotting</i>	33
3.6 Análise Estatística	34
4 RESULTADOS	35
5 DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Erros inatos do metabolismo

Archibald Garrod apresentou o conceito de erros inatos do metabolismo (EIM) em 1908, ao publicar seus estudos sobre distúrbios metabólicos como o albinismo, alcaptonúria, cistinúria e pentosúria. Garrod relacionou o defeito de uma enzima com o defeito em um único gene, observando que as doenças metabólicas estudadas eram transmitidas em conformidade com as leis de Mendel (Rose et al., 1962).

Os EIM são distúrbios metabólicos hereditários, na maioria das vezes, de herança autossômica recessiva, cuja característica principal é a ausência ou a deficiência da atividade de uma enzima específica, ou ainda o defeito no transporte de proteínas. O resultado dessa interrupção na via metabólica resulta no acúmulo de substâncias, normalmente, presentes em pequena quantidade, ausência de produtos intermediários essenciais, deficiência de produtos finais específicos ou ainda excesso prejudicial de vias metabólicas secundárias (Karam, 2001).

A maioria dos EIM manifesta-se com sintomas agudos e só são compatíveis com a sobrevivência se sua causa for eliminada. Por outro lado, alguns erros metabólicos são assintomáticos e não acarretam doenças ou ainda são sintomáticos, mas não causam grandes danos (Borges-Osório, 2001). Dependendo do grau da deficiência enzimática, das áreas envolvidas e dos tecidos afetados, pacientes, com algum tipo de EIM, apresentam variações fenotípicas. Além disso, a maioria dos pacientes apresenta comprometimento do sistema nervoso central

(SNC) com retardo neuropsicomotor e neurodegeneração progressiva (Burton, 1987).

Mais de 500 EIM até o momento foram descritos, a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Scriver et al., 2001). Embora individualmente raras, essas doenças em seu conjunto afetam aproximadamente 1 a cada 500/2.000 recém nascidos vivos (Baric et al., 2001).

1.2 Doença do Xarope do Bordo

1.2.1 Histórico

A Doença do Xarope do Bordo (DXB) foi descrita pela primeira vez em 1954, por Menkes e colaboradores ao analisarem uma doença degenerativa cerebral em quatro membros de uma mesma família. Os sintomas neurodegenerativos apareciam na primeira semana de vida com desfecho fatal durante os três meses seguintes. O odor de açúcar queimado na urina era a principal característica encontrada nos quatro pacientes, o que originou o nome da doença (Chuang & Shih, 2001). Mackenzie e colaboradores, em 1959, questionaram o nome dado à doença, pois não havia nenhuma razão lógica escolher um nome de outra substância, no caso o xarope extraído de plantas do gênero *Acer*, para fornecer o nome para a doença.

1.2.2 Etiologia

A DXB é um distúrbio metabólico de herança autossômica recessiva causado pela deficiência na atividade do complexo multienzimático desidrogenase de α -cetoácidos de cadeia ramificada (DCCR). Dessa forma, ocorre o acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina. Estudos demonstraram que além do acúmulo dos AACR, existe o acúmulo de seus correspondentes α cetoácidos de cadeia ramificada (CCR) ácido α -cetoisocapróico (CIC), ácido- α -ceto- β -metilvalérico (CMV) e ácido α -cetoisovalérico (CIV), provenientes de leucina, isoleucina e valina, respectivamente. Assim, observou-se que o bloqueio metabólico ocorria na segunda etapa do metabolismo dos AACR, ou seja, na descarboxilação oxidativa dos α cetoácidos (Dancis et al., 1960; Patrick, 1961).

Pelo menos quatro genes podem estar envolvidos com a doença: o gene BCKDHA localizado no cromossomo 19q13.1-q13.2, o gene BCKDHB localizado no cromossomo 6p21-q22, o gene DBT localizado no cromossomo 1p31 e o gene DLD localizado no cromossomo 7q31-q32 (Chuang & Shih, 2001).

1.2.3 Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada

A leucina, isoleucina e valina são aminoácidos essenciais constituídos por quatro ou mais átomos de carbono com uma função metila que ramifica a cadeia de carbonos na posição 3 ou 4. Na célula, os AACR compartilham as três primeiras etapas para sua oxidação. A primeira etapa é a transaminação reversível pelas

aminotransferases de cadeia ramificada, que podem ser citosólicas ou mitocondriais, produzindo CIC, CIV e CMV provenientes de leucina, isoleucina e valina respectivamente. Na segunda etapa os CCR são transportados para o interior da mitocôndria onde sofrem descarboxilação oxidativa irreversível catalisada pelo DCCR. Nesta mesma via metabólica, os CCR originam seus hidroxiácidos: ácido α -hidroxi-isocapróico (HIC), ácido α -hidroxi- isovalérico (HIV) e ácido α -hidroxi- β -metilvalérico (HMV). Isovaleril-CoA, α -metilbutiril-CoA e isobutiril-CoA, originados pela descarboxilação oxidativa dos CCR sofrem desidrogenação pelas desidrogenases acil-CoA específicas na terceira etapa do metabolismo dos AACR. Após essas três etapas, o caminho dos produtos originados a partir dos AACR diverge. Succinil-CoA é produzido a partir de valina, acetil-CoA e acetoacetato são os produtos finais da leucina e a isoleucina é degradada até acetil-CoA e succinil-CoA (Figura 1) (Chuang & Shih, 2001).

O DCCR juntamente com piruvato desidrogenase e α -cetogluturato desidrogenase formam um grupo de complexos de desidrogenases de α -cetoácidos bastante conservados que apresentam estrutura e função similares. O DCCR é formado por três componentes catalíticos, o α -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada ou (E1) e o dihidrolipoil transacilase ou (E2), que são específicos do DCCR e o dihidrolipoamida desidrogenase ou (E3), que é comum aos outros dois complexos multienzimáticos (Chuang & Shih, 2001). O defeito em um desses componentes resulta na deficiência da DCCR e conseqüentemente no acúmulo dos AACR e seus CCR. Além disso, o DCCR possui duas enzimas regulatórias, uma quinase e uma fosfatase, que regulam a fosforilação e a desfosforilação do complexo.

O E1 catalisa a descarboxilação dos CCR reduzindo a molécula a lipoil, que é covalentemente ligada a E2. A molécula do lipoil reduzida e o domínio lipoil servem como um braço móvel para transferir o grupo acil do componente E1 para CoA, aumentando a quantidade de acil-CoA. Por fim, o E3 que é ligado ao flavina adenina dinucleotídeo (FAD) reoxida o resíduo de dihidrolipoil do E2, e sendo o NAD⁺ o último receptor de elétrons. O resultado final da reação da DCCR é a produção de acil-CoA de cadeia ramificada, CO₂ e NADH (Chuang & Shih, 2001).

1.2.4 Diagnóstico

A incidência global da DXB na população em geral é de 1 para 185.000 (Chuang & Shih, 2001). Assim como em todos os erros inatos do metabolismo, o diagnóstico da DXB é fundamentalmente laboratorial, por isso, na maioria dos casos é muito difícil diagnosticar a doença e assim organizar uma dieta adequada em tempo útil para aliviar os efeitos da doença (Westall, 1963).

Elevadas concentrações dos AACR e CCR podem ser detectadas através da análise da urina de pacientes com DXB, diagnosticando a doença. Leucina é o marcador mais importante para o diagnóstico da DXB. Além disso, deve ser verificado se os níveis de atividade enzimática da DCCR estão diminuídos (Chace et al., 1995). A atividade da enzima pode ser medida em fibroblastos da pele, linfócitos ou biópsia de tecido do fígado (Schadewaldt et al., 1999; Schadewaldt et al., 2001). O diagnóstico também pode ser realizado através de espectrometria de massa em Tandem em testes de triagem neonatal para identificação precoce da DXB (Chace et al., 1995).

1.2.5 Fenótipos Clínicos

Os pacientes com DXB, dependendo da mutação, podem manifestar clinicamente a doença através de cinco fenótipos diferentes: clássico, intermediário, intermitente, tiamina-responsivo e dihidrolipoamida desidrogenase (E3) deficiente.

O fenótipo clássico é a manifestação mais comum e concomitantemente mais severa da doença. Aproximadamente 75% dos pacientes com DXB apresentam essa forma da doença e a atividade da DCCR situa-se entre 0% a 2% do normal. Os níveis de AACR, particularmente a leucina, aumentam consideravelmente no sangue, líquor e urina, e a presença de aloisoleucina é o que caracteriza este tipo de diagnóstico. Pacientes que apresentam quadro de encefalopatia na fase neonatal se enquadram neste fenótipo. Recém-nascidos afetados parecem normais ao nascimento, e os sintomas geralmente se desenvolvem entre 4 e 7 dias de idade. Os sintomas incluem desde letargia, recusa alimentar, hipotonia, hipertonia, hipoglicemia, convulsões e coma. O prognóstico é ruim nos pacientes não tratados. A maioria dos pacientes morre nos primeiros meses de vida devido as crises metabólicas contínuas e deterioração neurológica (Chuang & Shih, 2001).

Pacientes com a forma intermediária da doença apresentam elevações dos níveis de AACR, mas menores que a forma clássica da doença. Não existem episódios da doença no período neonatal e muitos pacientes não têm episódios de descompensação metabólica aguda. A atividade residual da DCCR é geralmente maior que na forma clássica, variando entre 3 a 30% do normal (Chuang & Shih, 2001).

Pacientes com fenótipo intermitente caracterizam-se por apresentar desenvolvimento inicial normal, no entanto podem sofrer descompensação

metabólica em situação de estresse. A atividade da DCCR situa-se entre 5% a 20% do normal. Os sintomas iniciais aparecem entre cinco meses e dois anos de vida e episódios de mudança comportamental aguda e dificuldade de caminhar podem evoluir para convulsão e estupor ou coma (Chuang & Shih, 2001).

Normalmente os pacientes com a forma responsiva à tiamina não apresentam doença neonatal aguda e suas manifestações clínicas são semelhantes as da forma intermediária da doença. A concentração dos AACR no plasma é aproximadamente cinco vezes maior que o normal, no entanto estes níveis podem ser reduzidos para níveis normais com doses de 10mg por dia de tiamina e com dieta restrita de proteínas (Chuang & Shih, 2001).

Menos de vinte pacientes foram descritos com a deficiência de lipoamida desidrogenase. É um distúrbio raro. O fenótipo é similar ao intermediário, porém os pacientes apresentam acidose láctica severa. Quando comparado com a forma clássica, os níveis de AACR estão levemente ou moderadamente aumentados no plasma, e aloisoleucina foi observado em um paciente com essa deficiência (Taylor et al., 1978). Os pacientes apresentam a deficiência das três enzimas desidrogenases em que E3 é componente, a piruvato desidrogenase, α -cetoglutarato desidrogenase e a DCCR. Pacientes com essa forma da doença não apresentam sintomas nos primeiros meses de vida, porém, uma leve acidose metabólica foi observada em dois pacientes. Entre oito semanas e seis meses de vida, quando surge a acidose láctica, pode ocorrer deterioração neurológica progressiva além de hipotonia, atraso de desenvolvimento e distúrbio do movimento e encefalopatia similar a de Leigh (Chuang & Shih, 2001).

1.2.6 Tratamento

O tratamento da DXB consiste numa dieta restrita de proteínas para normalizar as concentrações dos AACR no sangue e minimizar a acumulação dos mesmos. Um dos riscos no tratamento de crianças com dietas totalmente sintéticas está na disponibilidade de todos os fatores de crescimento necessários. Mesmo se todas as vitaminas conhecidas estão incluídas não existe a certeza de que a dieta é nutricionalmente completa. Portanto, é administrado um leite especial com concentrações dos AACR diminuídas, porém rico em gordura, mistura de minerais e vitaminas (Westall, 1963). Além disso, a administração com tiamina também é aconselhável a todos os pacientes recém diagnosticados para determinar a resposta à tiamina.

Se o acúmulo dos AACR e dos seus respectivos CCR for de tal forma que comprometa a função cerebral (fase aguda), é indicado um tratamento mais agressivo. Sendo assim, a melhora clínica não é possível até o catabolismo ser invertido. Para isso é realizada uma rápida remoção dos metabólitos tóxicos e/ou a promoção do anabolismo. A remoção dos metabólitos pode ser realizada por diálise peritoneal ou transfusão sanguínea com aparente melhora no quadro neurológico. Em último caso o transplante de fígado, órgão em que se encontra a principal atividade do DCCR, pode ser indicado (Jan et al., 1994).

1.2.7 Neuropatologia

Em diversos estudos pacientes com DXB apresentaram encefalopatia com edema cerebral. Além disso, pode ocorrer edema intenso localizado envolvendo o tronco cerebral dorsal, os pedúnculos cerebrais e a cápsula interna. Além disso, também foi observado hipodensidade difusa no globo pálido e tálamo, afetando a substância branca dessas regiões, indicando hipomielinização. A atrofia cerebral na fase aguda do edema é indicada através do alargamento do sulco sobre os lobos frontais e das fissuras inter-hemisféricas e silviana.

Os metabólitos acumulados na DXB afetam principalmente o trato piramidal da medula espinal, a mielina que circunda o núcleo dentado, o corpo caloso e os hemisférios cerebrais. Da mesma forma que ocorre a deficiência de mielina, os oligodendrócitos também estão reduzidos (Chuang & Shih, 2001).

1.2.8 Fisiopatologia

Os mecanismos tóxicos dos metabólitos acumulados na DXB ainda não estão totalmente compreendidos, porém alguns estudos revelaram que a administração individual dos AACR em pacientes mostrou que o aumento da leucina foi associado com o aparecimento dos sintomas neurológicos, enquanto a isoleucina intensificou o odor de xarope do bordo na urina dos pacientes. No entanto, a administração de valina mostrou-se sem efeitos clínicos. Com base nestas observações, leucina e/ou seu cetoácido são considerados os metabólitos

neurotóxicos na DXB, e sua concentração plasmática é um importante critério para o tratamento de acompanhamento (Chuang & Shih, 2001).

O CIC é considerado o mais tóxico dentre os α -cetoácidos acumulados na doença. O CIC inibe o consumo de oxigênio em cérebro de ratos, a oxidação do 3-hidroxi butirato e provoca deficiência na formação de mielina no cerebelo de ratos (Gibson & Blass, 1976). Além disso, a elevação sérica de leucina e CIC no espaço extracelular altera a concentração no SNC dos aminoácidos transportados pelo transportador dos aminoácidos neutros de cadeia longa (sistema L) que incluem a metionina, valina, isoleucina, triptofano, tirosina, fenilalanina e glutamina (Araújo et al., 2001). Assim, esta diminuição na concentração cerebral de alguns aminoácidos pode afetar a biossíntese de alguns neurotransmissores cerebrais como as catecolaminas e a serotonina (Huang et al., 1996; Zielke et al., 1996).

A atividade da enzima glutamato descarboxilase em homogeneizados de cérebro de ratos foi inibida pela ação da leucina, CIC e CIV em estudo realizado por Tashian, em 1961 (Yielding & Tomkins, 1961), assim como os hidroxiácidos HIC e HIV, porém em menor grau. Como resultado, a produção de ácido gama aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório do SNC, poderia estar reduzida. Além disso, em estudo com modelo animal de DXB em bovinos foi demonstrado uma perda marcante no número de receptores pós-sinápticos ácido gama aminobutírico A ($GABA_A$) (Dodd et al., 1992). Por outro lado, estudos demonstraram que a leucina parece ativar a enzima glutamato desidrogenase (Yielding & Tomkins, 1961). Em relação a enzima acetilcolinesterase, envolvida na manutenção da acetilcolina, foi observado por Scaini e colaboradores (2012 a) um aumento de sua atividade em modelo animal de DXB.

A leucina é absorvida através da barreira hemato-encefálica (BHE) mais rapidamente do que qualquer outro aminoácido. Dessa forma, desempenha um papel importante na manutenção do suprimento do glutamato, importante neurotransmissor excitatório do sistema nervoso, através do ciclo da leucina-glutamato (Yudkoff, 1997). Outros estudos demonstraram ainda que os CCR e AACR inibem a captação de glutamato por vesículas sinápticas em concentrações semelhantes a de pacientes em descompensação metabólica, sugerindo um mecanismo de inibição competitiva entre estes metabólicos (Reis et al., 2000; Tavares et al., 2000).

Amaral e colaboradores (2010) demonstraram ainda que o acúmulo dos metabólitos na DXB pode comprometer a homeostase mitocondrial, pois foi verificado que CIC e leucina inibiram o metabolismo mitocondrial, estando dessa forma, envolvidos na neuropatologia da doença. Além disso, tem sido sugerido que CIC e o CIV causam um déficit energético cerebral em pacientes com a doença decorrente dos prejuízos na respiração celular em fatias de cérebro de ratos, assim como inibem a atividade do complexo piruvato desidrogenase e da enzima α cetoglutarato desidrogenase em mitocôndrias (Howell & Lee, 1963; Danner & Elsas, 1989).

A leucina foi apontada por ser responsável pela hipoglicemia apresentada pelos pacientes com DXB, já que uma das suas propriedades é estimular a secreção de insulina (Panten et al., 1972). Por outro lado, foi demonstrado que os α -cetoácidos CIC, CIV e CMV inibem a oxidação da glicose e a síntese de acetilcolina, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, a enzima ácido graxo sintetase, a oxidação e transporte mitocondrial do piruvato (Gibson & Blass, 1976).

Estudos recentes também demonstraram que ocorre estresse oxidativo na DXB. Fontella e colaboradores (2002) apontaram que a lipoperoxidação em cérebro de ratos jovens é estimulada pelos aminoácidos, α -cetoácidos e α -hidroxiácidos acumulados na DXB. O que foi confirmado por Bridi e colaboradores (2003; 2005) ao verificar que os AACR e seus respectivos CCR estimulam a lipoperoxidação e, além disso, reduzem as defesas antioxidantes em córtex cerebral de ratos. Da mesma forma, Barschak e colaboradores (2009) em estudo realizado em pacientes com DXB sugeriram que houve um aumento na produção de radicais livres e uma diminuição da atividade antioxidante, gerando o estresse oxidativo.

Além disso, um estudo realizado em modelo animal de DXB observou que a administração dos AACR causa danos ao DNA. Sabendo que o estresse oxidativo pode estar envolvido com o dano ao DNA, estes pesquisadores avaliaram também os efeitos de tratamento antioxidante na prevenção dos danos e observaram que o tratamento foi capaz de evitá-los (Scaini et al., 2012 b).

Funchal e colaboradores (2004) evidenciaram que os CCR foram capazes de alterar a fosforilação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) na linhagem de glioma C6. Essa alteração de fosforilação causou uma reorganização do citoesqueleto de GFAP e um aumento no imunoconteúdo da GFAP na fração citoesquelética. Também foi verificado que os CCR levaram a uma reorganização dos filamentos de GFAP e do citoesqueleto de actina de astrócitos em cultura, causando uma importante alteração na morfologia destas células. As alterações do citoesqueleto levaram a morte celular progressiva quando os astrócitos foram expostos por várias horas aos metabólitos (Funchal et al., 2004).

Jouvet e colaboradores (2000) demonstraram ainda que os AACR e CCR ativam apoptose em células gliais e neuronais in vitro e in vivo, explicando, pelo menos em parte, os danos neurológicos observados em pacientes com DXB.

Deve-se enfatizar, no entanto, que a fisiopatologia da disfunção neurológica presente nos pacientes com DXB ainda não está completamente esclarecida.

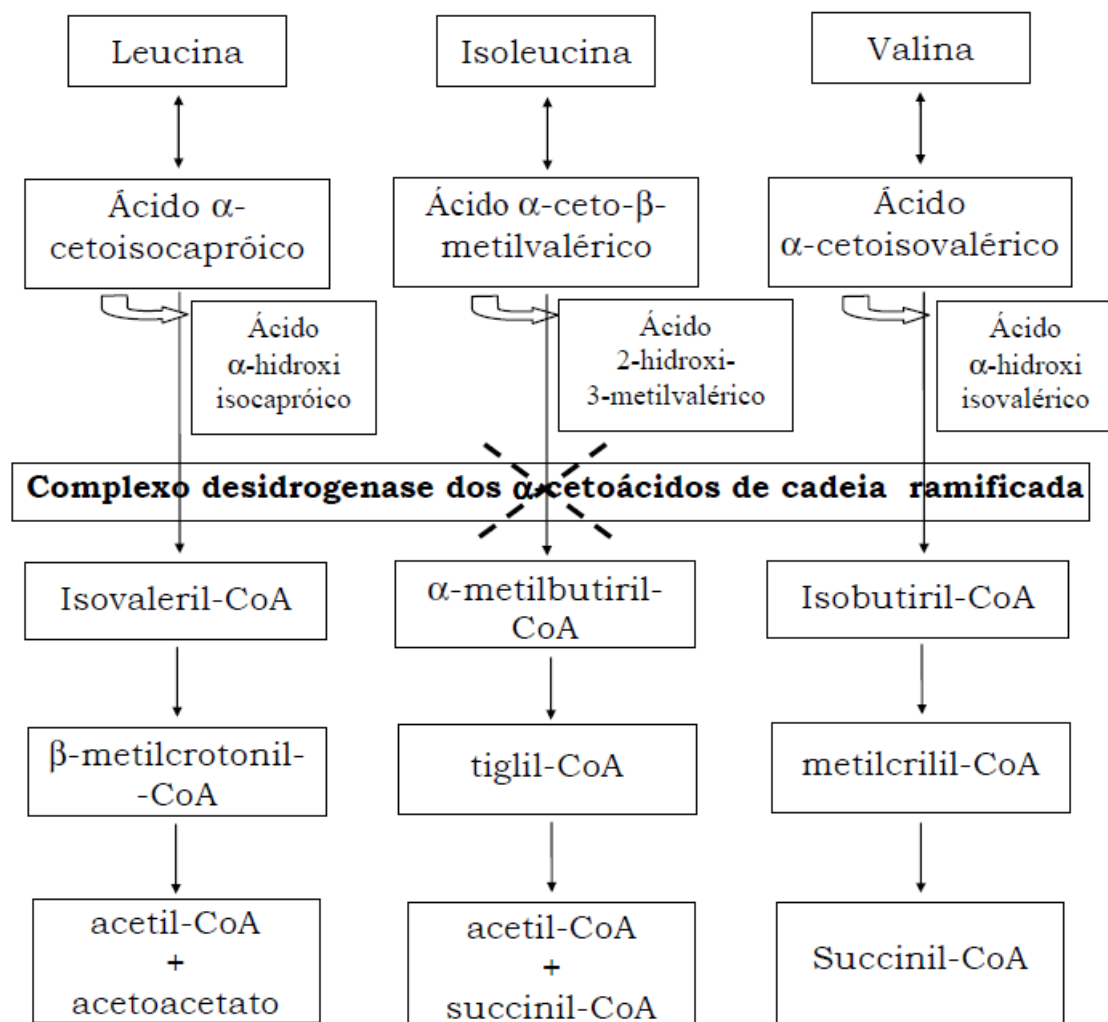


Figura 1. Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina, mostrando a etapa em que a enzima é deficiente nos pacientes com DXB. (Adaptado de Scriver et al., 2001)

1.3 Apoptose

Duas formas de morte celular são conhecidas atualmente: a necrose e a apoptose. A necrose pode ser causada por agentes físicos e químicos e apresenta características morfológicas e bioquímicas distintas, que desencadeiam processo inflamatório, atingindo as células vizinhas (Siegel et al., 1999). A apoptose, por outro lado, foi associada ao termo "morte celular programada", proposto por Lockshin em 1964 ao designar um tipo de morte celular que ocorre de forma programada (Gewies & Grimm, 2003). Neste processo ocorre a condensação do citoplasma e núcleo juntamente com a fragmentação do DNA em oligômeros. Por fim, os "corpos apoptóticos" formados pela fragmentação das células são fagocitados pelas células do sistema retículo-endotelial (Siegel et al., 1999).

Atualmente se sabe que a apoptose é um processo vital para o desenvolvimento embrionário, para manutenção da homeostase tecidual e para o funcionamento do sistema imune. Diversas condições patológicas podem aparecer em decorrência de qualquer tipo de alteração no processo apoptótico, como doenças neurodegenerativas, doenças auto-imunes e câncer (Cory et al., 2002; Cory et al., 2003).

A apoptose é decorrente da ativação das caspases, pertencentes à família das cisteínas-proteases que se tornam ativas após a clivagem proteolítica de resíduos do ácido aspártico (Nicholson et al., 1997). Mais de 12 caspases humanas são conhecidas atualmente, sendo que as caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10 estão envolvidas no processo apoptótico (Earnshaw et al., 1999; Thornberry et al., 1998). Diferentes caspases são ativadas dependendo da via de execução de apoptose, que pode ser pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial).

Na via extrínseca ocorre a ativação dos receptores de membrana da superfamília TNF (Tumor Necrosis Factor) por ligantes específicos. Estas proteínas apresentam um domínio extracelular rico em cisteína e um domínio intracelular denominado “domínio de morte”. Após a ligação com seu ligante, ocorre a trimerização do receptor, que então irá interagir com uma molécula conhecida como FADD (molécula adaptadora do domínio de morte) que, por sua vez, recrutará a procaspase 8 iniciando uma cascata de caspases que executará morte por apoptose (figura 2) (Naismith et al., 1998; Daniel et al., 2001) .

A via intrínseca é desencadeada em consequência de diferentes sinais de estresse intracelular como danos no DNA, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias ou ainda a deprivação de fatores de crescimento (Hengartner, 2000). Estes sinais irão convergir para mitocôndria, induzindo sua permeabilização (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization-MOMP) e por fim, a liberação de moléculas pró apoptóticas (Desagher & Martinou, 2000). Neste sentido, as proteínas da família Bcl-2, divididas entre proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 e A1) e proteínas pró-apoptóticas (Bad, Bid, Bax e Bak), participam ativamente da regulação da apoptose, sendo que a homeostasia é mantida pelo controle da quantidade destas proteínas. As proteínas pró-apoptóticas, quando há sinal de apoptose, inibem as proteínas anti-apoptóticas e promovem a abertura de poros na membrana da mitocôndria, desencadeando MOMP (Chipuk et al., 2006). Assim, o citocromo c, uma das proteínas liberadas para o citosol, forma um complexo com a proteína Apaf-1 que recrutará a caspase iniciadora 9 formando o chamado apoptossomo. A caspase 9 ativada, por sua vez, ativa a caspase 3 e 7, desencadeando apoptose. Esta via ainda pode ser regulada pelas proteínas inibidoras de apoptose (IAP) que inibem a ação das caspases 9, 3 e 7. Já as IAPs são inibidas pelas proteínas Smac/DIABLO,

que são liberadas para o citosol juntamente com o citocromo c (Figura 2) (Munoz-Pinedo et al., 2006).

Sendo assim, sabendo que diversas condições patológicas podem aparecer em decorrência de qualquer tipo de alteração no processo apoptótico, e que são poucos os trabalhos que relacionam erros inatos do metabolismo com apoptose, pretendemos verificar os mecanismos na morte celular por apoptose na doença do xarope do bordo, para melhor compreender a fisiopatologia da doença.

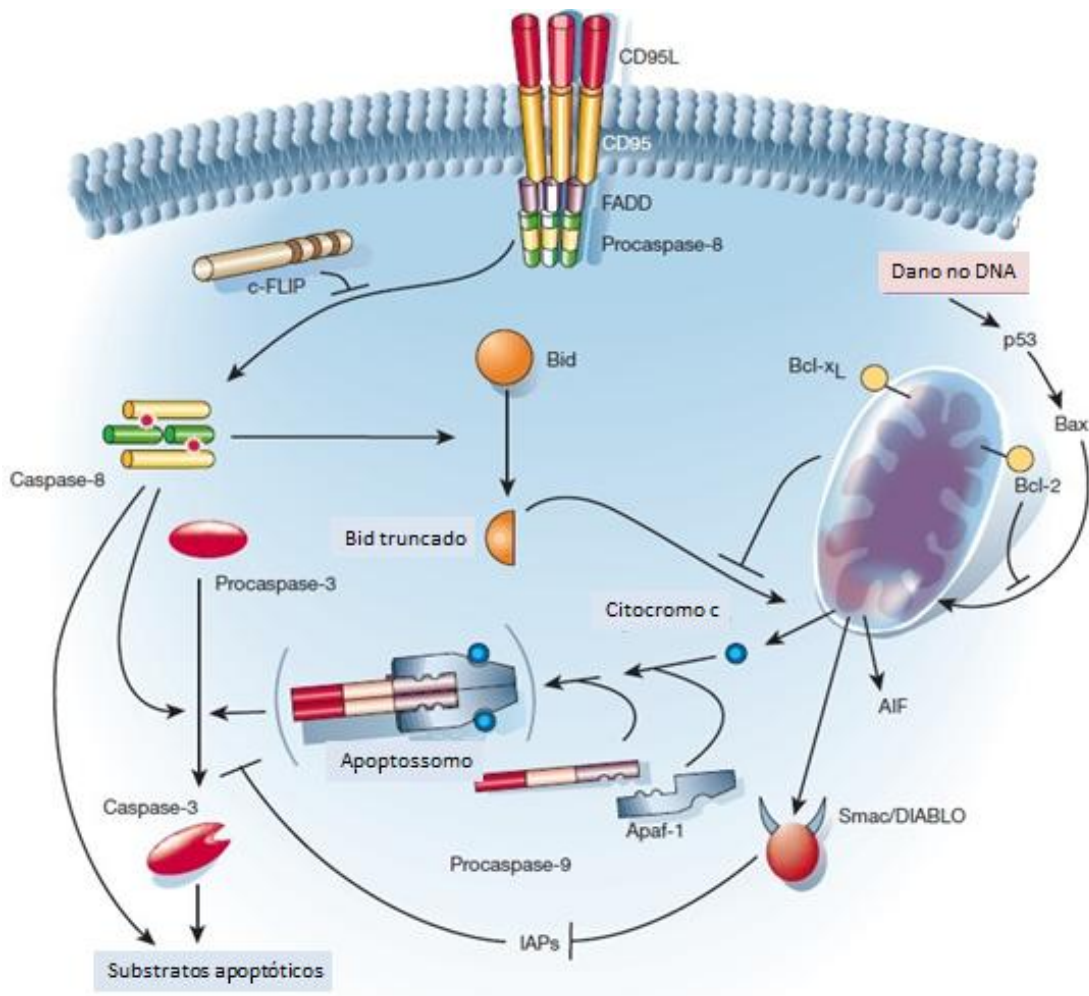


Figura 2. Vias de execução de apoptose: Via intrínseca (mitocondrial) e via extrínseca. (Adaptado de Hengartner, 2000)

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os mecanismos envolvidos na morte celular por apoptose em um modelo animal de Doença do Xarope do Bordo.

2.2 Específicos

- Avaliar o imunoconteúdo de Bax em cérebro (hipocampo e córtex cerebral) de ratos submetidos a um modelo quimicamente induzido de DXB durante seu desenvolvimento.
- Avaliar o imunoconteúdo de Bcl-2 e Bcl-xL em cérebro (hipocampo e córtex cerebral) de ratos submetidos a um modelo quimicamente induzido de DXB durante seu desenvolvimento.
- Avaliar o imunoconteúdo das caspases 3 e 8 em cérebro (hipocampo e córtex cerebral) de ratos submetidos a um modelo quimicamente induzido de DXB durante seu desenvolvimento.

3 METODOLOGIA

Todos os experimentos foram feitos na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC – no Laboratório de Bioenergética.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este projeto foi executado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados 70 ratos machos da linhagem Wistar, infantis (10 dias de idade) e jovens (30 dias) obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram acondicionados em 5 animais por caixa, com ciclo claro - escuro de 12 horas (07:00 - 19:00) (Claro das 7:00 - 19:00) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^{\circ}$ C. A utilização dos animais seguiu um protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética e 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 **60/2010**.

3.2 *Pool* de aminoácidos de cadeia ramificada

Uma solução de aminoácidos de cadeia ramificada, contendo leucina (190 mmol/L), isoleucina (59 mmol/L) e valina (69 mmol/L) foi preparada no dia do experimento em solução salina (0,85%).

3.3 Administração do *pool* de AACR (modelo animal da DXB quimicamente induzido):

Os experimentos foram divididos da seguinte maneira:

- Experimento 1: Administração aguda em ratos infantis (10 dias).
- Experimento 2: Administração aguda em ratos jovens (30 dias).

3.4 Estudos *In vivo*

3.4.1 Administração aguda

Ratos infantis (10 dias) e jovens (30 dias) receberam três administrações de um *pool* de AACR (15,8 μ L/g de peso corporal), com intervalo de 1 hora entre as administrações, por via subcutânea (grupo teste). Os animais do grupo controle receberam três administrações de salina, com intervalo de 1 hora entre as administrações, por via subcutânea (grupo controle) (Bridi et al., 2006). Uma hora

após a última administração, os ratos foram mortos por decapitação, o cérebro foi removido e o hipocampo e córtex cerebral foram isolados.

3.5 Análise dos parâmetros de apoptose por *Western Blotting*

As amostras foram homogeneizadas em tampão PBS. A quantificação das proteínas Bax, Bcl-2, Bcl-xL e as caspases 3 e 8 foram mensuradas por *Western blotting*. Para tanto, as amostras foram homogeneizadas em tampão Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM, SDS pH 6,8, 1%, glicerol 10%) e posteriormente as concentrações proteicas foram analisadas pelo método de Bradford (1976), e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína, sendo utilizado 30 µg de proteínas para a eletroforese em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando gel 8-12%. As proteínas foram separadas, e em seguida, transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando tampão contendo Tris 20 mmol/L, glicina 150 mmol/L, metanol 20% (v/v) e SDS 0,02% (p/v) (pH 8,2) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficos foram bloqueados por uma hora de incubação com solução bloqueadora (5% albumina) em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. As membranas foram processadas por imuno-deteção utilizando os anticorpos primários específicos. Após os anticorpos primários serem removidos, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários. Por fim, as membranas foram reveladas por quimiluminescência. Após a exposição, as membranas foram então retiradas e incubadas com um anticorpo monoclonal de ratos para β -Actina e

os filmes antorradiográficos analisados e quantificados através de um densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT).

3.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos por média \pm desvio padrão da média e analisados utilizando-se o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 16.0 em um computador PC compatível. O teste estatístico utilizado foi o teste *t* de Student's. Considerou-se estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Em um primeiro momento avaliou-se o imunoconteúdo de Bax em ratos de 10 dias. Não houve diferença significativa no hipocampo ($p=0,070$) e córtex cerebral ($p=0,149$) entre o grupo teste e o grupo controle (Figura 3).

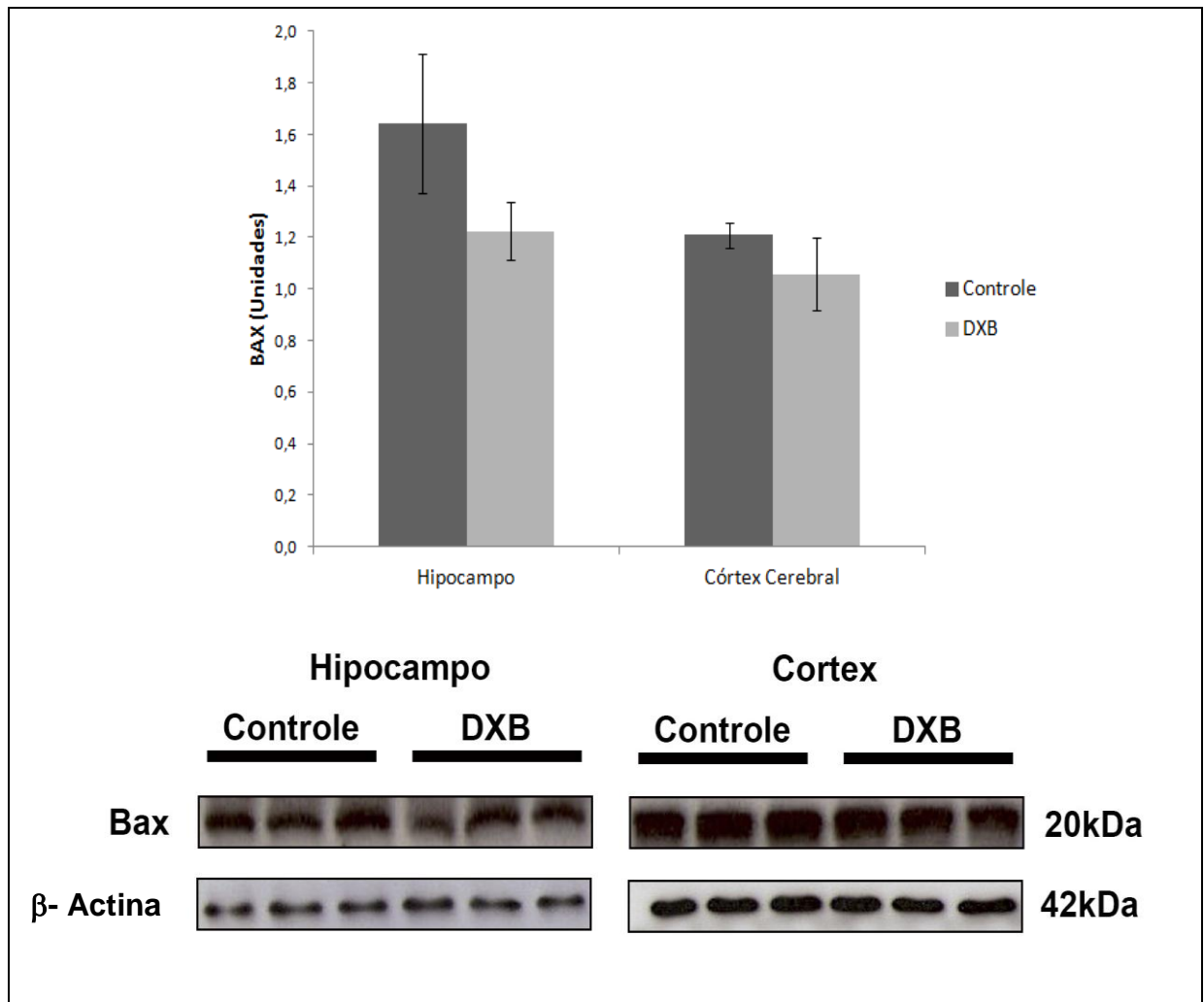


Figura 3. Efeitos da administração aguda de um *pool* de AACR em ratos de 10 dias de vida sobre o imunoconteúdo de Bax no cérebro. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$).

Em ratos de 30 dias também não foram observadas alterações nos parâmetros analisados no hipocampo ($p=0,219$); por outro lado, o imunocnteúdo de Bax aumentou no córtex cerebral ($p= 0,048$) (Figura 4).

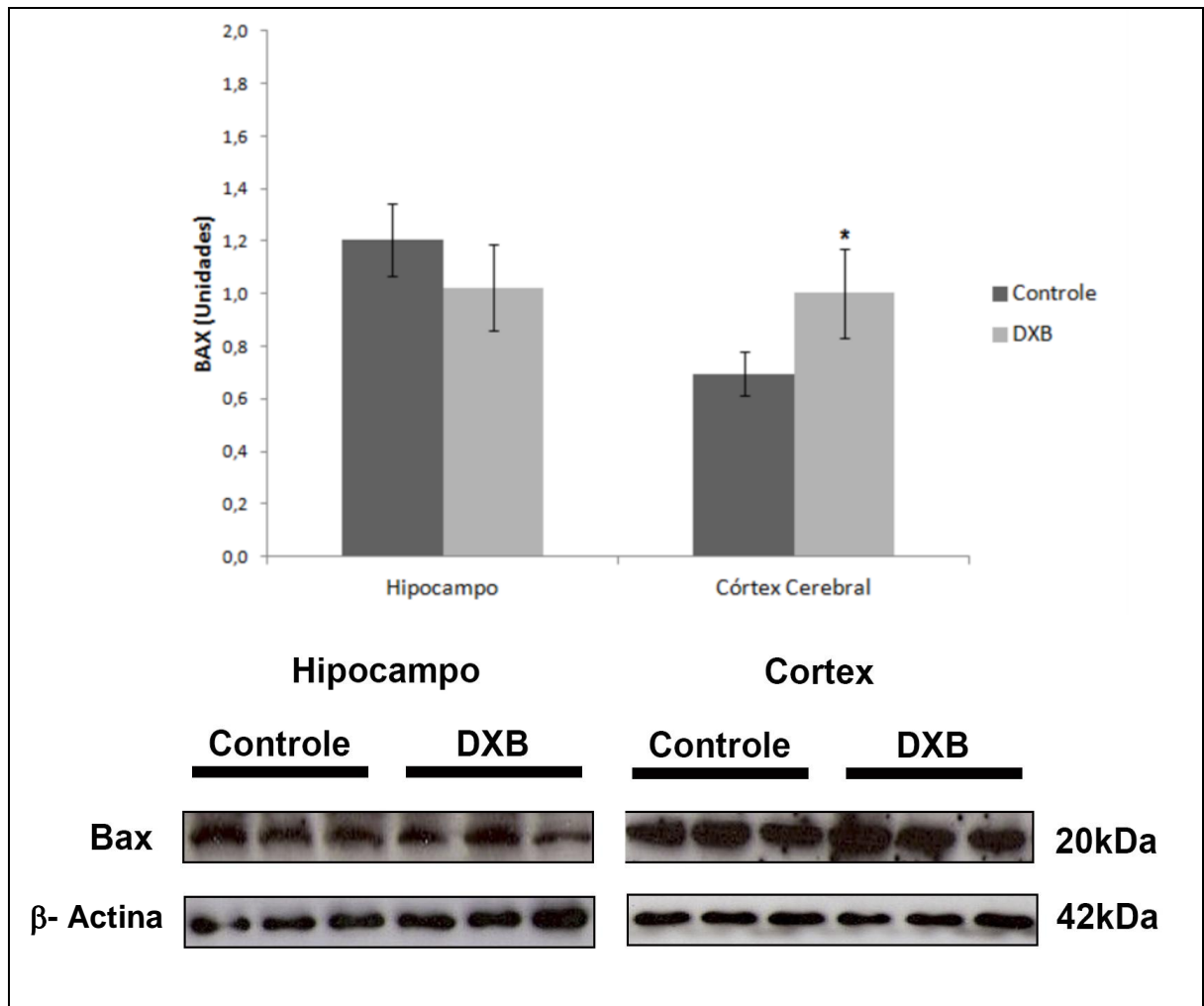


Figura 4. Efeitos da administração aguda de um *pool* de AACR em ratos de 30 dias de vida sobre o imunocnteúdo de Bax no cérebro. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$).
* Diferente do grupo controle $p < 0,05$ (Teste *t* de Student)(A).

Em relação ao imunoconteúdo de Bcl-2 em ratos de 10 dias, também não houve diferença significativa entre o grupo teste e o grupo controle no hipocampo ($p=0,418$) e no córtex cerebral ($p=0,247$) (Figura 5).

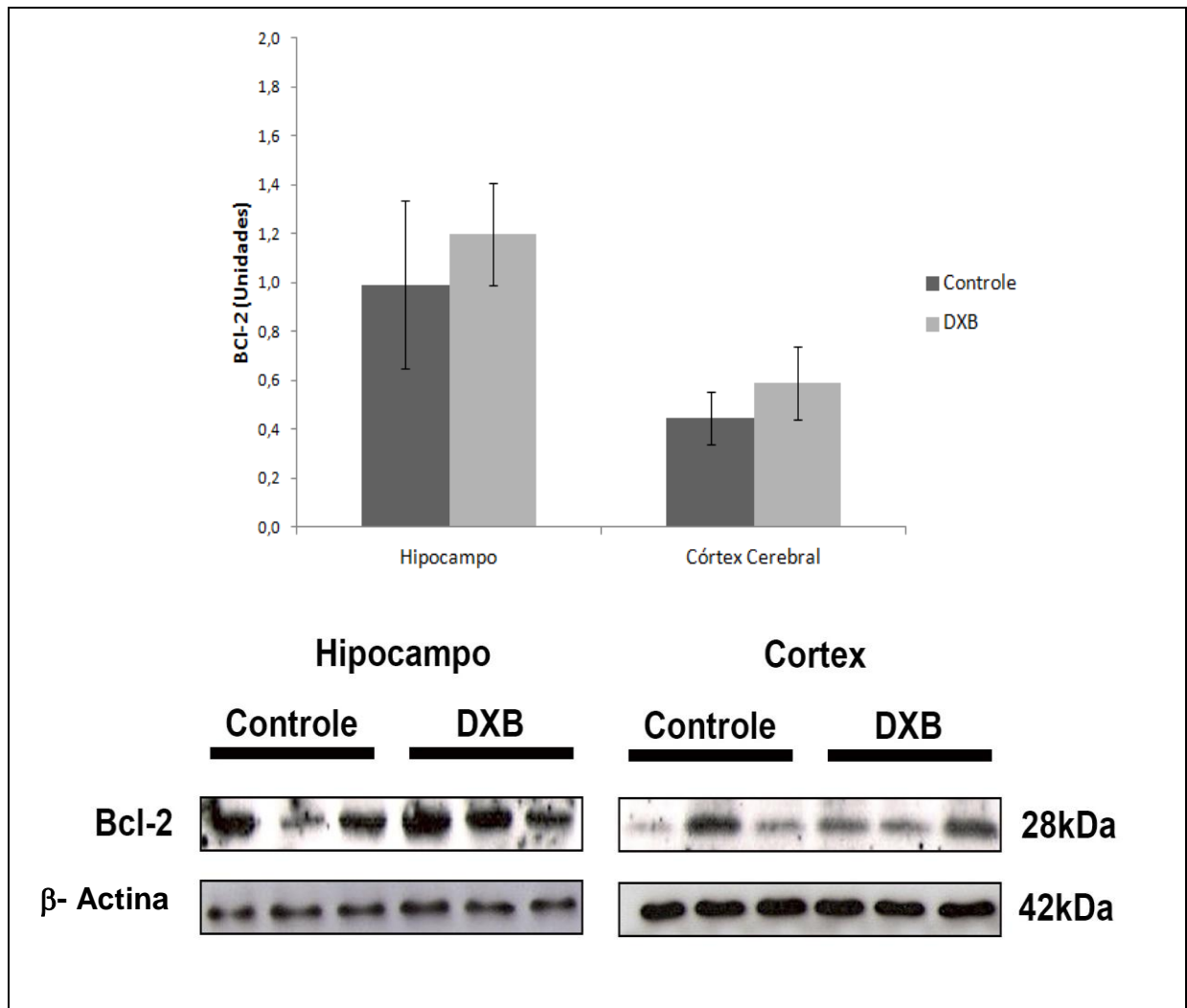


Figura 5. Efeitos da administração aguda de um *pool* de AACR em ratos de 10 dias de vida sobre imunoccontéudo de Bcl-2 no cérebro. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$).

Em ratos de 30 dias houve um aumento do imunoconteúdo de Bcl-2 no hipocampo ($p=0,048$), entretanto, não se observou diferença significativa nos parâmetros analisados no córtex cerebral ($p=0,935$) (Figura 6).

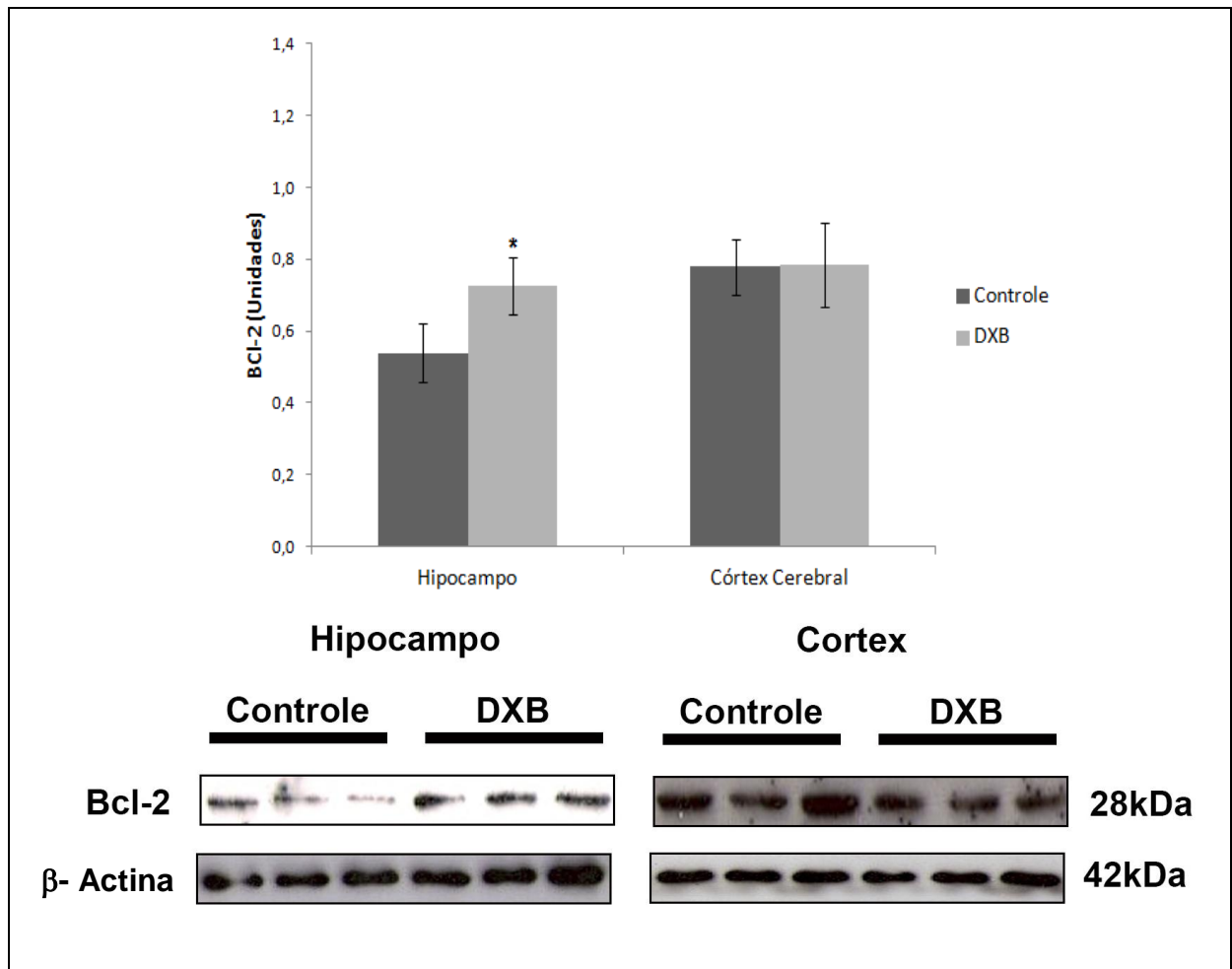


Figura 6. Efeitos da administração aguda de um *pool* de AACR em ratos de 30 dias de vida sobre o imunoccontido de Bcl-2 no cérebro. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$).

* Diferente do grupo controle $p<0,05$ (Teste t de Student).

Os resultados observados em relação ao imunoconteúdo de Bcl-xL foram semelhantes aos encontrados de Bcl-2. Não se observou diferença significativa do imunoconteúdo de Bcl-xL no hipocampo ($p=0,621$) e no córtex cerebral ($p=0,751$) em ratos de 10 dias nos parâmetros analisados (Figura 7).

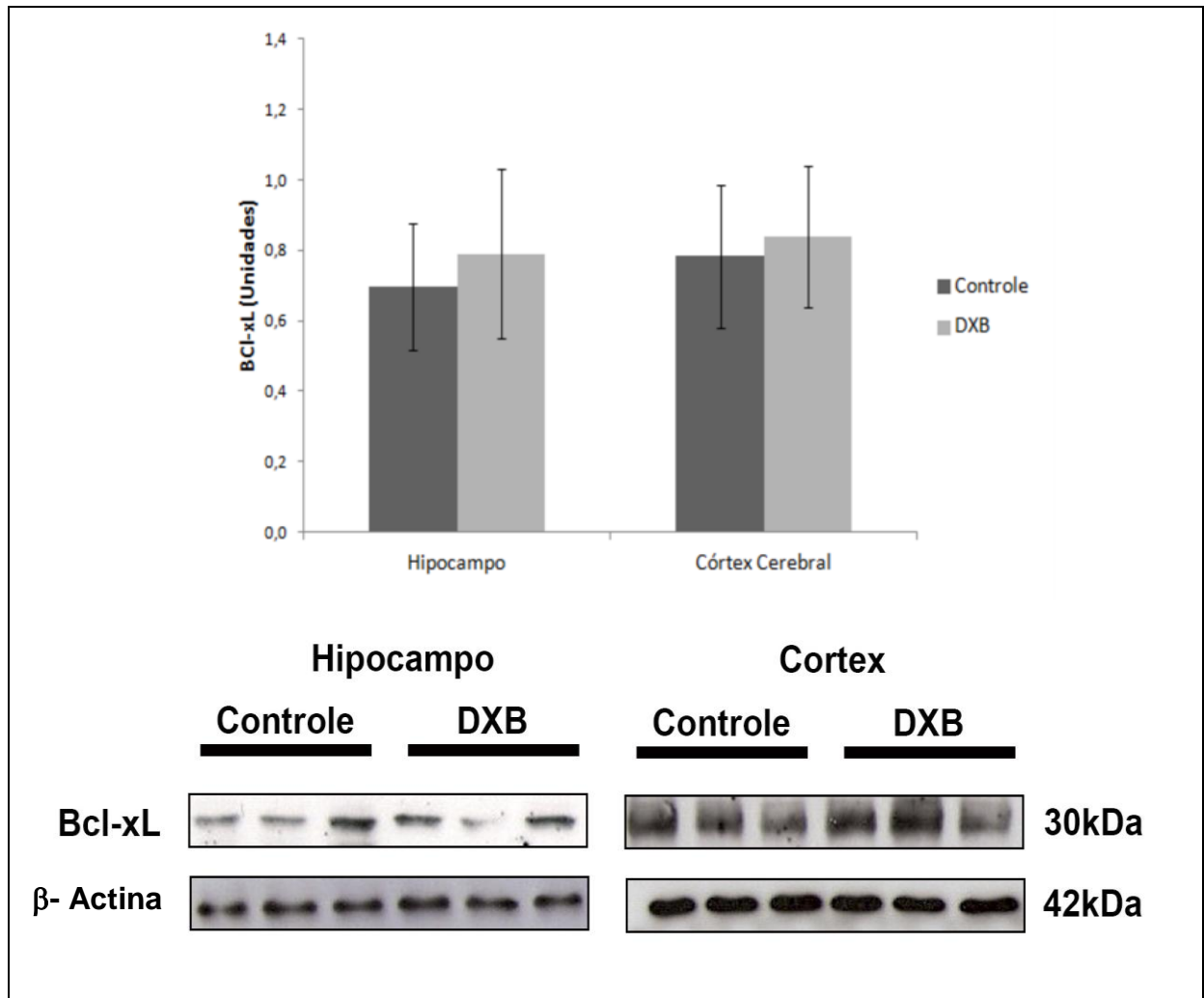


Figura 7. Efeitos da administração aguda de um *pool* de AACR em ratos de 10 dias de vida sobre o imunoccontido de Bcl-xL no cérebro. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$).

Em ratos com 30 dias de vida não se observou diferença significativa entre o grupo teste e o grupo controle no córtex cerebral ($p=0,156$); por outro lado, houve um aumento de Bcl-xL no hipocampo ($p=0,038$). (Figura 8).

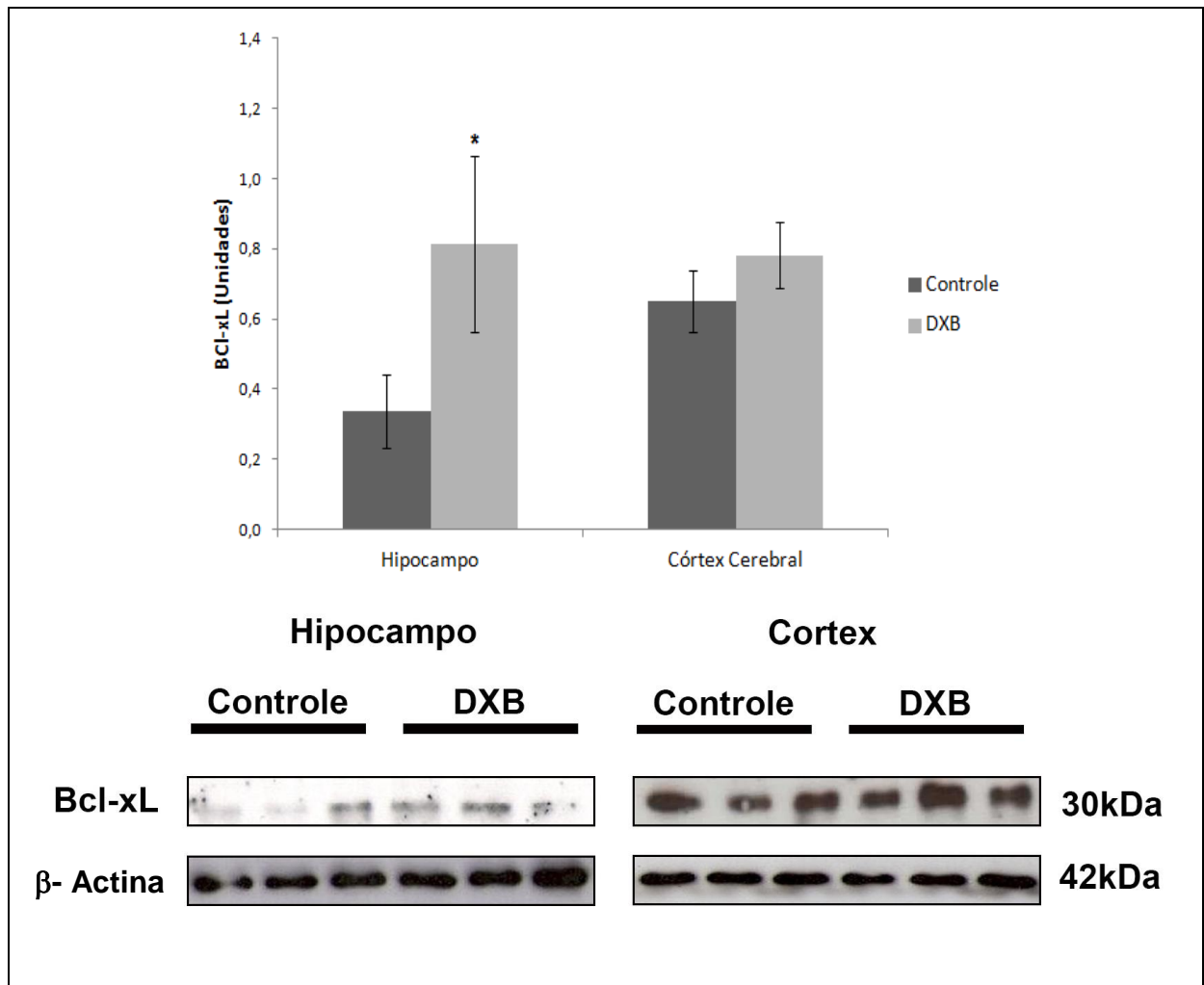


Figura 8. Efeitos da administração aguda de um *pool* de AACR em ratos de 30 dias de vida sobre o imunoconteúdo de Bcl-xL no cérebro. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$). *Diferente do grupo controle $p<0,05$ (Teste t de Student).

Após a administração aguda dos AACR observou-se diminuição do imunoconteúdo da caspase 3 no hipocampo em ratos de 10 e 30 dias de vida ($p=0,019$ e $p=0,004$, respectivamente). No córtex cerebral foi observado um aumento desses níveis em ratos de 30 dias ($p=0,003$), entretanto, em ratos de 10 dias não houve diferença nos parâmetros analisados nessa estrutura ($p=0,053$) (Figuras 9 e 10).

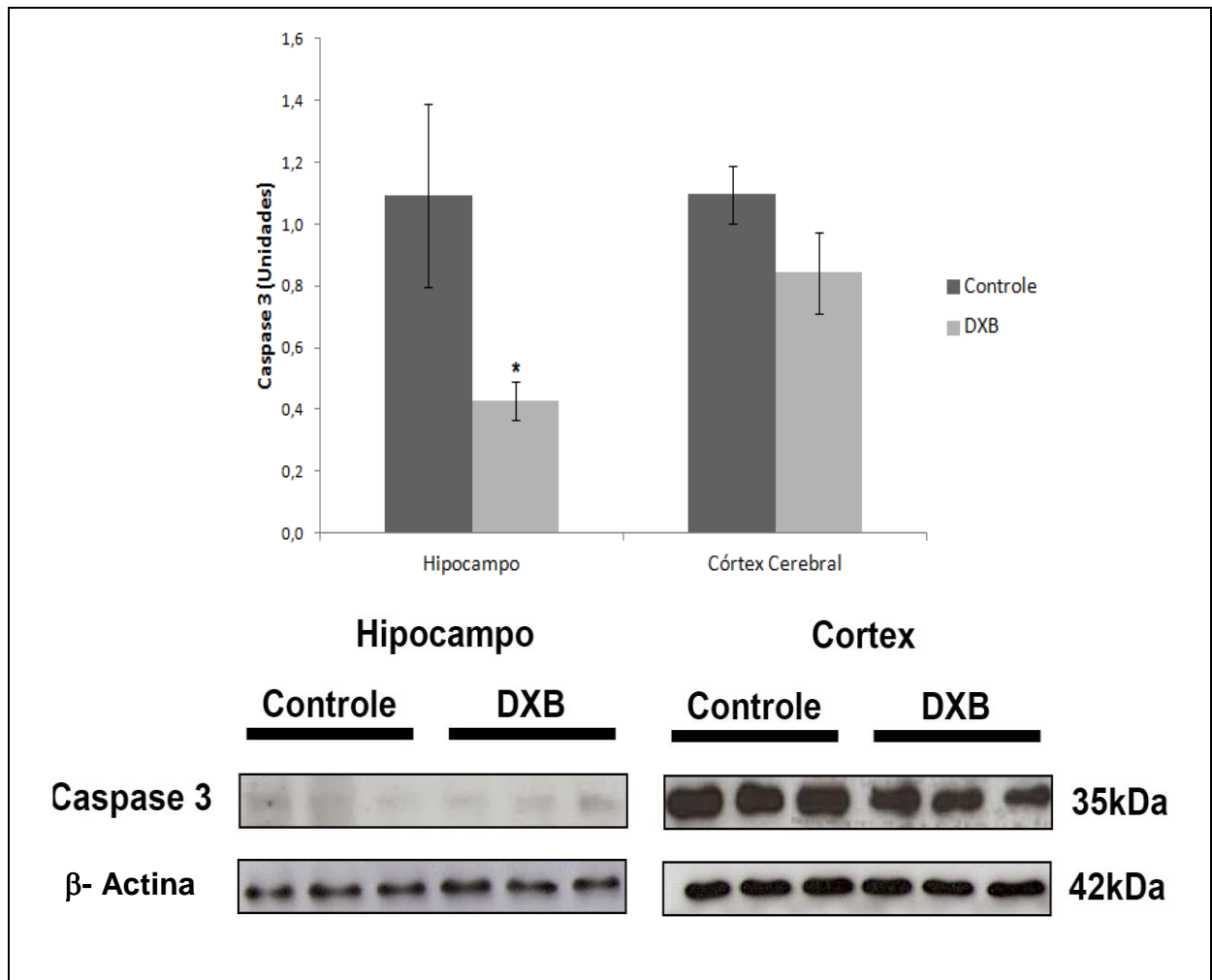


Figura 9. Efeitos da administração aguda de um *pool* de AACR em ratos de 10 dias sobre o imunoconteúdo de caspase 3 no cérebro. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$). *Diferente do grupo controle $p<0,05$ (Teste t de Student).

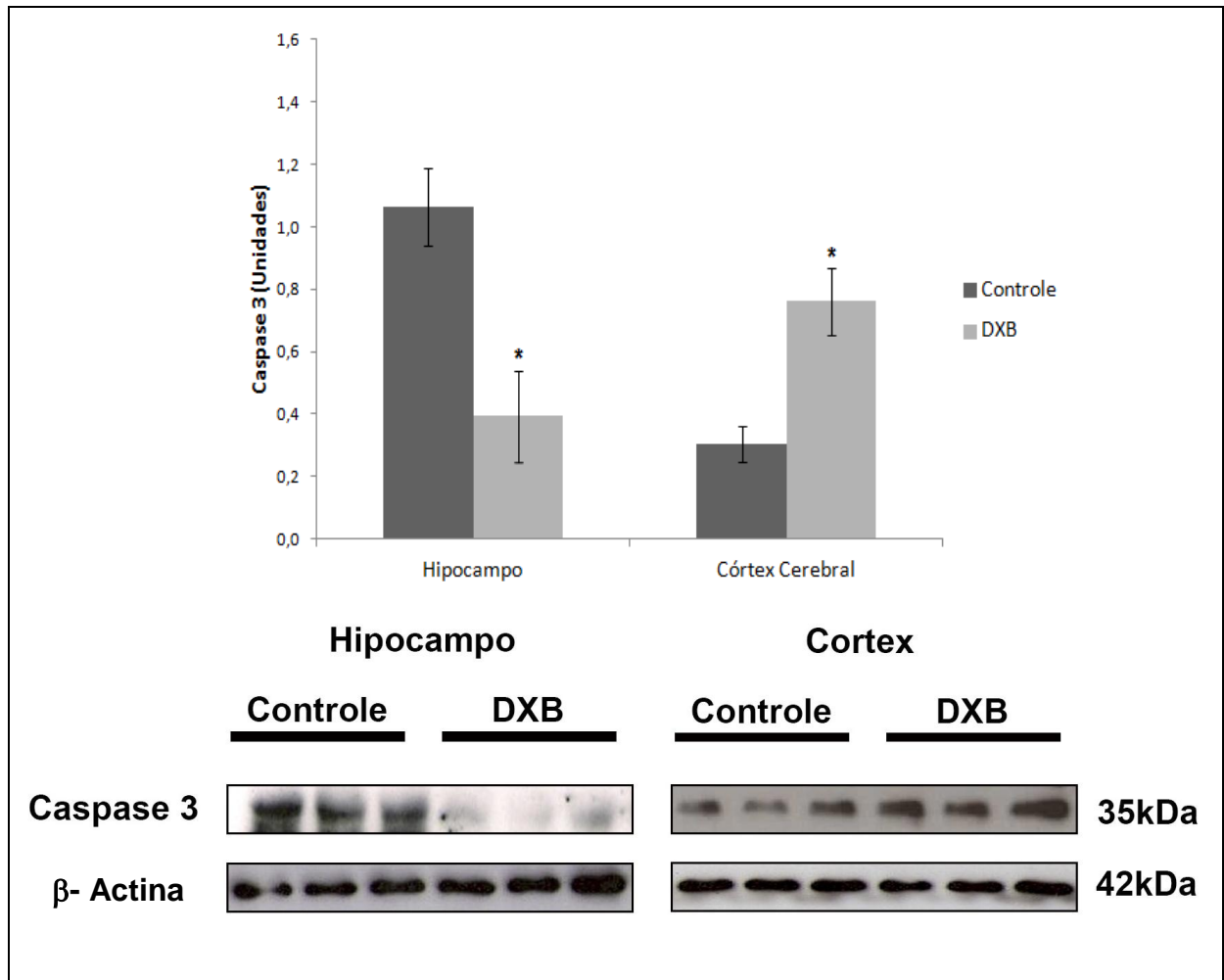


Figura 10. Efeitos da administração aguda de um *pool* de AACR em ratos de 30 dias sobre o imunoconteúdo de caspase 3 no cérebro. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5). *Diferente do grupo controle $p < 0,05$ (Teste *t* de Student).

Em relação a caspase 8 os resultados foram semelhantes. Em ratos de 10 dias de vida não houve diferença significativa entre o grupo teste e grupo controle nas duas estruturas ($p = 0,820$ no hipocampo e $p = 0,873$ no córtex) (Figura 11).

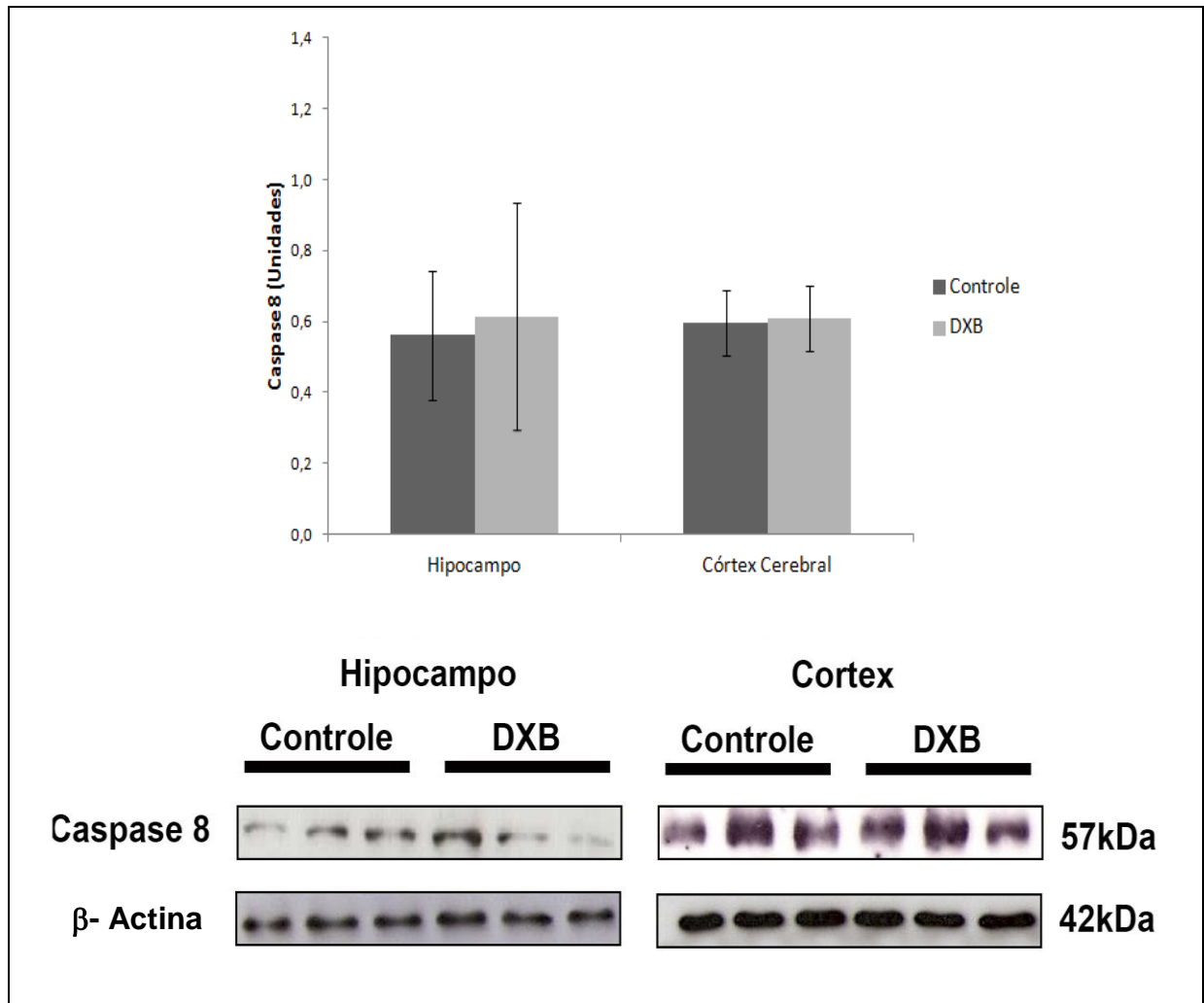


Figura 11. Efeitos da administração aguda de um *pool* de AACR em ratos de 10 dias de vida sobre o imunoconteúdo de caspase 8 no cérebro. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$).

Em ratos de 30 dias observou-se uma diminuição do imunoconteúdo da caspase 8 no hipocampo ($p=0,041$) e, por outro lado, houve um aumento desses níveis no córtex cerebral ($0,045$) (Figura 12).

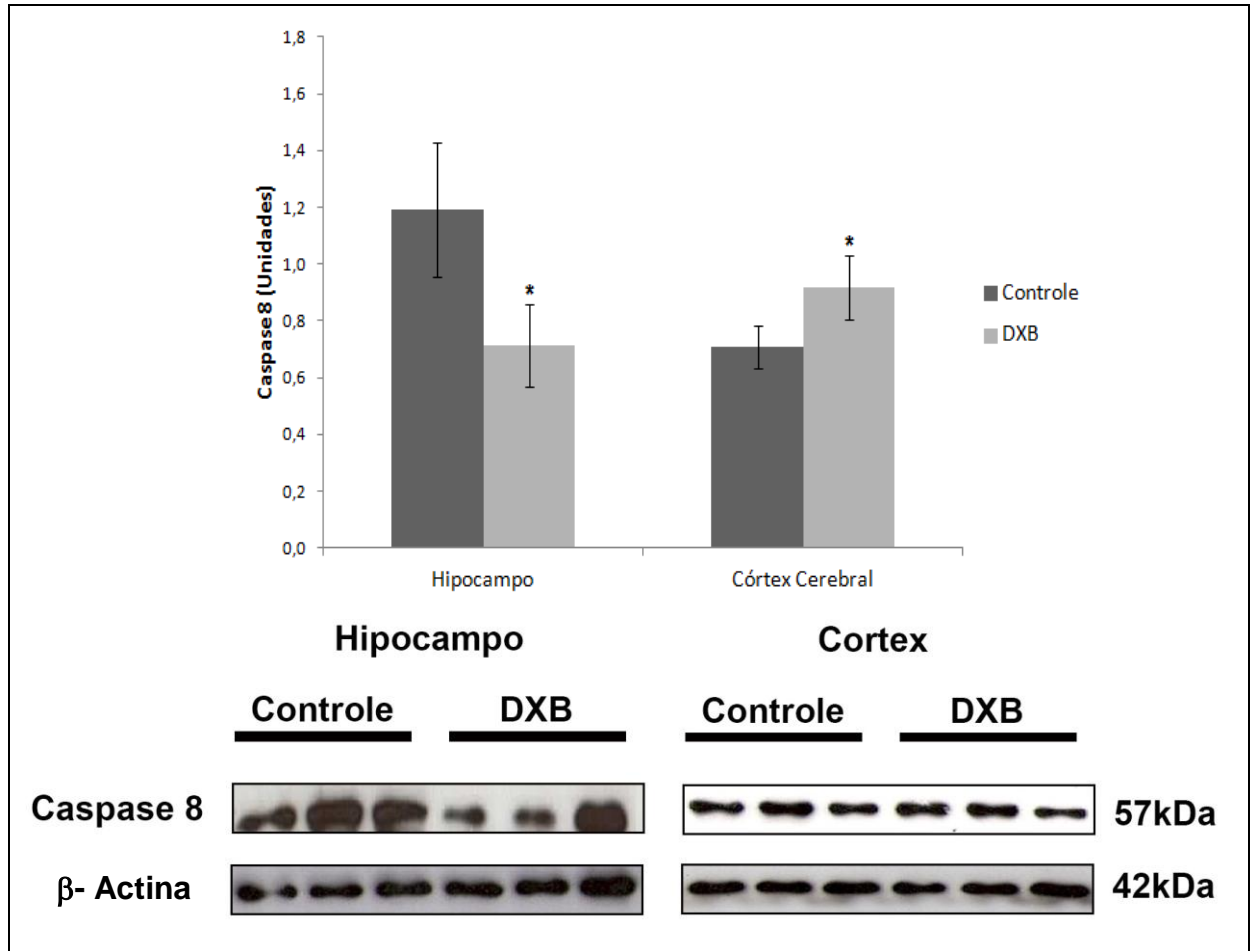


Figura 12. Efeitos da administração aguda de um *pool* de AACR em ratos de 30 dias de vida sobre o imunoconteúdo de caspase 8 no cérebro. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5). *Diferente do grupo controle $p < 0,05$ (Teste *t* de Student).

5 DISCUSSÃO

A DXB é um erro inato do metabolismo caracterizado pela deficiência da atividade do DCCR, resultando no acúmulo dos AACR e seus CCR correspondentes. Os sintomas da DXB são predominantemente neurológicos, como atraso no desenvolvimento psicomotor, retardo mental e até coma. Nos casos mais graves, o paciente apresenta um quadro neonatal de encefalopatia, seguida de morte (Chuang & Shih, 2001). Os mecanismos tóxicos dos AACR e CCR ainda são pouco conhecidos. Estudos demonstraram que os AACR e CCR competem com o glutamato pela descarboxilação (Zielke et al., 1997), reduzindo os níveis cerebrais de GABA (Dodd et al., 1992), provocam deficiência na formação da bainha de mielina (Treacy et al., 1992; Schonberger et al., 2004), alteram a morfologia do citoesqueleto (Fuchal et al., 2004), inibem o metabolismo energético (Amaral et al., 2010), diminuem a biossíntese de alguns neurotransmissores (Huang et al., 1996; Zielke et al., 1996), induzem estresse oxidativo (Fontella et al., 2002; Barschak et al., 2009), causam danos ao DNA (Scaini et al., 2012 b), inibem a oxidação da glicose e a síntese de acetilcolina, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, a enzima ácido graxo sintetase, a oxidação e transporte mitocondrial do piruvato (Gibson & Blass, 1976), bem como induzem apoptose em células gliais e neuronais (Jouvet et al., 2000; Fuchal et al., 2004).

A apoptose é importante contraponto à mitose na regulação do número de células durante o desenvolvimento, na renovação celular homeostática do indivíduo adulto e em muitas outras situações como a eliminação de células com danos genômicos ou celulares (Lewis, 2000). A apoptose é influenciada pelas proteínas anti e pró-apoptóticas, sendo que o equilíbrio entre a cascata das caspases,

indutoras da morte celular, e proteínas inibidoras da apoptose constituem um ponto fundamental neste processo (Chipuk et al., 2006). Três vias principais de indução do processo apoptótico têm sido consideradas, de acordo com a caspase iniciadora: via receptor de morte, com ativação da caspase 8, via de estresse do retículo endoplasmático, atribuído à ativação da caspase 12 (Nakagawa et al., 2000), e via mitocondrial, na qual vários sinais podem levar ao extravazamento de fatores apoptogênicos mitocondriais, levando à ativação de caspase 9 e de caspases efetoras como a caspase 3, 6 ou 7.

O presente estudo teve por objetivo principal verificar o efeito da administração aguda de um *pool* de AACR, metabólitos acumulados na DXB, sobre o imunoconteúdo de alguns marcadores envolvidos na morte celular por apoptose (Bax, Bcl-2, Bcl-xL, caspase 3 e caspase 8) em ratos durante seu desenvolvimento, para melhor compreender a fisiopatologia da disfunção neurológica presente nos pacientes com DXB.

Em um primeiro momento avaliou-se o efeito dos AACR sobre o imunoconteúdo de Bax. Em ratos de 30 dias observou-se aumento de Bax no córtex cerebral. O Bax causa poros na membrana mitocondrial, assim a permeabilidade da membrana mitocondrial aumenta, e o citocromo c é liberado no citosol, onde se liga a proteína Apaf-1, esse complexo ativa a caspase 9, que ativa a caspase 3, desencadeando apoptose (Green & Reed, 1998; Luo et al., 1998; Munoz-Pinedo et al., 2006). Além do aumento de Bax no córtex cerebral, o imunoconteúdo da caspase 8 também aumentou em ratos de 30 dias. A ativação da caspase 8 nessa estrutura sugere que a via ativada foi a extrínseca, uma vez que, após a ligação com seu ligante, ocorre a trimerização do receptor de morte, que então irá interagir com molécula adaptadora do domínio de morte FADD que, por sua vez, recrutará a

procaspase 8, que clivada, ativa a caspase 8 (Nicholson et al., 1999). A caspase 8 pode ativar diretamente a caspase efetora 3 ou pode ativar a via intrínseca ao clivar o tBid que é translocado para mitocôndria, induzindo sua permeabilização e diminuição do potencial transmembrana, ocorrendo a liberação de citocromo c e Apaf-1 para formar o apoptosoma, que por sua vez, ativa a caspase 3, induzindo apoptose (Kantari & Walczak, 2011). Por outro lado, estudos recentes demonstraram que a morte celular por apoptose pode ser independente da liberação do citocromo c para o citosol. Jouvét e colaboradores (2000) observaram que os metabólitos da DXB, principalmente o CIC induzem apoptose sem modificar a membrana mitocondrial e, conseqüentemente, sem liberar citocromo c para o citosol.

Com intuito de melhor identificar se as células do córtex cerebral estavam de fato sendo direcionadas a morte celular por apoptose, foi avaliado que o imunoconteúdo da caspase 3 também estava aumentado em ratos de 30 dias nessa estrutura. A caspase 3 clivada surge tanto da ação da caspase 8 (via extrínseca) quanto da caspase 9 (via intrínseca) (Riedl et al., 2004). Neste sentido, diferentes estudos utilizam a caspase 3 para identificar células em apoptose (Jouvét et al., 2000; Slee et al., 2000; Daniel et al., 2001; Dukers et al., 2002; Munoz-Pinedo et al., 2006). Por outro lado, estudos tem demonstrado que a caspase 3 é dispensável em determinados tipos de morte celular com características morfológicas semelhantes às presentes na apoptose (Miyashita et al., 1998).

As proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL aumentaram no hipocampo de ratos de 30 dias. Estes marcadores têm a função biológica de suprimir a morte celular programada induzida por vários estímulos (Hockenbery et al., 1990; Batistatou et al., 1993; Ficher et al., 1993). Assim, o estímulo anti-

apoptótico aumentou a razão Bcl-2/Bax, impedindo a clivagem das pró-caspases 3 e 8 sugerindo que, por este motivo, essas duas caspases estão diminuídas nesta estrutura. Portanto, estes resultados sugerem que no hipocampo as vias estudadas não estão ligadas ao mecanismo de morte celular por apoptose. Por outro lado, mais estudos em outras vias precisam ser realizados, considerando que estudos com a utilização de inibidores e modelos nocautes têm demonstrado que as células podem apresentar mecanismos alternativos de morte. Neurônios desprovidos de fator de crescimento neuronal (NGF) morrem através de um mecanismo apoptótico dependente de caspase 2, enquanto que os mesmos neurônios derivados de uma linhagem de cobaias *knockout* de caspase 2 sofrem apoptose dependente de caspase 9 (Troy et al., 2001). A caspase 2 induz a liberação de proteínas mitocondriais pró-apoptóticas para o citosol, onde estas proteínas ativam a fase final de execução da apoptose (Baliga et al, 2004;. Gao et al, 2005; Bonzon et al, 2006). Assim, dependendo do bloqueio de determinada caspase preferencial, diferentes caspases podem ser ativadas levando à apoptose.

Além disso, estudos indicam que a apoptose pode ser decorrente de vias independentes de caspases (Miller et al., 1999; Ha et al., 1998; Monney et al., 1998; Drenou et al., 1999; Mateo et al., 1999; Jones et al., 2000; Carmody & Cotter, 2000), as quais apresentam características de apoptose porém, as caspases parecem não serem cruciais nesse processo. A endonuclease G (Endo G) e fator de indução da apoptose (AIF), por exemplo, são dois mediadores mitocondriais que, a partir de suas translocações para o núcleo, têm a capacidade de produzir fragmentação de DNA em grande escala, independentemente das caspases (Li et al., 2001; Yakovlev & Faden, 2004). Já a ativação de serino proteases, como AP24, quando inibidas,

provocam uma proteção mais eficiente que a conseguida com um inibidor de caspases (Torriglia et al., 2000).

Outra via que recentemente foi descoberta como uma nova via que ativa apoptose é a relacionada com o estresse de retículo endoplasmático (RE). Em várias situações fisiológicas e patológicas ocorre um desequilíbrio entre a carga de proteínas recém sintetizadas que entra no RE e a sua capacidade de enovelar e processar corretamente essa carga, gerando acúmulo de proteínas mal-enoveladas. Essa situação é definida como estresse de retículo (Lin et al., 2008). Neste caso, a apoptose é acionada, supostamente para proteger o organismo contra as células que apresentam proteínas deformadas (Ron & Walter, 2007). Por isso, mais estudos são necessários para um maior entendimento acerca dessas diferentes vias, que podem levar a morte celular por apoptose, na doença do xarope do bordo.

Os imunocontéudos dos marcadores apoptóticos foram diferentes no hipocampo e córtex cerebral. Estudos sugerem que as regiões do cérebro respondem a cada estresse ou estímulo, diferentemente. Neste contexto, o córtex cerebral parece ter sido mais vulnerável à administração dos aminoácidos de cadeia ramificada quando comparado com o hipocampo. Por outro lado, um estudo realizado por Jouvét e colaboradores (2000) mostrou que após a administração do CIC as células neuronais foram induzidas à apoptose em hipocampo de ratos jovens. Dessa forma, os resultados do presente estudo não podem afirmar que não ocorre apoptose no hipocampo, visto que outras vias, não estudadas, podem estar ativadas induzindo a célula à morte celular. O mesmo deve ser considerado em relação aos ratos de 10 e 30 dias, onde não se pode inferir que não ocorre morte celular por apoptose em ratos de 10 dias, apesar de não ter sido observado alterações nos imunocontéudos da maioria dos marcadores apoptóticos.

O presente estudo mostrou que a administração aguda dos AACR (leucina, isoleucina e valina), metabólitos acumulados na doença do xarope do bordo, aumentou o imunocontéudo de Bax, fator pró-apoptótico, em ratos de 30 dias no córtex cerebral. Os resultados foram semelhantes quanto ao imunocontéudo de caspase 3 e caspase 8, sugerindo que a apoptose foi ativada pela via extrínseca, seguida da ativação da via intrínseca nessa estrutura. Por outro lado, no hipocampo, o imunocontéudo da caspase 3 e 8 diminuiu, isso provavelmente se deve ao fato de que houve um aumento no imunocontéudo de Bcl-2 e Bcl-xL, fatores anti-apoptóticos. Os resultados sugerem então que os AACR causam apoptose no córtex cerebral, porém no hipocampo os parâmetros analisados não demonstram alterações. Neste sentido, outros estudos precisam ser realizados em outras vias que também levam a morte celular por apoptose para um entendimento mais completo desse mecanismo na doença do xarope do bordo. A fisiopatologia da disfunção neurológica presente nos pacientes com doença do xarope do bordo ainda não está completamente esclarecida. Sendo assim, tais resultados, juntamente com outros achados, contribuem para explicar, pelo menos em parte, as sequelas neurológicas associadas às altas concentrações plasmáticas dos metabólitos acumulados na doença do xarope do bordo.

REFERÊNCIAS

- Amaral AU, Leipnitz G, Fernandes CG, Seminotti B, Schuck PF, Wajner M. Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Res.* 2010; 1324:75-84.
- Araújo P, Wassermann GF, Tallini K, Furlanetto V, Vargas CR, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M. Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem Int.* 2001; 38 (6):529-537.
- Baliga BC, Read SH, Kumar S. The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death Differ.* 2004; 11:1234-1241.
- Baric I, Furnic K, Hoffmann GF. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. *Croatian Medical Journal.* 2001; 42 (4): 379-383.
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, Busanello EN, Coelho DM, Cipriani F, Dutra-Filho CS, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Amino acids levels and lipid peroxidation in maple syrup urine disease patients. *ClinBiochem.* 2009; 42(6):462-466.
- Batistatou A, Merry DE, Korsmeyer SJ, Greene LA. Bcl-2 affects survival but not neuronal differentiation of PC12 cells. *J Neurosci.* 1993; 13(10): 4422-8.
- Bonzon C, Bouchier-Hayes L, Pagliari LJ, Green DR, Newmeyer DD. Caspase 2 induced apoptosis requires bid cleavage: a physiological role for bid in heat shock-induced death. *Mol Biol Cell.* 2006; 17:2150-2157.
- Borges-Osório, MR, Robinson WM. *Genética humana.* 2.ed São Paulo: Artmed, 2001.

- Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Wajner M, Dutra-Filho CS. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J DevNeurosci*. 2003; 21:327-332.
- Bridi R, Latini A, Braum CA, Zorzi GK, Wajner M, Lissi E. Evaluation of the mechanism involved in leucin-induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Metab Brain Dis*. 2005; 20: 155-167.
- Bridi R, Fontella FU, Pulrolnik V, Braun CA, Zorzi GK, Coelho D, Wajner M, Vargas CR, Dutra-Filho CS. A chemically-induced acute model of maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies. *J Neurosci Methods*. 2006; 155(2):224-30.
- Burton BK. Inborn Errors of Metabolism: The clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics*. 1987; 79 (3): 359-369.
- Carmody RJ, Cotter TG. Oxidative stress induces caspase independent retinal apoptosis *in vitro*. *Cell Death Differ*. 2000; 7: 282–291.
- Chace DH, Hiliman SL, Mihngton DS, Kahier SG, Roe CR, Naylor EW. Rapid Diagnosis of Maple Syrup Urine Disease in Blood Spots from Newborns by Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem*. 1995; 41(1): 62-8.
- Chuang DT, Shih VE. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudt AL, Sly WL, Valle D. (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited disease*. 8^o ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ*. 2006; 13: 1396-402.
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Rev Cancer*. 2002; 2 (9): 647-56.

- Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 2003; 22(53): 8590-607.
- Dancis J, Levitz M, Westall RG. Maple syrup urine disease: branched-chain keto-aciduria. *Pediatrics*. 1960; 25 (1): 72-79.
- Daniel PT, Wider T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia*. 2001;15: 1022-1032.
- Danner DJ, Elsas LJ. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. New York: McGraw-Hill. 671-692, 1989.
- Desagher S, Martinou JC. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2000; 10: 369-76.
- Dodd PR, Williams SH, Gundlach AL, Harper PAW, Healy PJ, Dennis JA, Johnston GAR. Glutamate and γ -aminobutyric acid neurotransmitter systems in the acute phase of maple syrup urine disease and citrullinemia encephalopathies in newborn calves. *J Neurochem*. 1992; 59(2):582-590.
- Drenou B, Blancheteau V, Burgess DH, Fauchet R, Charron DJ, Mooney NA. A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *J. Immunol*. 1999; 163: 4115–4124.
- Dukers DF, Oudejans JJ, Vos W, Berge RL, Meijer CJ. Apoptosis in B-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues always involves activation of caspase 3 as determined by a new in situ detection method. *J. Pathol*. 2002; 196:307-315.

- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Rev. Biochem.* 1999; 68:383–424.
- Ficher TC, Milner AE, Gregory CD, Jackman AL, Aherne GW, Hartley JA, Dive C, Hickman JA, Bcl – 2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thy midylate stress in independent of classical resistance pathways. *Cancer Res.* 1993; 53(14): 3321-6.
- Fontella FU, Gassen E, Pulrolnik V, Wannmacher CMD, Klein AB, Wajner M, Dutra CS. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis.* 2002; 17:47-54.
- Funchal C, GOttfried C, Almeida LM, Wajner M, Pessoa-Pureur R. Evidence that the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce morphological alterations and death in cultured astrocytes from rat cerebral cortex. *Glia.* 2004; 48(3):230-240.
- Gao Z; Shao Y, Jiang X. Essential roles of the Bcl-2 family of proteins in caspase-2 induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2005; 280: 38271-38275.
- Gewies AM, Grimm S. Cathepsin-B and cathepsin-L expression levels do not correlate with sensitivity of tumour cells to TNF-alpha mediated apoptosis. *Bros. J. Cancer.* 2003; 89 (8): 1574-1580.
- Gibson GE, Blass JP. Inhibition of acetylcholine synthesis and carbohydrate utilization by maple-syrup-urine disease metabolites. *JNeurochem.* 1976; 26(6):1073-1078.
- Green, D. R., Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998; 281: 1309–1312.

- Ha HC, Woster PM, Casero RA Jr. Unsymmetrically substituted polyamine analogue induces caspase-independent programmed cell death in Bcl-2-overexpressing cells. *Cancer Res.* 1998;58: 2711–2714.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; 407:770-76.
- Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* 1990; 348 (6299): 334-6.
- Howell RK, Lee M. Influence of alpha-ketoacids on the respiration of brain in vitro. *Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine.* 1963; 113: 660-663.
- Huang Y, Zielke HR, Tildon JT, Zielke CL, Baab PJ. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: leucine infusion. *Dev Neurosci.* 1996; 18(5-6): 415-419.
- Jan D, Laurent J, Rabier D, Jouvét P, Lacaille F, Beringer A, Hubert P, Revillon Y, Saudubray JM. Liver transplantation: new indications in metabolic disorders? *Transplant Proc.* 1994; 26 (1): 189-190.
- Jones BE, Lo CR, Liu H, Srinivasan A, Streetz K, Valentino KL, Czaja MJ. Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor- α cytotoxicity undergo apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 705–712.
- Jouvét P, Rustin P, Taylor DL, Pocock JM, Felderhoff-Mueser U, Mazarakis ND, Sarraf C, Joashi U, Kozma M, Greenwood K, Edwards AD, Mehmet H. Branched Chain Amino Acids Induce Apoptosis in Neural Cells without Mitochondrial Membrane Depolarization or Cytochrome c Release: Implications

for Neurological Impairment Associated with Maple Syrup Urine Disease. *Mol Biol Cell*. 2000; 11(5): 1919–1932.

Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813(4):558-63.

Karam SM, Schwartz IV, Giugliani R. Introdução e aspectos clínicos dos erros inatos do metabolismo. In: Carakushansky G. *Doenças Genéticas em Pediatria*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001; 155-158.

Lewis K. Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64(3):503-14.

Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001; 412(6842):95-9.

Lin JH, Walter P, Yen TS. Endoplasmic Reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2008; 3:399-425.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl-2interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998; 94: 481–490.

Mackenzie DY, Woolf LI. Maple syrup urine disease; an inborn error of the metabolism of valine, leucine, and isoleucine associated with gross mental deficiency. *Br med j*. 1959; 1(5114):90-1.

Mateo V, Lagneaux L, Bron D, Biron G, Armant M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 ligation induces caspase independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med*. 1999; 5: 1277–1284.

Miller TM, Molder KL, Knudson CM, Creedon DJ, Deshmukh M, Korsmeyer SJ, Johnson EM Jr. Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. *J. Cell Biol*. 1999; 139 (1): 205–217.

- Miyashita T, Nagao K, Krajewski S, Salvesen GS, Reed JC, Inoue T, Yamada M. Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ.* 1998; 5: 1034–1041.
- Monney L, Otter I, Olivier R, Ozer HL, Haas AL, Omura S, Borner C. Defects in the ubiquitin pathway induce caspase-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (11): 6121–6131.
- Munoz-Pinedo C, Guio-Carrion A, Goldstein JC, Fitzgerald P, Newmeyer DD, Green DR. Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. *Proceedings Natl Acad Sci.* 2006; 103: 11573-8.
- Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci.* 1998; 23:74-79.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner, BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2000; 403: 98–103.
- Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22 (8):299-306.
- Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999.
- Panten U, Kriegstein E, Poser W, Schönborn J, Hasselblatt A. Effects of L-leucine and alpha-ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS Letters.* 1972; 20:225-228.
- Patrick AD. Maple syrup urine disease. *Arch Dis Child.* 1961; 36(187):269-72.

- Reis M, Farage M, Wolosker H. Chloride-dependent inhibition of vesicular glutamate uptake by alpha-keto acids accumulated in maple syrup urine disease. *BiochimBiophysActa*. 2000; 1475 (2):114-118.
- Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Ver Mol Cell Biol*. 2004; 5: 897-907.
- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 519-29.
- Rose AG, Dobbs RH, Woolf LI. Inborn Errors of Metabolism. *Proc R Soc Med*. 1962; 55(10): 817–826.
- Scaini G, Rochi N, Jeremias IC, Deroza PF, Zugno AI, Pereira TC, Oliveira GM, Kist LW, Bogo MR, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. Evaluation of acetylcholinesterase in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol Neurobiol*. 2012; 45(2):279-86 (a).
- Scaini G, Jeremias IC, Morais MO, Borges GD, Munhoz BP, Leffa DD, Andrade VM, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. DNA damage in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab*. 2012; 106(2):169-74 (b).
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8^a ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- Schadewaldt P, Hammen HW, Ott AC, Wendel U. Renal clearance of branched-chain L-amino and 2-oxo acids in maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis*. 1999; 22 (6):706–22.
- Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U. Whole-body L-leucine oxidation in patients with variant form of maple syrup urine disease. *Pediatr Res*. 2001; 49 (5):627–35.

- Siegel RM, Fleisher TA. The role of Fas and related death receptors in autoimmune and other disease states. *J Allergy Clin Immunol.*1999; 103 (5): 729-38.
- Schonberger S, Schweiger B, Schwahn B, Schwarz M, Wendel U. Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab.* 2004; 82(1):69-75.
- Slee EA, Keogh SA, Martin SJ. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV572 radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis associated mitochondrial cytochrome c release, *Cell Death Differ.* 2000; 6: 556–565.
- Tavares RG, Santos CE, Tasca CI, Wajner M, Souza DO, Dutra-Filho CS. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *JNeurol Sci.* 2000; 181(1-2):44-49.
- Taylor J, Robinson BH, Sherwood WG. A defect in branched-chain amino acid metabolism in a patient with congenital lactic acidosis due to dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res.* 1978; 12(1):60-2.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.*1998; 281: 1312–1316.
- Torriglia A, Perani P, Brossas JY, Altairac S, Zeggai S, Martin E, Tréton J, Courtois Y, Counis MF. A caspase-independent cell clearance program. The LEI/L-DNase II pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 926:192-203.
- Treacy E , Clow CL , Reade TR, Chitayat D, Mamer OA, Scriver CR. Maple syrup urine disease: Interrelations between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *Journal of inherited metabolic disease.*1992; 15: 121-135.

- Troy CM, Rabacchi AS, Hohl JB, Angelastro JM, Greene LA, Shelanski ML. Death in the balance: alternative participation of the caspase-2 and caspase-9 pathways in neuronal death induced by nerve growth factor deprivation. *J. Neurosci.* 2001; 21 (14): 5077–5016.
- Westall RG. Dietary Treatment of a child with maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). *Arch Dis Child.* 1963; 38 (201):485-91.
- Yakovlev AG, Faden AI. Mechanisms of Neural Cell Death: Implications for Development of Neuroprotective Treatment Strategies. *Neuro Rx.* 2004; 1(1): 5–16.
- Yielding KL; Tomkins GM. A effect of L-leucine and other essential amino acids on the structure and activity of glutamic dehydrogenase. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1961; 47(7): 983-990.
- Yudkoff M. Brain metabolism of branched-chain amino acids. *Glia.* 1997; 21(1):92-8.
- Zielke HR, Huang Y, Tildon JT, Zielke CL, Baab PJ. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: alpha-ketoisocaproate infusion. *Dev Neurosci.* 1996; 18(5-6):420-425.
- Zielke HR, Huang Y, Baab PJ, Collins, RM, Zielke CL, Tildon, JT. Effect of alpha-ketoisocaproate and leucine on the in vivo oxidation of glutamate and glutamine in the rat brain. *Neurochem Res.* 1997; 22:1159–1164.

