

**Administração aguda e crônica de aminoácidos de cadeia ramificada na
Doença da Urina do Xarope do Bordo reduz os níveis do fator de
crescimento neual no hipocampo de ratos**

Lis Mairá Mello dos Santos ^{a,b}, Emilio L. Streck ^{a,b} *

^aLaboratório de Bioenergética, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil;

^bInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina translacional em (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor para correspondência: Prof Emilio L. Streck, Laboratório de Bioenergética, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105, Criciúma, 88806-000, SC, Brasil. Telefone: + 55 48 3431 2539. Fax: +55 48 3431 2644.

E-mail: emiliostreck@gmail.com

Resumo

A doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) é um distúrbio neurometabólico predominantemente caracterizado por uma disfunção neurológica. Considerando que os mecanismos neurotóxicos na DXB são pouco conhecidos, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da administração aguda e crônica de um *pool* de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) sobre os níveis do fator de crescimento neural (NGF) e se o tratamento antioxidante (N-acetilcisteína e deferoxamina) é capaz de prevenir as alterações induzidas pelos aminoácidos de cadeia ramificada. Nossos resultados demonstraram uma diminuição nos níveis de NGF no hipocampo após administração aguda e crônica de aminoácidos de cadeia ramificada. Além disso, o tratamento com antioxidante foi capaz de prevenir a diminuição nos níveis de NGF. Em conclusão, os resultados do presente trabalho fornecem evidências de que os aminoácidos de cadeia ramificada podem estar envolvidos na regulação do NGF no hipocampo de ratos em desenvolvimento e na fase adulta. Assim, é possível que a alteração dos níveis desta neurotrofina durante a maturação cerebral pode ser de importância crucial no desenvolvimento dos efeitos neurotóxicos dos aminoácidos de cadeia ramificada. Além disso, a diminuição dos níveis de NGF foi prevenida pela coadministração de N-acetilcisteína e deferoxamina.

Palavras-chave: Doença da Urina do Xarope de Bordo; Aminoácidos de cadeia ramificada; Fator de crescimento neuronal; N-acetilcisteína; Deferoxamina

Introdução

A doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB; Cetoacidúria de cadeia ramificada) é um erro inato do metabolismo de herança autossômica recessiva causada pela deficiência na atividade do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR; E.C. 1.2.4.4), uma enzima mitocondrial envolvida na via de degradação de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR). Este bloqueio provoca o acúmulo de leucina, isoleucina e valina, bem como seus α -cetoácidos de cadeia ramificada correspondentes (CACR) em fluidos do corpo e tecidos (Chuang e Shih 2001; Mackenzie e Woolf 1959).

A DXB apresenta fenótipos clínicos e moleculares heterogêneos, caracterizados por hipoglicemia, cetoacidose, recusa alimentar, apnéia, ataxia, convulsões, coma, retardo psicomotor e retardo mental, bem como edema generalizado no sistema nervoso central (SNC), atrofiamento dos hemisférios cerebrais, degeneração da substância branca e mielinização tardia (Chuang e Shih 2001; Schönberger *et al.* 2004). Apesar das sequelas neurológicas serem comuns em pacientes com DXB, os mecanismos de dano cerebral nesta doença ainda são pouco conhecidos. No entanto, leucina e/ou o seu α -cetoácido são considerados como sendo os principais metabolitos neurotóxicos na DXB, uma vez que o aumento das concentrações plasmáticas destes compostos (cerca de 5,0mM) está associado com o aparecimento de sintomas neurológicos (Chuang e Shih, 2001; Snyderman *et al.* 1964). Além disso, tem sido demonstrado que os metabolitos acumulados na DXB afetam o metabolismo energético (Howell e Lee 1963; Land *et al.* 1976; Danner e Elsas 1989; Pilla *et al.* 2003; Sgaravatti *et al.* 2003; Ribeiro *et al.* 2008; Amaral *et al.* 2010), induzem o estresse oxidativo (Bridi *et al.* 2003, 2005; Fontella *et al.* 2002; Barschak *et al.* 2006; Mescka *et al.* 2011) e apoptose (Jouvet *et al.* 2000a;b). Do mesmo modo, estes metabolitos levam a uma diminuição no desenvolvimento da mielina (Taketomi *et al.* 1983; Tribble e Shapira 1983;

Treacy *et al.* 1992), baixos níveis cerebrais de aminoácidos essenciais levando á diminuição da síntese de neurotransmissores, podendo contribuir para o desenvolvimento de lesão cerebral (Wajner e Vargas 1999; Wajner *et al.* 2000; Araújo *et al.* 2001).

O fator de crescimento neural (NGF), membro protótipo da família das neurotrofinas (Levi-Montalcini 1987), é produzido no cérebro durante toda vida e fundamental para o crescimento, manutenção e sobrevivência de neurônios colinérgicos (Sofroniew *et al.* 2001). Além disso, o NGF atua como um fator trófico para estes neurônios já que sua administração, *in vivo*, aumenta os níveis de acetilcolina transferase (Gnahn *et al.* 2006; Mobley *et al.* 1985), enquanto evita a morte de neurônios do prosencéfalo basal após a operação de vias septo-hipocampais (Korsching *et al.* 1986). NGF inicia vias de sinalização de diferentes células que são necessárias para o desenvolvimento neuronal, o crescimento axonal, a neurotransmissão e a sinaptogênese, através da interação com dois receptores: TrkA, um membro da superfamília de receptores de tirosina quinase (Hempstead *et al.* 1991), e p75NTR, pertencente a superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (Chao *et al.* 1986).

Knipper e colaboradores (1994) demonstraram que a estimulação aguda com NGF aumenta a liberação de glutamato em sinaptossomas corticais de ratos. A infusão intracerebroventricular contínua de NGF aumenta a retenção de aprendizagem no teste de esQUIVA passiva em ratos em desenvolvimento (Ricceri *et al.* 1996) e reverte o declínio cognitivo associado à idade em neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal e corrige o déficit de memória espacial (Fischer *et al.* 1987). Estudos também demonstraram que a infusão similar de anticorpo anti-NGF ao longo de quatro semanas prejudicou o desempenho no labirinto aquático de Morris (Nabeshima *et al.* 1991) e indução da potenciação de longa duração (LTP) (Hennigan *et al.* 2009). Além disso, a diminuição nos níveis de NGF está correlacionada com o grau de demência na doença de Alzheimer (Gelfo *et al.* 2011) e a

suplementação com NGF reverte o déficit de memória nestes pacientes (Gu *et al.* 2009). Assim, presume-se que o NGF parece ser essencial para a memória e plasticidade sináptica.

Considerando que pacientes com DXB geralmente apresentam um grau variável de retardo mental e outros sintomas neurológicos, mas os mecanismos subjacentes a neurotoxicidade deste erro inato do metabolismo ainda não são compreendidos, no presente estudo investigou-se o efeito da administração aguda e crônica de um *pool* de AACR (leucina, isoleucina, e valina) sobre os níveis de NGF em cérebro de ratos durante o seu desenvolvimento, utilizando um modelo quimicamente induzido. Também foi investigada a influência do tratamento antioxidante (ATX) com N-acetilcisteína (NAC) e deferoxamina (DFX), a fim de verificar a influência do estresse oxidativo na modulação dos níveis de NGF.

Materiais e métodos

Animais

Ratos Wistar machos com 7 (10-15 g), 10 (20-25 g), ou 30 (60-80 g) dias de idade foram obtidos do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais com 7 e 10 dias de idade foram mantidos com a ninhada até ao dia do experimento, e os ratos de 30 dias de idade, desmamados aos 21 dias de vida, acondicionados em grupos de cinco, com livre acesso a água e comida, em um ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acessas às 7:00), a uma temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Instituto Nacional para o cuidado e uso de animais de laboratório e da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, com a aprovação da comissão de ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense (protocolo número 60/2010).

Administração aguda do pool CACR

Os animais receberam três administrações por via subcutânea (em intervalos de 1h) do *pool* de aminoácidos de cadeia ramificada (15.8 μ L/g do peso corporal) contendo leucina 190 mmol/L, isoleucina 59 mmol/L e valina 69 mmol/L em solução salina (0.85% NaCl) ou salina para o grupo controle. O *pool* de aminoácidos de cadeia ramificada e a solução salina foram administrados no 10^o ou 30^o dia pós-nascimento (n=6). Uma hora após a última injeção, os animais foram mortos por decapitação, o cérebro foi rapidamente removido e o hipocampo, estriado e córtex cerebral foram separados para a avaliação dos níveis de NGF. A escolha das doses de AACR e idade dos animais foram baseados em estudo anterior (Bridi *et al.* 2006) que mostra que a administração do *pool* de AACR em ratos (doses e idades semelhantes aos usados neste estudo) resultaram em um aumento dos níveis de leucina, isoleucina e valina no sangue e no cérebro, mimetizando o principal achado bioquímico observado em pacientes com DXB durante as crises.

Administração crônica do pool de AACR e tratamento com antioxidantes

Os animais foram divididos em três grupos: 1) Controle (salina); 2) DXB (Induzida pelo *pool* de aminoácidos de cadeia ramificada); 3) DXB tratado com a combinação de NAC (20 mg/kg) e DFX (20 mg/kg). Os animais receberam duas administrações por via subcutânea do *pool* de aminoácidos de cadeia ramificada (15.8 μ L/g do peso corporal em intervalos de 12 horas) contendo leucina 190 mmol/L, isoleucina 59 mmol/L e valina 69 mmol/L em solução salina (0.85% NaCl) a partir do 7^o dia de vida durante 21 dias (última injeção no 27^o dia; Bridi *et al.* 2006; n=6). NAC foi administrada por via subcutânea duas vezes ao dia (em intervalos de 12 horas) e DFX uma vez a cada dois dias durante 21 dias (Di-Pietro *et al.* 2008). Doze horas após a última injeção, os animais foram mortos por decapitação, o cérebro

foi rapidamente removido e o hipocampo, estriado e córtex cerebral foram separados para a avaliação dos níveis de NGF.

Níveis de proteína NGF

Os níveis de NGF nos tecidos cerebrais [homogeneizados em tampão fosfato-salino (PBS, LaborClin, PR, Brasil), com um coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)] foram determinados utilizando determinados através de kits comerciais de ELISA com anticorpos monoclonais específicos para o NGF (Millipore, EUA e Canadá). Resumidamente, placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) serão incubadas durante 12 horas com as amostras diluídas (1:2 em diluente de amostra) e uma curva padrão (variando 15,6-1000 pg / ml de NGF). As placas foram então lavadas quatro vezes com o diluente da amostra. Após a lavagem, o anticorpo monoclonal de rato anti-NGF (diluído a 1:1000 em diluente da amostra) foi adicionado a cada poço e incubado durante 2 horas à temperatura ambiente. Ao término deste período, mais uma série de lavagens com tampão de lavagem foi aplicada, posteriormente, um anticorpo de coelho conjugado com peroxidase (diluído a 1:1000) foi adicionado a cada poço e incubou-se à temperatura ambiente durante 2 horas. Após, foi adicionado uma solução de estreptavidina (enzima-substrato), e uma solução de parada, a quantidade de NGF foi determinada através da medição da absorbância a 450 nm. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica (OD) e a concentração de NGF. A proteína total foi avaliada pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Análise Estatística

Os resultados são apresentados como médias \pm desvio padrão. Todos os ensaios foram realizados em duplicata, e a média foi usada para análise estatística. Os testes para

determinação da normalidade e igualdade de variâncias foram realizados para verificar se nossos testes estatísticos paramétricos eram qualificados. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) com variâncias iguais entre as amostras (teste de variações iguais, $p > 0,05$). Assim, o teste t de Student foi utilizado para a comparação de duas médias. A One-way análise de variância (ANOVA), seguido de Tukey HSD Post-Hoc Tests foi utilizado para a comparação de três médias. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas em um computador IBM-PC compatível, utilizando o Statistical Package for Social Sciences Software (Armonk, Nova York, EUA).

Resultados

No presente estudo, nós investigamos o efeito da administração aguda de um *pool* AACR no cérebro de ratos durante o seu desenvolvimento, utilizando um modelo quimicamente induzido. As análises realizadas pelo método de ELISA demonstraram que os níveis da proteína NGF no hipocampo foram reduzidos em 56% e 51% após a administração aguda de AACR em ratos de 10 e 30 dias de idade, respectivamente. No entanto nenhuma diferença foi observada nos níveis de NGF no estriado ou córtex cerebral, quando comparado com ao grupo controle (Figuras 1 e 2).

Nós também analisamos os efeitos da administração crônica do *pool* de AACR sobre os níveis da proteína NGF no hipocampo, estriado e córtex cerebral. Os níveis de NGF no hipocampo foram significativamente reduzidos, quando comparados ao grupo controle. No entanto, os níveis de NGF não foram afetados no estriado e córtex cerebral. Além disso, considerando que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia da DXB, nós investigamos o efeito do tratamento com ATX sobre os níveis de NGF. Os nossos resultados

demonstram que o tratamento com ATX foi capaz de prevenir o efeito que a administração crônica do *pool* AACR teve sobre os níveis de NGF (Figura 3).

Discussão

Pacientes com DXB mostram extensos danos no cérebro, incluindo edema cerebral, atrofia dos hemisférios cerebrais, degeneração da substância branca e mielinização tardia (Chuang e Shih 2001; Snyderman *et al.* 1964; Schonberger *et al.* 2004). Recentemente, foi relatado que os AACR, e particularmente os α -cetoácidos de cadeia ramificada, induzem alterações no metabolismo energético (Howell e Lee 1963; Land *et al.* 1976; Danner e Elsas 1989; Pilla *et al.* 2003; Sgaravatti *et al.* 2003; Ribeiro *et al.* 2008) e estresse oxidativo (Fontella *et al.* 2002; Bridi *et al.* 2003, 2005; Mescka *et al.* 2011), bem como causam mudanças significativas nos níveis de vários neurotransmissores, tais como o glutamato, aspartato e ácido γ -aminobutírico (Zielke *et al.* 1996, 1997; Tavares *et al.* 2000). Além disso, tem sido demonstrado que os metabólitos acumulados na DXB induzem a morte celular neuronal, o que contribui para a destruição neuronal (Jouvet *et al.* 2000a). Entretanto, muitas questões permanecem sem resposta sobre a patogênese da disfunção cerebral na DXB.

Neste estudo, foi demonstrado que a exposição aguda aos AACR durante o período pós-natal precoce (10^o dia pós-nascimento) diminuiu os níveis de NGF no hipocampo de ratos. Estes estudos concentraram-se na primeira semana pós-natal do cérebro de rato, equivalente ao desenvolvimento mental ao terceiro trimestre do cérebro fetal humano (Reinis e Goldman 1980). Similarmente, a exposição aguda (30^o dia pós-nascimento) e crônica (7^o - 27^o dia pós-nascimento) aos AACR diminuiu os níveis de NFG no hipocampo, quando comparado ao grupo controle. Muitas observações demonstram que a supressão genética de NGF está associada com déficits tanto na aquisição quanto na retenção de memória espacial (De Rosa *et*

al. 2005; Pironi *et al.* 2007; Terry *et al.* 2011). Além disso, o bloqueio de NGF endógeno por infusão de anti-NGF reduz a perfusão de LTP no hipocampo e prejudica a retenção da memória (Conner *et al.* 2009; Zou *et al.* 2002) e a administração intranasal de NGF impede o déficit de memória de reconhecimento (De Rosa *et al.* 2005). Essas séries de evidências proporcionam a ligação intrínseca entre NGF endógeno e memória dependente do hipocampo. Assim, níveis anormais de neurotrofinas poderiam induzir efeitos negativos a longo prazo. Em estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que a administração de AACR causou um déficit na memória de longa duração no teste de esQUIVA inibitória (um tipo de ensaio único que motivou o condicionamento aversivo motivado) e no teste de esQUIVA inibitória de múltiplos treinos (Scaini *et al.* 2012a). Outros estudos também demonstraram que uma única injeção intra-hipocampal de leucina em ratos adultos prejudica a memória de consolidação e a indução da LTP (Glaser *et al.* 2010) e a administração crônica, por via subcutânea, de doses elevadas de leucina em ratos jovens induz a déficits de aprendizagem/memória verificadas no teste de campo aberto e nos testes de esQUIVA inibitória durante a idade adulta (Mello *et al.* 1999). Assim, é possível que a alteração dos níveis de neurotrofinas durante a maturação cerebral pode ter importância crucial no desenvolvimento de efeitos neurotóxicos de AACR.

No SNC, o NGF tem ações tróficas no sistema colinérgico, incluindo a expressão dos marcadores colinérgicos. Por outro lado, o NGF é regulado pelo sistema colinérgico durante o desenvolvimento (da Penha Berzaghi *et al.* 1993). Jiang e colaboradores (2007) mostraram que o H₂O₂ induziu um aumento da AChE em células apoptóticas por mecanismos que requerem a produção de espécies reativas de oxigênio, e o fator neurotrófico NGF preveniu o aumento da apoptose associada a AChE, mantendo a fosforilação de ATP. Scaini e colaboradores (2012) demonstraram um aumento significativo da atividade da AChE no cérebro após a administração do *pool* de AACR, e a coadministração de N-acetilcisteína e deferoxamina preveniu o aumento da AChE. Além disso, estudos tem demonstrado que a

diminuição dos níveis de NGF ou do seu receptor TrkA no cérebro dos ratos resulta em reminescente degeneração colinérgica da doença de Alzheimer (Capsoni *et al.* 2000, 2010).

Embora o mecanismo exato pelo qual os AACR alteram a memória em ratos é ainda desconhecido, evidências da literatura mostram que o estresse oxidativo causa alterações seletivas nas cascatas de sinalização ativadas por NGF, como a fosforilação de ERK1 / 2 induzida por esses fatores de crescimento, sugerindo um mecanismo de ação comum para que o H₂O₂ module negativamente a fosforilação de CREB, independentemente do estímulo aplicado, e este pode ser dependente de Ras (Zhang e Jope 1999; O'Loghlen *et al.* 2006). Um sítio potencial da ação inibitória de H₂O₂ foi identificado em um estudo recente que demonstrou que as espécies reativas de oxigênio podem inibir a proteína quinase dependente de AMPc (Dimon-Gadal *et al.* 1998). A ativação de CREB é um importante componente molecular no processo de aprendizagem e memória (Abel e Kandel 1998), e a fosforilação de CREB em Ser133 é um local regulador chave (Sheng *et al.* 1991). Portanto, o efeito inibitório do estresse oxidativo na fosforilação de CREB induzida por NGF pode contribuir para o mecanismo fisiopatológico de perda de memória em condições associadas com o estresse oxidativo, tais como o envelhecimento e a doença de Alzheimer (Markesbery 1997). Neste contexto, considerando que os metabólitos acumulados na DXB induzem ao estresse oxidativo (Fontella *et al.* 2002; Bridi *et al.* 2003, 2005; Mescka *et al.* 2011), também foi investigado se a geração de radicais livres pode estar envolvida na diminuição dos níveis de NGF após a administração crônica do *pool* de AACR no hipocampo. Corroborando esta hipótese, este protocolo de tratamento antioxidante previne a diminuição nos níveis de NGF, e este efeito positivo da terapia antioxidante poderia ser atribuído à troca do *pool* de antioxidante, o qual evita a geração de radical hidroxila - com o DFX, um quelante de ferro - e redução de ROS - com a ação de NAC (Ritter *et al.* 2004; Damiani *et al.* 2007; Di-Pietro *et al.* 2008).

Em conclusão, os resultados do presente trabalho fornecem evidências de que os AACR podem estar envolvidos na regulação do NGF no hipocampo de ratos em desenvolvimento e adultos. Assim, é possível que a alteração dos níveis de neurotrofina durante a maturação cerebral pode ser de importância crucial no desenvolvimento dos efeitos neurotóxicos do AACR. Além disso, a diminuição dos níveis de NGF foi prevenida pela coadministração de NAC e DFX. Neste contexto, os resultados do presente estudo reforçam que o estresse oxidativo deve ser considerado um importante mecanismo fisiopatológico subjacente ao dano cerebral observado na DXB.

Agradecimentos

Esta pesquisa teve apoio de concessões do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Abel T. and Kandel E. (1998) Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res. Rev.* 26, 360–78.
- Amaral A.U., Leipnitz G., Fernandes C.G., Seminotti B., Schuck P.F. and Wajner, M. (2010) Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Res.* 1324, 75-84
- Araújo P., Wassermann G.F., Tallini K., Furlanetto V., Vargas C.R., Wannmacher C.M., Dutra-Filho C.S., Wyse A.T. and Wajner M. (2001) Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem. Int.* 38, 529–537.
- Barschak A.G., Sitta A., Deon M., Olivera M.H., Haeser A., Dutra-Filho C.S., Wajner M. and Vargas C.R. (2006) Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 21, 279-286.
- Bridi R., Araldi J., Sgarbi M.B., Testa C.G., Durigon K., Wajner M. and Dutra-Filho C.S. (2003) Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21, 327–332.
- Bridi R., Latini A., Braun C.A., Zorzi G.K., Wajner M., Lissi E.G. and Dutra-Filho C.S. (2005) Evaluation of the mechanisms involved in leucine induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic. Res.* 39, 71–79.
- Bridi R., Fontella F.U., Pulrolnik V., Braun C.A., Zorzi G.K., Coelho D., Wajner M., Vargas C.R. and Dutra-Filho C.S. (2006) A chemically-induced acute model of maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies. *J. Neurosci. Methods.* 155, 224-230.

- Capsoni S., Ugolini G., Comparini A., Ruberti F., Berardi N. and Cattaneo A. (2000) Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6826–6831.
- Capsoni S., Tiveron C., Amato G., Vignone D. and Cattaneo A. (2010) Peripheral neutralization of nerve growth factor induces immunosympathectomy and central neurodegeneration in transgenic mice. *J. Alzheimers Dis.* 20, 527–546.
- Cetinkaya A., Bulbuloglu E., Kurutas E.B., Ciralik H., Kantarceken B., Buyukbese M.A. (2005) Beneficial effects of n-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. *The Tohoku J. Exp. Med.* 206, 131-139.
- Chao M.V., Bothwell M.A., Ross A.H., Koprowski H., Lanahan A.A., Buck C.R. and Sehgal A. (1986) Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science.* 232, 518–521.
- Chuang D.T. and Shih V.E. (2001) Maple syrup urine disease (branchedchain ketoaciduria), in *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, (Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. and Valle D. eds) pp 1971–2005. McGraw-Hill, New York.
- Conner J.M., Franks K.M., Titterness A.K., Russell K., Merrill D.A., Christie B.R., Sejnowski T.J. and Tuszyński M.H. (2009) NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. *J. Neurosci.* 29, 10883-10889.
- De Vries N., De Flora S. (1993) N-Acetylcysteine. *J. Cell. Biochem* 17F, 270-277.
- da Penha Berzaghi M., Cooper J., Castren E., Zafra F., Sofroniew M., Thoenen H. and Lindholm D. (1993) Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat hippocampus. *J. Neurosci.* 13, 3818–3826.
- Damiani C.R., Benetton C.A., Stoffel C., Bardini K.C., Cardoso V.H., Di Giunta G., Pinho R.A., Dal-Pizzol F. and Streck E.L. (2007) Oxidative stress and metabolism in animal

- model of colitis induced by dextran sulfate sodium. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22, 1846-851.
- Danner D.J. and Elsas L.J. (1989) Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism, in *The metabolic basis of inherited disease*, (Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. and Valle D. eds). pp 671–692. New York: McGraw-Hill.
- De Flora S., Cesarone C.F., Balansky R.M., Albini A., D'Agostini F., Bannicelli C. (1995) Chemopreventive properties and mechanisms of N-acetylcysteine: the experimental background. *J. Cell. Biochem.* 22, 33–41.
- De Rosa R., Garcia A.A., Braschi C., Capsoni S., Maffei L., Berardi N. and Cattaneo A. (2005) Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3811-3816.
- Dimon-Gadal S., Gerbaud P., Keryer G., Anderson W., Evain-Brion D. and Raynaud F. (1998) In vitro effects of oxygen-derived free radicals on type I and type II cAMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 273, 22833–22840.
- Di-Pietro P.B., Dias M.L., Scaini G., Burigo M., Constantino L., Machado R.A., Dal-Pizzol F. and Streck E.L. (2008) Inhibition of brain creatine kinase activity after renal ischemia is attenuated by N-acetylcysteine and deferoxamine administration. *Neurosci. Lett.* 434, 139-143.
- Fischer W., Wictorin K., Bjorklund A., Williams L.R., Varon S. and Gage F.H. (1987) Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature.* 329, 65-68.
- Fontella F.U., Gassen E., Pulrolni V., Wannmacher C.M.D., Klein A.B., Wajner M. and Dutra-Filho C.S. (2002) Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 17, 47–54.

- Gelfo F., Tirassa P., De Bartolo P., Caltagirone C., Petrosini L. and Angelucci F. (2011) Brain and serum levels of nerve growth factor in a rat model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 25, 213-217.
- Glaser V., Carlini V.P., Gabach L., Ghersi M., de Barioglio S.R., Ramirez O.A., Perez M.F. and Latini A. (2010) The intra-hippocampal leucine administration impairs memory consolidation and LTP generation in rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 1067-1075.
- Gnahn H., Hefti F., Heumann R., Schwab M.E. and Thoenen H. (1993) NGF-mediated increase of choline acetyltransferase (ChAT) in the neonatal rat forebrain: evidence for a physiological role of NGF in the brain? *Brain Res.* 285, 45–52.
- Gu H., Long D., Song C. and Li X. (2009) Recombinant human NGF-loaded microspheres promote survival of basal forebrain cholinergic neurons and improve memory impairments of spatial learning in the rat model of Alzheimer's disease with fimbria-fornix lesion. *Neurosci. Lett.* 453, 204-209.
- Hempstead B.L., Martin-Zanca D., Kaplan D.R., Parada L.F. and Chao M.V. (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature.* 350, 678–683.
- Hennigan A., Callaghan C.K., Kealy J., Rouine J. and Kelly A.M. (2009) Deficits in LTP and recognition memory in the genetically hypertensive rat are associated with decreased expression of neurotrophic factors and their receptors in the dentate gyrus. *Behav. Brain Res.* 197, 371-377.
- Howell R.K. and Lee M. (1963) Influence of α -keto acids on the respiration of brain in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113, 660–663.
- Jiang H., Zhang J., Zhu H., Li H. and Zhang X. (2007) Nerve growth factor prevents the apoptosis-associated increase in acetylcholinesterase activity after hydrogen peroxide treatment by activating Akt. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.* 39, 46-56.

- Jouvet J., Rustin P. and Taylor D.L. (2000a) 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.* 11, 1919–1932.
- Jouvet P., Kozma M. and Mehmet H. (2000b) Primary human fibroblasts from a maple syrup urine disease patient undergo apoptosis following exposure to physiological concentrations of branched chain amino acids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 926, 116-121.
- Knipper M., Leung L.S., Zhao D. and Rylett R.J. (1994) Short-term modulation of glutamatergic synapses in adult rat hippocampus by NGF. *NeuroReport.* 5, 2433–2436.
- Korsching S., Heumann R., Thoenen H. and Hefti F. (1986) Cholinergic denervation of the rat hippocampus by fimbrial transection leads to a transient accumulation of nerve growth factor (NGF) without change in mRNA(NGF) content. *Neurosci. Lett.* 66, 175–180.
- Land J.M., Mowbray J. and Clark J.B. (1976) Control of pyruvate and h-hydroxybutyrate utilization in rat brain mitochondria and its relevance to phenylketonuria and maple syrup urine disease. *J. Neurochem.* 26, 823–830.
- Levi-Montalcini R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 237, 1154–1162.
- Lowry O.H., Rosebough N.G., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Chem. Biol.* 193, 265-275.
- Mackenzie D.Y. and Woolf L.I. (1959) Maple syrup urine disease; an inborn error of the metabolism of valine, leucine, and isoleucine associated with gross mental deficiency. *Br. Med. J.* 1, 90–91.
- Markesbery W.R. (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free. Radical Biol. Med* 23, 134–147.

- Mello C.F., Feksa L., Brusque A.M., Wannmacher C.M. and Wajner M. (1999) Chronic early leucine administration induces behavioral deficits in rats. *Life Sci.* 65, 747-755.
- Mescka C., Moraes T., Rosa A., Mazzola P., Piccoli B., Jacques C., Dalazen G., Coelho J., Cortes M., Terra M., Regla Vargas C. and Dutra-Filho C.S. (2011) In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 26, 21-28.
- Mobley W.C., Rutkowski J.L., Tennekoon G.I., Buchanan K. and Johnston M.V. (1985) Choline acetyltransferase activity in striatum of neonatal rats increased by nerve growth factor. *Science.* 229, 284–287.
- Nabeshima T., Ogawa S., Yamada K., Ishimaru H., Fuji K., Kameyama T., Fukuta T., Takeuchi R. and Hayashi K. (1991). Memory impairment and morphological changes in rats after continuous infusion of active fragment of anti-nerve growth factor-antibody. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 74, 141-152.
- O'Loghlen A., Pérez-Morgado M.I., Salinas M. and Martín M.E. (2006) N-acetyl-cysteine abolishes hydrogen peroxide-induced modification of eukaryotic initiation factor 4F activity via distinct signalling pathways. *Cell Signal.* 18, 21-31.
- Pilla C., Cardozo R.F., Dutra-Filho C.S., Wyse A.T., Wajner M. and Wannmacher C.M. (2003) Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem. Res.* 28, 675–679.
- Pinho R.A., Silveira P.C.L., Silva L.A., Streck E.L, Dal-Pizzol F., Moreira J.C.F. (2005) N-acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environ. Res.* 99, 355-360.
- Pirondi S., D'Intino G., Gusciglio M., Massella A., Giardino L., Kuteeva E., Ogren S.O., Hokfelt T. and Calza L. (2007) Changes in brain cholinergic markers and spatial learning in old galanin-overexpressing mice. *Brain Res.* 1138, 10-20.

- Reinis S. and Goldman J. (1980) Prenatal and early postnatal development of brain function, in *The Development of the Brain: Biological and Functional Perspectives* (Thomas C.C, ed.). Springfield, Illinois.
- Ribeiro C.A., Sgaravatti A.M., Rosa R.B., Schuck P.F., Grando V., Schmidt A.L., Ferreira G.C., Perry M.L., Dutra-Filho C.S. and Wajner M. (2008) Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem. Res.* 33, 114–124.
- Ricceri L., Alleva E., Chiarotti F. and Calamandrei G. (1996) Nerve growth factor affects passive avoidance learning and retention in developing mice. *Brain Res. Bull.* 39, 219-226.
- Ritter C., Andrades M.E., Reinke A., Menna-Barreto S., Moreira J.C. and Dal-Pizzol F. (2004) Treatment with n-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit. Care Med.* 32, 342-349.
- Scaini G., Teodorak B.P., Jeremias I.C., Morais M.O., Mina F., Domingui D., Pescador B., Comim C.M., Schuck P.F., Ferreira G.C., Quevedo J. and Streck E.L. (2012a) Antioxidant administration prevents memory impairment in an animal model of maple syrup urine disease. *Behav. Brain Res.* 231, 92-96.
- Scaini G., de Rochi N., Jeremias I.C., Deroza P.F., Zugno A.I., Pereira T.C., Oliveira G.M., Kist L.W., Bogo M.R., Schuck P.F., Ferreira G.C. and Streck E.L. (2012b) Evaluation of acetylcholinesterase in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol. Neurobiol.* 45, 279-286.
- Schönberger S., Schweiger B., Schwahn B., Schwarz M. and Wendel U. (2004) Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol. Genet. Metab.* 82, 69-75.

- Sgaravati A.M., Rosa R.B., Schuck P.F., Ribeiro C.A.J., Wannmacher C.M.D., Wyse A.T.S., Dutra-Filho C.S. and Wajner M. (2003) Inhibition of brain energy metabolism by the α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1639, 232–238.
- Sheng M., Thompson M.A. and Greenberg M.E. (1991) CREB: a Ca^{2+} -regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science.* 252, 1427–1430.
- Snyderman S.E., Norton P.M., Roitman E. and Holt Jr L.E. (1964) Maple syrup urine disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics* 34, 454–472.
- Sofroniew M.V., Howe C.L. and Mobley W.C. (2001) Nerve Growth Factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Ann. Rev. Neurosc.* 24, 1217-1281.
- Sprong R.C., Winkelhuyzen-Janssen A.M.L., Aarsman C.J.M., van Oirschot J.F., Bruggen T., van Asbeck B.S. (1998) Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 1283–1293.
- Taketomi T., Kunishita T., Hara A. and Mizushima S. (1983) Abnormal protein and lipid compositions of the cerebral myelin of a patient with maple syrup urine disease. *Jpn. J. Exp. Med.* 53, 109–116.
- Tavares R.G., Santos C.E., Tasca C.I., Wajner M., Souza D.O. and Dutra-Filho C.S. (2000) Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *J. Neurol. Sci.* 181, 44-49.
- Terry Jr. A.V., Kutiyawalla A. and Pillai A. (2011) Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats. *Physiol. Behav.* 102, 149-157.

- Treacy E., Clow C.L., Reade T.R., Chitayat D., Mamer O.A. and Scriver C.R. (1992) Maple syrup urine disease: interrelationship between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *J. Inherit. Metab. Dis.* 15, 121–135.
- Tribble D. and Shapira R. (1983) Myelin proteins: degradation in rat brain initiated by metabolites causative of maple syrup urine disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114, 440–446.
- Wajner M. and Vargas C.R. (1999) Reduction of plasma concentrations of large neutral amino acids in patients with maple urine disease during crises. *Arch. Dis. Child.* 80, 579.
- Wajner M., Coelho D.M., Barschak A.G., Araújo P.R., Pires R.F., Lulhier F.L. and Vargas C.R. (2000) Reduction of large neutral amino acid concentration in plasma and CSF of patients with maple syrup urine disease during crises. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23, 505–512.
- Zhang L. and Jope R.S. (1999) Oxidative stress differentially modulates phosphorylation of ERK, p38 and CREB induced by NGF or EGF in PC12 cells. *Neurobiol. Aging.* 20, 271-278.
- Zielke H.R., Huang Y., Baab P.J., Collins Jr R.M., Zielke C.L. and Tildon J.T. (1997) Effect of alpha-ketoisocaproate and leucine on the in vivo oxidation of glutamate and glutamine in the rat brain. *Neurochem. Res.* 22, 1159-1164.
- Zielke H.R., Huang Y., Tildon J.T., Zielke C.L. and Baab P.J. (1996) 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. Neurosc.* 18, 420-425.

Zou L., Yuan X., Long Y., Shine H.D. and Yang K. (2002) Improvement of spatial learning and memory after adenovirus-mediated transfer of the nerve growth factor gene to aged rat brain. *Hum. Gene Ther.* 13, 2173-2184.

Figuras

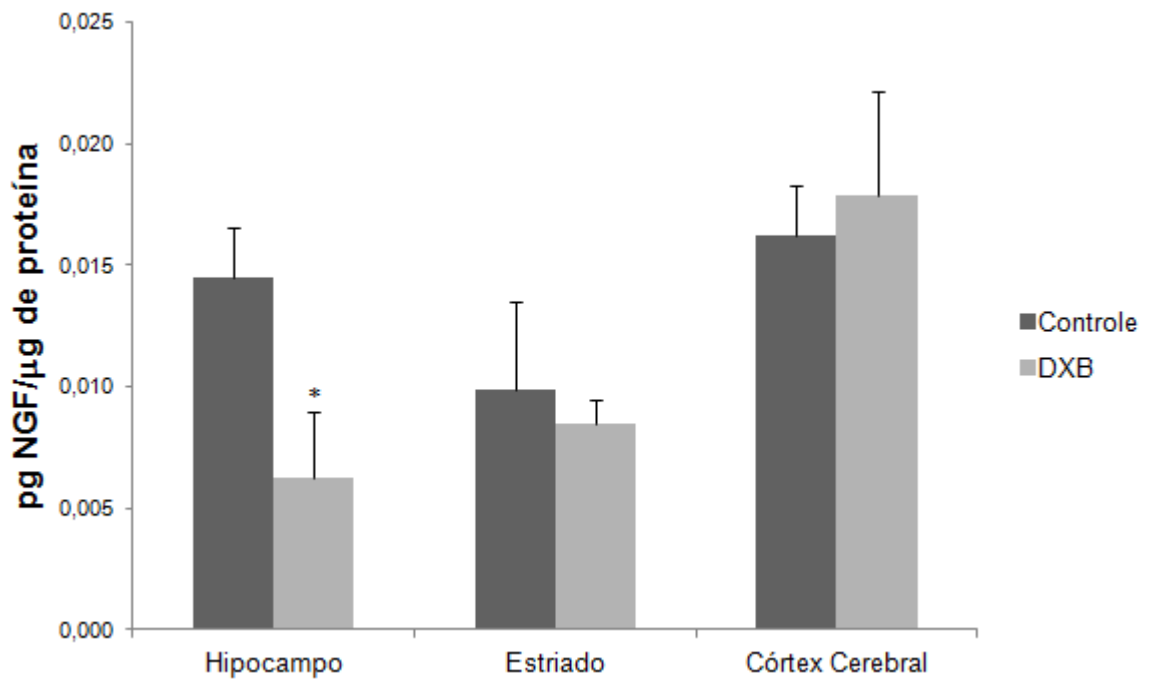


Figura 1: Efeito da administração aguda de AACR sobre os níveis de NGF no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. Diferente do controle, * $p < 0,05$ (teste t de Student).

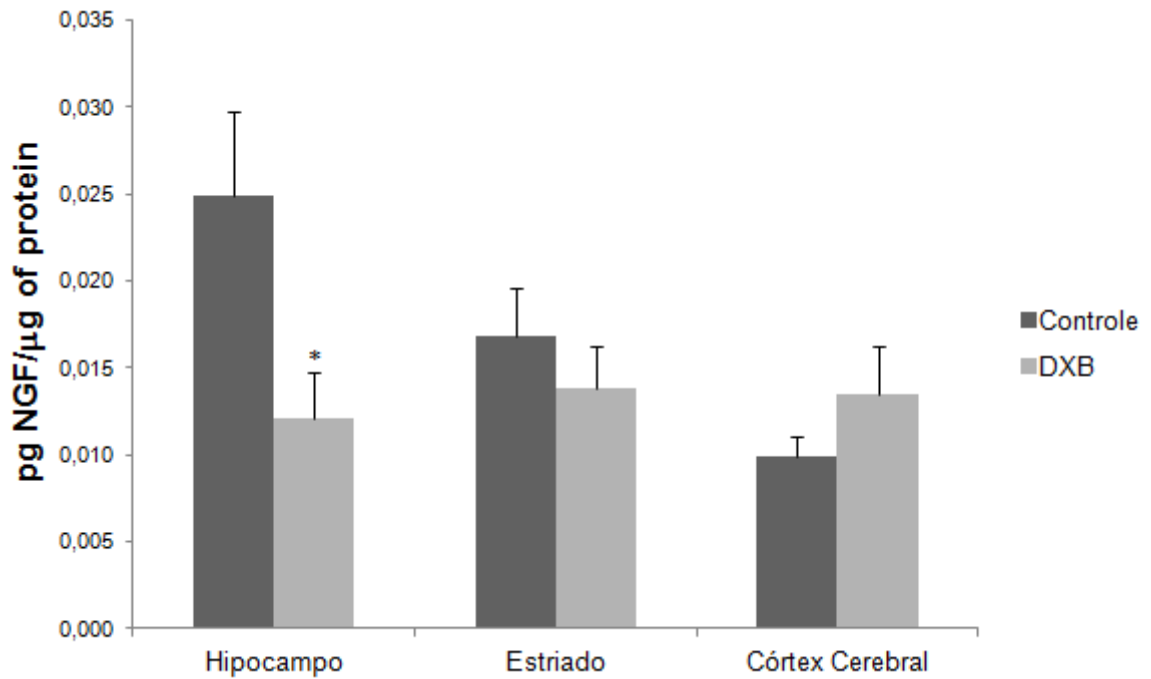


Figura 2: Efeito da administração aguda de AACR sobre os níveis de NGF no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 30 dias de idade. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. Diferente do controle, * $p < 0,05$ (teste t de Student).

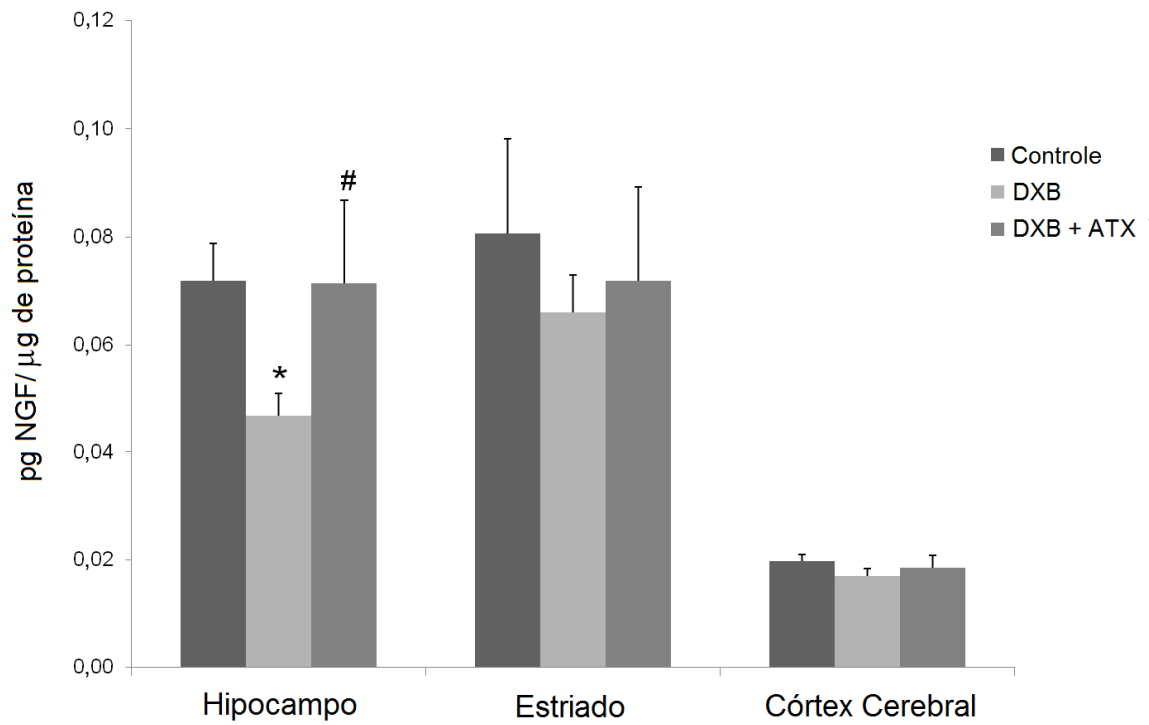


Figura 3: Efeito da administração crônica de AACR e aqueles tratados com antioxidantes (*N*-acetilcisteína e deferoxamina) sobre os níveis de NGF no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante o seu desenvolvimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. Diferente do controle, * $p < 0,05$; Diferente do DXB, # $p < 0,05$ (teste de Tukey).