

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

CURSO DE FARMÁCIA

KAROLINA VIRTUOSO DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ÁCIDO N-ACETILASPÁRTICO
SOBRE O DANO AO DNA EM RATOS**

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2012.

KAROLINA VIRTUOSO DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ÁCIDO N-ACETILASPARTICO
SOBRE O DANO AO DNA EM RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para obtenção do grau de Farmacêutica no curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck.

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2012.

KAROLINA VIRTUOSO DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ÁCIDO N-ACETILASPARTICO
SOBRE O DANO AO DNA EM RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Farmacêutica no curso de Farmácia, da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Fisiopatologia.

Criciúma, 26 de novembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Emilio Luiz Streck - Doutor - (UNESC) – Orientador

Prof.^a Patrícia Fernanda Schuck - Doutora - (UNESC)

Prof. Fábio Almeida Morais - Mestre - (UNESC)

Dedico este artigo ao Grupo de pesquisadores do Laboratório de Bioenergética da UNESC pelo apoio, paciência e dedicação durante esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, pela oportunidade de ser componente do seu grupo de pesquisa e por me ajudar “mesmo sem saber” a descobrir o caminho da minha vida profissional. Por toda a dedicação, humildade e paciência, muito obrigada.

À Profa. Dra. Patrícia Fernanda Schuck por não ser apenas um membro escolhido para banca, mas sim uma inspiração profissional. Espero um dia dar aula tão bem quanto você!

Ao Prof. Ms. Fábio Almeida Moraes por aceitar participar da banca de maneira espontânea, o meu obrigado e parabéns pelo novo integrante da família Moraes.

A todos os membros do Laboratório de Bioenergética da UNESC, em especial à Cinara, Giselli e Gabriela as principais responsáveis pela realização deste trabalho obrigada por dividir seus conhecimentos comigo.

À minha família e ao meu marido, Daniel, por todo incentivo, respeito e paciência.

A todos, muito obrigada!

“E assim, depois de muito esperar decidi triunfar... Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las. Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução. Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de encontrar um oásis. Decidi ver cada noite como um mistério a resolver. Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz. Naquele dia descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias limitações e que enfrentá-las era a única e melhor forma de superá-las. Naquele dia, descobri que eu não era o melhor e que talvez eu nunca tivesse sido. Deixei de me importar com quem ganha ou perde. Agora me importa simplesmente saber melhor o que fazer. Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir. Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados e passei a ser uma tênue luz no presente. Aprendi que de nada serve ser luz se não iluminar o caminho dos demais. Naquele dia, aprendi que os sonhos existem para tornar-se realidade”.

Walter Elias Disney

**Avaliação da administração aguda de ácido N-acetilaspártico sobre o dano
ao DNA em ratos**

**Evaluation of acute administration of N-acetylaspartic acid on DNA
damage in rats**

Karolina Virtuoso de Freitas^{1,2}, Emilio Luiz Streck^{1,2*}

¹ *Laboratório de Bioenergética, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil.*

² *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brasil.*

Título corrido: Ácido N-acetilaspártico e dano ao DNA.

* 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

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).

Resumo

A doença de Canavan (DC) é uma leucodistrofia progressiva causada pela deficiência da enzima aspartoacilase e caracterizada pelo acúmulo do ácido N-acetilaspártico (NAA). Os sintomas clínicos incluem retardo mental severo e progressivo, incapacidade de aquisição de funções motoras normais durante o desenvolvimento, hipotonia, macrocefalia e convulsões. No entanto, os mecanismos de dano cerebral causado pelo acúmulo de NAA não estão esclarecidos. Por sua vez, o conhecimento dos dispositivos envolvidos na patogênese das encefalopatias é de extrema relevância para a compreensão da doença, o que aumenta a possibilidade de prevenção e de um tratamento eficaz. Pesquisas mostraram que o NAA é capaz de promover estresse oxidativo através da diminuição da defesa antioxidante e formação acentuada de radicais livres. O presente trabalho visa investigar o potencial genotóxico de NAA em cérebro e sangue de ratos Wistar (14 dias) que receberam uma única administração subcutânea de salina e NAA 0,6 $\mu\text{mol/g}$. Uma hora após a administração os ratos foram mortos por decapitação, o sangue coletado e o córtex cerebral separado. Nossos resultados mostraram que a administração aguda de ácido N-acetilaspártico elevou significativamente o índice e a frequência de dano ao DNA. O estudo foi o primeiro que revelou o efeito genotóxico de NAA em cérebro e sangue de ratos infantis. Sugere-se que tal evidência pode estar associada com os déficits neurológicos apresentados pelos portadores da DC.

Palavras-Chave: Ácido N-acetilaspártico; doença de Canavan; dano ao DNA.

Abstract

Canavan's disease (AD) is a progressive leukodystrophy caused by the deficiency of the enzyme aspartoacylase and characterized by the accumulation of N-acetylaspartic (NAA). The clinical symptoms include severe mental retardation and progressive inability to acquire normal motor functions during development, hypotonia, macrocephaly, and convulsions. However, the mechanisms of brain damage caused by the accumulation of NAA are still poorly understood. In turn, knowledge of the devices involved in the pathogenesis of encephalopathies are extremely relevant better understand to the disease, increasing the chances of prevention and effective treatment. Researches have shown that the NAA was able to promote oxidative stress by reducing antioxidant defenses and increasing free radical formation. The present study aimed to investigate the genotoxic potential of NAA in the brain and blood of Wistar rats (14 days). Rats received a single subcutaneous administration of saline was administration of control cr and NAA 0.6 $\mu\text{mol/g}$. One hour after the administration the rats were killed by decapitation, blood and cerebral cortex collected separately. Our results showed that acute administration of NAA significantly increased index and frequency of DNA damage. The present study was the first to reveal the genotoxic effect of NAA in the brain and blood of infant rats. It is suggested that such evidence may be associated with neurological deficits presented by patients with AD.

Keywords: N-acetylaspartic; Canavan disease, DNA damage.

Introdução

A Doença de Canavan (DC) (OMIM: fenótipo 271900; OMIM: gene e locus 608034) é uma leucodistrofia de herança autossômica recessiva, causada por uma mutação no cromossomo 17, em específico no gene que expressa a enzima aspartoacilase (ASPA; EC 3.5.1.15). Esta enzima é responsável pela hidrólise de ácido N-acetilaspártico (NAA) em aspartato e acetato (Birnbaum, 1955; Birnbaum et al., 1952; Tallan et al., 1956). A deficiência de ASPA conduz a um acúmulo de NAA no cérebro e na urina (Grodd et al., 1990; Matalon et al., 1989). O NAA é um derivado de aminoácido encontrado no sistema nervoso, sendo considerado um dos mais abundantes do SNC de mamíferos, onde sua concentração pode chegar a 20 mM (Baslow, 2003; Harte et al., 2005).

Em 1931, a neuropatologista americana Myrtille May Canavan (1879–1953) publicou um artigo onde ela diagnosticou uma variante da doença de Schilder. Em 1986, Kvittingen e colaboradores descreveram pela primeira vez uma condição de "acidúria N-acetilaspártico" em uma criança com atrofia cerebral progressiva, em que a excreção da NAA era extremamente elevada na urina. A partir disto, outras condições foram sendo correlacionadas, como os achados de Matalon e colaboradores (1988) que atribuíram a acidúria de N-acetilaspártico à deficiência da enzima aspartoacilase.

Quando em níveis normais, nas diversas regiões do cérebro, o NAA garante a integridade e saúde neuronal. Já sua baixa concentração foi apontada como responsável por perda neuronal/axonal. Em contraste, os elevados níveis de NAA, tal qual encontrados em pacientes com Doença de Canavan, podem desencadear efeitos prejudiciais no SNC (Moffett et al., 2007).

Apesar da conexão estabelecida entre as mutações neste gene que codifica ASPA e a consequente falha em catabolizar NAA encontrada em pacientes com DC, a ligação concreta entre deficiência ASPA e o atraso no desenvolvimento do SNC foi esclarecida (Matalon et al., 1995).

Crianças com a DC parecem normais ao nascimento, porém geralmente entre o segundo e o sexto mês de idade surgem os primeiros sinais, que incluem atraso no desenvolvimento e diminuição no tônus muscular (hipotonia), incluindo dificuldade de sustentar a cabeça. Com um ano de vida, a macrocefalia é evidente e

o desenvolvimento motor é severamente comprometido (Moffet et al, 2007). Mais tarde, a criança tende a desenvolver neuropatia óptica e atrofia (Matalon e Michals-Matalon, 1999; Surendran et al., 2003), além de hipertonicidade com paralisia pseudobulbar. Em aproximadamente metade dos pacientes, há relatos de convulsões tônico-clônicas (Beudet, 2001; Traeger e Rapin, 1998). As crianças afetadas tornam-se cada vez mais debilitadas com a idade.

A morte ocorre geralmente antes da adolescência, sendo que pacientes com formas mais leves da doença podem sobreviver até 20 anos (Moffett et al., 2007) O diagnóstico pode ser confirmado com a presença de níveis aumentados de NAA na urina, sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR) dos pacientes (Surendran et al., 2003).

Pacientes com a DC apresentam tipicamente edema cerebral e degeneração espongiiforme da substância branca do cérebro. Observa-se que com a progressão da doença, o cérebro gradualmente atrofia-se e a substância cinzenta também é afetada (Matalon e Michals-Matalon, 2000). A atrofia cerebral progride, juntamente com o aumento da concentração tecidual de NAA (Janson et al., 2006).

Quanto ao tratamento há sugestões como a suplementação da dieta utilizando o acetato como adjuvante, baseado na hipótese de que a alteração na síntese de lipídios por uma produção anormal de acetato no cérebro possa contribuir para a fisiopatologia desta doença (Namboodiri et al., 2006). Contudo, a tentativa de minimizar a sintomatologia da doença é a única que demonstra certa eficácia, sendo possível controlar a ocorrência de convulsões (Matalon e Michals-Matalon, 1999).

O acúmulo de NAA parece ser o principal marcador bioquímico de pacientes afetados pela DC. No entanto os mecanismos subjacentes envolvidos no dano cerebral encontrado nestes indivíduos permanece obscuro, os indícios levam a crer que as concentrações elevadas de NAA nos tecidos e fluidos estejam relacionados à sua toxicidade ou a de seus metabólitos, principalmente no SNC (Beudet, 2001).

As espécies reativas de oxigênio (ER) tem potencial de oxidar as biomoléculas do organismo (Maxwell, 1995). Diversas ER podem promover diretamente lipoperoxidação na bicamada lipídica e podem reagir também com proteínas das membranas celulares, alterando as características de fluidez da membrana e levando, assim a perda de seletividade na troca iônica e a liberação de subprodutos potencialmente tóxicos. (Ferreira e Matsubara, 1997). Oxidando proteínas, as ER podem levar a inativação protéica, afetando a função das enzimas,

receptores e proteínas de transporte, levando consequentemente a alteração da função celular (Halliwell e Gutteridge, 2007). Na reação das ER com o DNA e RNA, o dano oxidativo pode causar alteração de bases púricas e pirimídicas, levando a mutações somáticas e distúrbios de transcrição (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Baseado na hipótese de danos neurotóxicos induzidos por NAA que incluem e indícios de estresse oxidativo e consequente potencial mutagênico, este trabalho visou investigar o potencial genotóxico de NAA em cérebro e sangue de ratos submetidos à administração aguda deste metabólito.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados 14 ratos Wistar de 14 dias de idade saudáveis, de ambos os sexos, e diferentes ninhadas. Os animais foram mantidos com as mães até serem mortos. Os pais (machos e fêmeas) dos filhotes foram de responsabilidade do biotério, normalmente utilizados na obtenção de novas ninhadas em outros experimentos. As mães tiveram livre acesso à água e alimento, com ciclo claro - escuro de 12 horas (claro das 7:00 às 19:00h), comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ$ C. Todos os experimentos foram realizados na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC – no Laboratório de Fisiopatologia Experimental e com o apoio do Laboratório de Biologia Celular e Molecular.

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 possui aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense, com número do protocolo 59/2012.

Administração aguda de NAA

O NAA foi dissolvido em solução salina (pH foi ajustado para 7,4) e a solução de NAA livre administrado por via subcutânea. A administração aguda de NAA

consistiu em uma única administração de NAA (dose) ou salina (grupo controle) administrada em ratos infantis (14 dias de idade), para tal utilizamos um $n = 7$. Uma hora após a administração os ratos foram mortos por decapitação, o sangue coletado com seringa heparinizada e o córtex cerebral separado para posterior análise. As amostras foram imediatamente armazenadas em ambiente refrigerado e ao abrigo da luz.

Ensaio cometa

Um protocolo padrão para a preparação e análises do teste cometa foi adotado (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000). Os esfregaços foram preparados pela mistura de 5 μ L de sangue (com tampão PBS) com 90 μ L de agarose LMP (0,75%). A mistura (células/agarose) foi adicionada a uma lâmina revestida com uma camada de 300 μ L de agarose NMP.

Após a solidificação, as lâminas foram postas em soluções lise (NaCl 2.5M, EDTA 100mM e Tris 10mM, pH 10,0 – 10,5), adicionadas a Triton X-100 1% e sulfóxido dimetil (DMSO) 10%. Subseqüentemente, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH 12,6) por 20min. O DNA submetido à eletroforese 15 min 25 V (0.90 V/cm) e 300mA, as lâminas neutralizados com Tris 0.4M (pH 7,5). Finalmente, o DNA foi corado com brometo de etídio e as lâminas analisadas em microscópio óptico de fluorescência com aumento de 400x.

Análise estatística

Para as análises dos parâmetros de dano ao DNA, todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística para o Índice de Dano e Freqüência de Dano, medido pelo Ensaio Cometa foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA); para dados que não apresentaram distribuição normal, foram feitas comparações usando o teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn como *post hoc*.

Resultados

O estudo investigou os efeitos da administração aguda de NAA sobre o dano ao DNA em córtex cerebral e sangue de ratos infantis, a fim de verificar o potencial genotóxico de NAA. Nossos resultados mostraram que a administração aguda de 0,06 $\mu\text{mol/g}$ de NAA elevou significativamente o índice e a frequência de dano ao DNA no sangue (Figura 1 e 2) e cérebro (Figura 3 e 4) de ratos infantis.

Discussão

O papel de NAA no metabolismo cerebral é pouco conhecido, porém há especulações como sua atuação na mielinogênese devido ao fato de atuar como fonte de grupos acetil que são incorporados a lipídios cerebrais (Madhavarao et al., 2005; Namboodiri, et al., 2006). Também se especula que o NAA pode ser uma forma de armazenamento de aspartato ou glutamato (Clark et al., 2006), e também como um carreador para a remoção do excesso de nitrogênio do cérebro (Moffett et al., 2007).

Sabe-se que o NAA é liberado dos neurônios para o LCR e então transportado para os oligodentrócitos (Huang et al., 2000; Sager et al., 1999). Acredita-se que o metabolismo característico deste complexo no cérebro seja importante para o funcionamento e manutenção da substância branca (Chakraborty et al., 2001; Matalon, 2000).

Embora seja encontrado em elevadas concentrações no SNC, sua função neuroquímica e metabólica permanece controversa (Beaudet, 2001). Baseado em um número relativamente modesto de pesquisas, algumas hipóteses iniciais foram propostas acerca das funções do NAA. Baslow (2002) sugere que o NAA remove o excesso de água metabólica dos neurônios. Segundo este pressuposto, a falta da atividade de ASPA leva a uma incapacidade no controle da osmolaridade em axônios, resultando em dano à bainha de mielina e uma leucodistrofia progressiva.

Há relatos demonstrando que o NAA pode ter influência significativa nos processos patológicos presentes na DC. São hipóteses, porém não há confirmação do mecanismo pelo qual ele atua. Os primeiros relatos da doença observada por Bogaert e Bertrand em 1949 já trazem como característica a degeneração esponjosa do sistema nervoso central da criança. Desde então o foco dos estudos levam a analisar o que causa essa condição. Já se sabe que o NAA tem participação na doença mas são apenas suposições.

Mediante tais dúvidas e tentando associar a degeneração aos danos clínicos e patológicos, tendo em vista que o sistema nervoso central parece sofrer mais com a ação de NAA, nossa pesquisa mostrou que o DNA dos ratos sofreu danos consideráveis após a administração das doses compatíveis as que se encontram em pacientes com DC.

Moffett e colaboradores (2007) salienta que o nível de NAA extracelular pode ser um fator crítico para determinar se este possui efeitos tóxicos. Evidências sugerem que os altos níveis de NAA no cérebro de pacientes com DC podem estar envolvidos em alguns aspectos da patogênese, possivelmente por induzir a atividade epiléptica. Sabe-se que as convulsões são um dos sintomas da fase tardia da DC, mas não foi conclusivamente demonstrado que níveis elevados de NAA são responsáveis pela atividade epiléptica. Contudo, deve-se considerar a possibilidade da hipomielinização observada na DC que também poderia levar a atividade epiléptica através do comprometimento da neurotransmissão normal (Moffett et al., 2007).

Acredita-se que uma das funções mais importantes do NAA seja a de atuar como um precursor imediato da biossíntese enzimática de N-acetilaspargilglutamato (NAAG), um dos neuropeptídeos mais abundantes do sistema nervoso (Gehl et al., 2004; Moffett et al., 2007). Do mesmo modo que o NAA, já foram demonstrados ações neurotóxicas de NAAG no cérebro, tanto *in vitro* (Thomas et al., 2000) quanto *in vivo* (Bubeniková-Valesová et al., 2006; Pliss et al., 2000; Pliss et al., 2002; Pliss et al., 2003), incluindo a indução de neurodegeneração, alteração comportamental e clivagem do DNA neuronal.

Os mecanismos subjacentes envolvidos no dano cerebral encontrado nos pacientes com DC permanecem obscuros. Os indícios levam a crer que as concentrações elevadas de NAA nos tecidos e fluidos estejam relacionadas à sua toxicidade ou a de seus metabólitos, principalmente no SNC (Beaudet, 2001).

Contudo, há relevantes pesquisas disponíveis na literatura que buscam a compreensão dos aspectos que cercam a funcionalidade e repercussão de NAA no SNC. Com neurônios de hipocampus isolados, o NAA foi apontado como indutor de uma rede sinalizadora que age sob a proteína-G acoplada aos receptores de glutamato metabotrópicos (G protein-coupled metabotropic glutamate receptors), promovendo excitação de neurônios, o que poderia contribuir para as crises epiléticas (Yan et al., 2003), confirmando os achados de Akimitsu et al. (2000), que

sugeriu NAA como um novo aminoácido envolvido no aparecimento de crises em alguns tipos de epilepsia. As contribuições de Klugmann et al. (2005) neste tema foram esclarecedoras, pois sugeriu forte participação de NAA no curso da epilepsia. Em seu estudo com Ratos tremor (um modelo genético da Doença de Canavan) houve redução parcial nos níveis cerebrais de NAA, o qual resultou na modulação tanto na duração quanto na frequência das crises observadas.

Alguns estudos apontaram que crises epiléticas estariam relacionadas a produção de espécies reativas e dano oxidativo (Bruce e Baudry, 1995; Liang et al., 2000). Apoiada em tais fundamentos, Pederzoli et al. (2007) constataram através da avaliação das defesas antioxidantes não enzimáticas e de marcadores de dano oxidativo, que NAA parece estar relacionado ao processo de estresse oxidativo em córtex de ratos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Neste trabalho, ainda foi mostrado que o tratamento *in vitro* com ácido ascórbico e Trolox (um derivado hidrosolúvel da vitamina E) impediram completamente o dano em lipídios promovido pelo NAA. Baseado no tipo de espécie reativa processada pelo antioxidante, utilizado sugere-se a participação de radicais hidroxila sobre o efeito observado (Bains e Shaw, 1997; Halliwell e Gutteridge).

O autor supra citado explicita seus pressupostos com outro trabalho, o qual verifica diminuição *in vitro* e *in vivo* na atividade das defesas antioxidantes enzimáticas catalase e glutathione peroxidase – em contraste, não houve alteração na atividade de superóxido dismutase – além de aumento na concentração de peróxido de hidrogênio em córtex de ratos que receberam NAA. Sugere-se que este aumento de peróxido de hidrogênio participe provavelmente junto ao radical hidroxila, que é gerado a partir do primeiro pela reação de Fenton, na neurotoxicidade causada pelo NAA (Pederzoli et al., 2007).

Nossa pesquisa mostrou resultados importantes que demonstram o efeito genotóxico do NAA ao DNA de cérebro e no sangue de ratos. A frequência e o índice de dano em DNA demonstram o elevado nível de toxicidade causado pelo aumento da concentração de NAA. É importante salientar que tais resultados foram os primeiros encontrados que relacionam a toxicidade do NAA sob o DNA em cérebro e sangue.

Mais estudos são necessários para associar tal evidência com a DC afim de esclarecer os mecanismos de ação dos déficits neurológicos característicos da doença.

Agradecimentos

Esta pesquisa teve o apoio 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).

REFERÊNCIAS

Akimitsu T, Kurisu K, Hanaya R, Lida K, Kiura Y, Arita K, Matsubayashi H, Ishihara K, Kitada K, Serikawa T, Sasa M. Epileptic seizures induced by N-acetylaspartate in rats: *in vivo* and *in vitro* studies. *Brain Res.* 2000;861:143-150.

Bains JS, Shaw CA. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal cell death. *Brain Res. Rev.* 1997;25:335-358.

Baslow MH. N-acetylaspartate in the vertebrate brain: metabolism and function. *Neurochem. Res.* 2003;28:941-953.

Baslow MH. Evidence supporting a role for N-acetyl-L-aspartate as a molecular water pump in myelinated neurons in the central nervous system – An analytical review. *Neurochem. Int.* 2002;40:295-300.

Beaudet A. Aspartoacylase Deficiency (Canavan Disease). In (Scriver, C.R., Beaudet, A. L., Sly, W.S., and Valle, D., eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York. 2001; 5799-5805.

Birnbaum SM. Amino acid acylases I and II from hog kidney. *Methods Enzymol.* 1955; vol. 4: 115-119.

Birnbaum SM, Levintow L, Kingsley RB, Greenstein JP. Specificity of amino acid acylases. *J Biol Chem.* 1952;194:455–470.

Bruce AJ, Baudry M. Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures. *Free Radic. Biol. Med.* 1995;18:993-100.

Bubeníková-Valesová V, Balcar V, Tejkalová H, Langmeier M, St'astny F. Neonatal administration of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate induces early neurodegeneration in hippocampus and alters behaviour in young adult rats. *Neurochem.* 2006;48:515-522.

Chakraborty G, Mekala P, Yahya D, Wu G, Ledeen R. Intraneuronal N-acetylaspartate supplies acetyl groups for myelin lipid synthesis: evidence for myelin-associated aspartoacylase. *J. Neurochem.* 2001;78:736-745.

Gehl LM, Saab OH, Bzdega T, Wroblewska B, Neale JH. Biosynthesis of NAAG by an enzyme-mediated process in rat central nervous system and glia. *J. Neurochem.* 2004;90: 989-997.

Clark JK, Doepke A, Filosa JA, Wardle RL, Lu A, Meeker TJ, Pyne-Geithman GJ. N-acetylaspartate as a reservoir of glutamate. *Med. Hypotheses.* 2006;67: 506-512.

Ferreira, ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Ver. Ass. Med. Brasil.* 1997; 43: 61-68.

Grodd W, Krageloh-Mann I, Peterson D, Trefz FK, Harzer K. In vivo assessment of N-acetylaspartate in brain in spongy degeneration (Canavan disease) by proton spectroscopy. *Lancet*. 1990;336:437-438.

Halliwell B, Gutteridge JMC. The chemistry of free radicals and related 'reactive species'. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1999;37-104.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press Inc, 2007.

Harte MK, Bachus SB, Reynolds GP. Increased N-acetylaspartate in rat striatum following long-term administration of haloperidol. *Schizophr*. 2005;75:303-308.

Huang W, Wang H, Kekuda R, Fei YJ, Friedrich A, Wang J, Conway SJ, Cameron RS, Leibach FH, Ganapathy V. Transport of N-acetylaspartate by the Na(+)-dependent high-affinity dicarboxylate transporter NaDC3 and its relevance to the expression of the transporter in the brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;295:392-403.

Janson CG, McPhee SWJ, Francis J, Shera D, Assadi M, Freese A, Hurh P, Haselgrove J, Wang DJ, Bilaniuk L, Leone P. Natural history of Canavan Disease revealed by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy (1H-MRS) and Diffusionweighted MRI. *Neuropediatrics*. 2006;37:209-221.

Klugmann M, Leichtlein CB, Wymond Symes C, Serikawa T, Young D, During MJ. Restoration of aspartoacylase activity in CNS neurons does not ameliorate motor deficits and demyelination in a model of Canavan Disease. *Mol. Ther*. 2005;11:745-753.

Liang LP, Ho YS, Patel M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. *Neuroscience*. 2000;101:563-570.

Madhavarao CN, Arun P, Moffett JR, Szucs S, Sunrendran S, Matalon R, Garbern J, Hristova D, Johnson A, Jiang W, Namboodiri AMA. Defective N-acetylaspartate catabolism reduces brain acetate levels and myelin lipid synthesis in Canavan's Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005;102:5221-5226.

Matalon R, Kaul R, Casanova J, Michals K, Johnson A, Rapin I, Gashkoff P, Deanching M. Aspartoacylase deficiency: the enzyme defect in Canavan disease. 1989;12:329-331.

Matalon R, Michals K, Kaul R. Canavan disease: from spongy degeneration to molecular analysis. *J. Pediatr*. 1995;127:511-517.

Matalon R, Michals-Matalon K. Biochemistry and molecular biology of Canavan disease. *Neurochem Res*. 1999;24(4):507-513.

Matalon R, Michals-Matalon K. Spongy degeneration of the brain, Canavan Disease: biochemical and molecular findings. *Frontiers in Bioscience*. 2000;5:307-311.

- Maxwell SRJ. Propects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 1995;49: 345-361.
- Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri AMA. Nacetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog. Neurobiol.* 2007;81:89-131.
- Namboodiri AMA, Peethambaran A, Mathew R, Sambhu PA, Hershfield J, Moffett JR, Madhavarao CN. Canavan disease and the role of N-acetylaspartate in myelin synthesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2006;252:216-223.
- Pederzolli CD, Sgaravatti AM, Braum CA, Prestes CC, Zorzi GK, Sgarbi MB, Wyse ATS, Wannmacher CMD, Wajner M, Dutra-Filho CS. 5-oxoproline reduces non-enzymatic antioxidant defenses *in vitro* in rat brain. *Metab. Brain Dis.* 2007;22:51-65.
- Pliss L, Balcar VJ, Bubeníková V, Pokorn J, FitzGibbon T, St'astn F. Morphology and ultra-structure of rat hippocampal formation after i.c.v. administration of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. *Neuroscience.* 2003;122:93-101.
- Pliss L, FitzGibbon T, Balcar VJ, St'astn F. Neurotoxicity of NAAG *in vivo* is sensitive to NMDA antagonists and mGluR II ligands. *Neuroreport.* 2000;11:3651-3654.
- Pliss L, Jezová D, Mares V, Balcar VJ, St'astny F. N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamate changes functional and structural properties of rat blood-brain barrier. *Neurosci. Lett.* 2002;317:85-88.
- Sager TN, Thomsen C, Valsborg JS, Laursen H, Hansen AJ. Astroglia contain a specific transport mechanism for N-acetyl-L-aspartate. *J Neurochem.* 1999;73:807–811.
- Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, Schneider ELA. Simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experim Cell Res.* 1998;175:184-191.
- Surendran S, Michals-Matalon K, Quast MK, Tying SK, Wei J, Ezell EL, Matalon R. Canavan disease: a monogenic trait with complex genomic interaction. *Mol. Genet. Metab.* 2003;80:74-80.
- Tallan HH, Moore S, Stein WH. N-Acetyl-L-aspartic acid in brain. *J Biol Chem.* 1956; 219:257-264.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2000;35: 206–221.
- Thomas AG, Vornov JJ, Olkowski JL, Merion AT, Slusher BS. N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase converts N-acetylasparylglutamate from a neuroprotectant to a neurotoxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000;295:16-22.
- Traeger EC, Rapin I. The clinical course of Canavan Disease. *Pediatric Neurol.* 1998; 18:207-212.

Yan HD, Ishihara K, Serikawa T, Sassa M. Activation by N-acetyl-L-aspartate of acutely dissociated hippocampal neurons in rats via metabotropic glutamate receptors. *Epilepsia*. 2003;44:1153-1159.

Figuras e Legendas

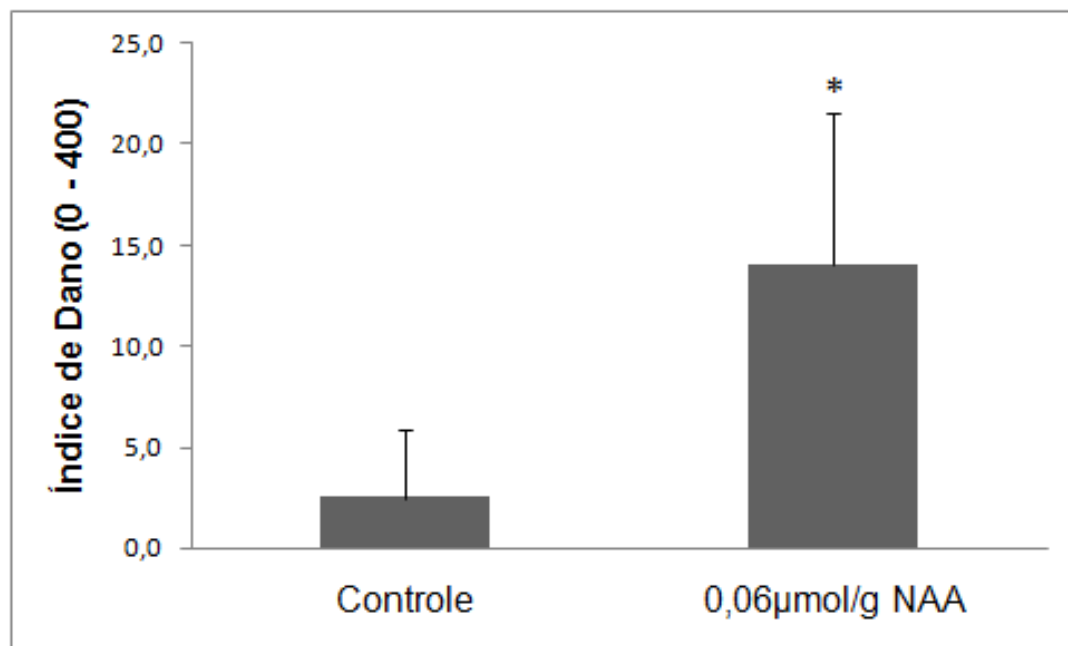


Figura 1: Índice de dano ao DNA em sangue de ratos infantis após a administração aguda de ácido N-acetilaspártico (NAA). Média (\pm DP) dos valores. Dados significantes em relação ao controle, * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, Dunn).

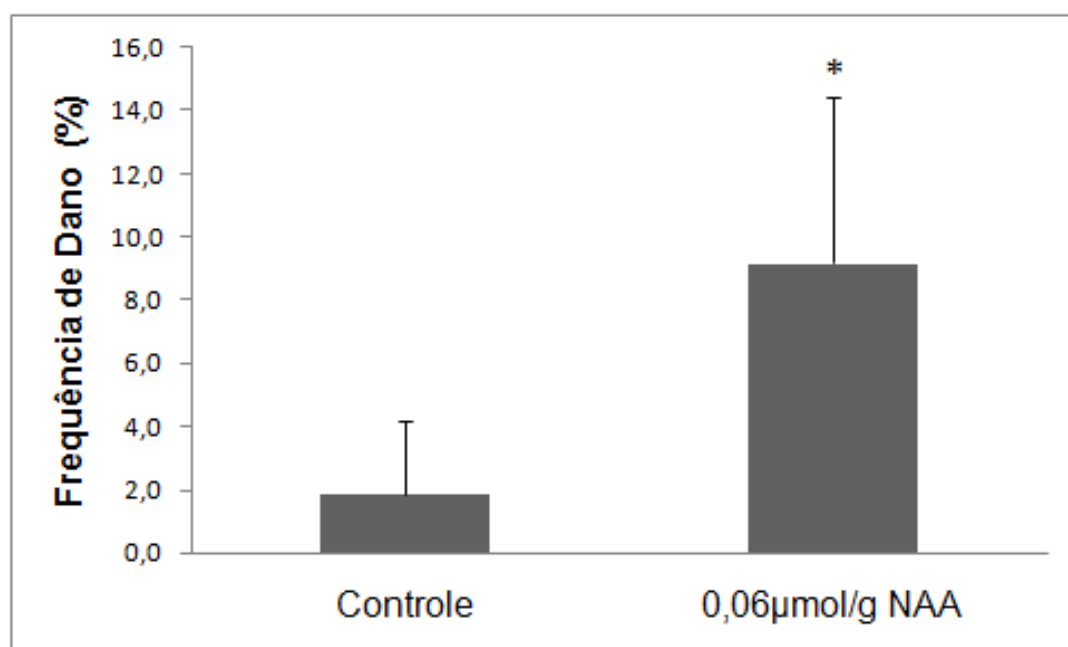


Figura 2: Frequência de dano ao DNA em sangue de ratos infantis após a administração aguda de ácido N-acetilaspártico (NAA). Média (\pm DP) dos valores. Dados significantes em relação ao controle, * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, Dunn).

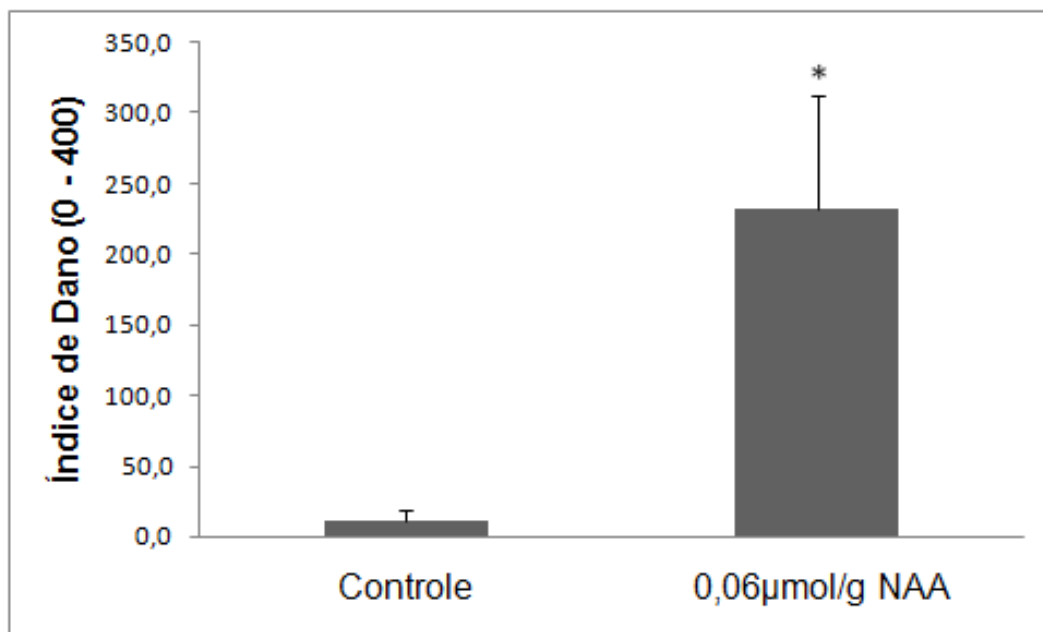


Figura 3: Índice de dano ao DNA em córtex cerebral de ratos infantis após a administração aguda de ácido N-acetilaspártico (NAA). Média (\pm DP) dos valores. Dados significantes em relação ao controle, * $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis, Dunn).

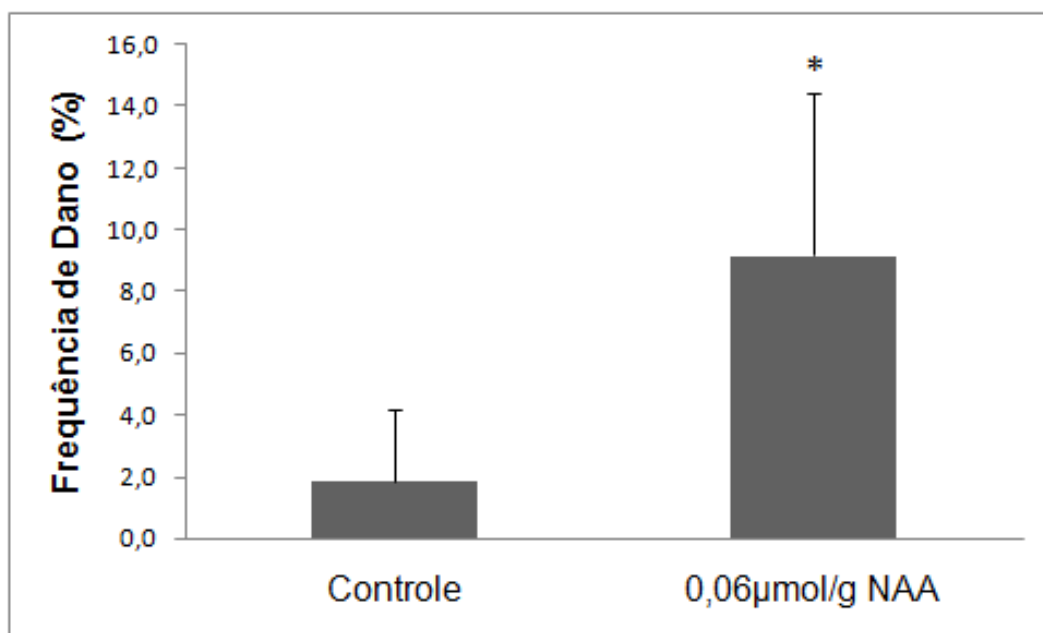


Figura 4: Frequência de dano ao DNA em córtex cerebral de ratos infantis após a administração aguda de ácido N-acetilaspártico (NAA). Média (\pm DP) dos valores. Dados significantes em relação ao controle, * $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis, Dunn).

PROJETO DE CONCLUSÃO DE CURSO ELABORADO NA DISCIPLINA DE TCC I

1. INTRODUÇÃO

A partir dos estudos iniciados por Garrod, hoje conceitua-se como erros inatos do metabolismo (EIM) o grupo de doenças determinadas geneticamente caracterizadas por um defeito específico (geralmente enzimático) que leva ao bloqueio de uma determinada via metabólica. Esse bloqueio tem como consequência o acúmulo do substrato da enzima deficiente, a diminuição do produto da reação ou o desvio do substrato para uma via metabólica alternativa (KARAM; SCHWARTZ; GIUGLIANI, 2001). Dependendo da importância da rota afetada, este bloqueio repercute de forma clínica variável, geralmente provocando sintomatologia grave, que na maioria das vezes afeta o sistema nervoso central (SNC) (SCRIVER et al., 2001).

Os EIM são, de maneira geral, distúrbios graves, que se manifestam na infância e são de difícil diagnóstico inicial devido às diferentes alterações manifestadas, o que acarreta um mau prognóstico ao paciente (GIUGLIANI, 1988).

A Doença de Canavan é uma leucodistrofia de herança autossômica recessiva, causada por uma mutação no cromossomo 17, em específico no gene que expressa aspartoacilase. Esta enzima é responsável pela hidrólise de ácido N-acetilaspártico (NAA) em aspartato e acetato (BIRNBAUM, 1955; BIRNBAUM et al., 1952; TALLAN; MOORE; STEIN, 1956). A deficiência da enzima conduz a um acúmulo de NAA no cérebro e na urina (GRODD et al., 1990; MATALON et al., 1989).

Crianças com a Doença de Canavan parecem normais no nascimento, porém geralmente entre o segundo e o sexto mês de idade aparecem os sinais, que incluem atraso no desenvolvimento e diminuição no tônus muscular (hipotonia), incluindo dificuldade de sustentar a cabeça. Com um ano, a macrocefalia é evidente e o desenvolvimento motor é severamente comprometido (MOFFETT et al, 2007). Mais tarde a criança tende a desenvolver neuropatia óptica e atrofia óptica (MATALON e MICHALS=MATALON, 1999; SURENDRAN et al., 2003) além de hipertonicidade com paralisia pseudobulbar. Em aproximadamente metade dos pacientes há relatos de convulsões tônico-clônicas. As crianças afetadas tornam-se cada vez mais debilitadas com a idade (TRAEGER e RAPIN, 1998; BEAUDET, 2001). A morte tipicamente ocorre antes da adolescência, mas alguns pacientes com

formas mais leves da doença podem sobreviver até os 20 anos ou ainda mais (MOFFETT et al, 2007).

O ácido N-acetilaspártico (NAA) é um derivado de aminoácido encontrado exclusivamente no sistema nervoso, sendo considerado um dos mais abundantes do SNC de mamíferos, onde sua concentração pode chegar a 20 mM (BASLOW, 2003; HARTE et al., 2005).

Quando em níveis normais, nas diversas regiões do cérebro, o NAA garante a integridade e saúde neuronal. Já sua baixa concentração foi apontada como responsável por perda neuronal/axonal e comprometimento do metabolismo neuronal. Em contraste, os excessíveis níveis de NAA, tal qual encontrados em pacientes com Doença de Canavan, podem desencadear efeitos prejudiciais ao SNC (MOFFETT et al, 2007).

Embora seja encontrado em elevadas concentrações no SNC sua função neuroquímica e metabólica permanece controversa (BEAUDET, 2001). Baseado em um número relativamente modesto de pesquisas, algumas hipóteses iniciais foram propostas a cerca das funções do NAA. Baslow (2002) sugere a atuação de NAA como um osmólito orgânico intracelular que remove o excesso de água metabólica dos neurônios. Segundo este pressuposto, a falta da atividade de aspartoacilase leva a uma incapacidade no controle da osmolaridade em axônios, resultando em dano à bainha de mielina e uma leucodistrofia progressiva. Além disso, tem-se demonstrado NAA como fonte de grupos acetil para a síntese de lipídios, que por sua vez são incorporados na mielina de oligodendrócitos.

Outra importante função atribuída ao NAA é como precursor imediato da biosíntese enzimática de N-acetilaspartilglutamato (NAAG), um importante neuropeptídeo neuronal (MOFFETT et al., 2007).

Estudos sugerem que o metabolismo do NAA na Doença de Canavan encontra-se alterado também na retina neural, o que pode estar relacionado à neuropatia óptica observada nessa doença (BASLOW, 2003; GEORGE et al., 2004). O NAA também é capaz de aumentar a concentração intracelular de cálcio em células (RUBIN et al., 1995).

Moffet e colaboradores (2007) salientam que o nível de NAA extracelular pode ser um fator crítico para determinar se este possui efeitos tóxicos. Evidências sugerem que os altos níveis de NAA no cérebro de pacientes com Doença de Canavan podem estar envolvidos em alguns aspectos da patogênese,

possivelmente por induzir a atividade epilética. Sabe-se que as convulsões são um dos sintomas da fase tardia da Doença de Canavan, mas não foi conclusivamente demonstrado que níveis elevados de NAA são responsáveis pela atividade epilética.

Contudo, deve-se considerar a possibilidade da hipomielinização observada na Doença de Canavan que também poderia levar a atividade epilética através do comprometimento da neurotransmissão normal (MOFFETT et al., 2007).

Do mesmo modo que o NAA, já foram demonstradas ações neurotóxicas de NAAG no cérebro, tanto *in vitro* (THOMAS et al., 2000) quanto *in vivo* (PLISS et al., 2000; PLISS et al., 2002; PLISS et al., 2003; BUBENÍKOVÁ-VALESOVÁ et al., 2006), incluindo a indução de neurodegeneração, alteração comportamental e clivagem do DNA neuronal.

O diagnóstico baseia-se em características clínicas e exames de imagem do crânio. O marcador bioquímico clássico da Doença de Canavan é o aumento das concentrações de NAA em plasma, urina, líquido céfalo-raquidiano (LCR) e cérebro dos pacientes afetados (SURENDRAN et al., 2003). Os testes são realizados através da cromatografia em fase gasosa/ espectrometria de massa e/ou através de análise enzimática de culturas de fibroblastos. Devido ao maior número de casos entre a população de Judeus Ashkenazi é possível realizar análise mutacional, no entanto os estudos bioquímicos devem permanecer a base primária para o diagnóstico da doença (JACKOBS et al., 1991; KELLEY e STAMAS, 1992).

Paciente com Doença de Canavan apresentam tipicamente edema cerebral e degeneração esponjiforme da substância branca do cérebro. Observa-se que com a progressão da doença, o cérebro gradualmente se atrofia e a substância cinzenta também é afetada (MATALON e MICHALS-MATALON, 2000). A atrofia cerebral progride juntamente com o aumento da concentração tecidual de NAA (JANSON et al., 2006). Além de anormalidades simétricas de substância branca. Na autópsia, a substância branca é tipicamente macia e gelatinosa. A mudança esponjosa ou vacuolização é vista nas camadas inferiores da substância cinzenta e na substância branca subcortical, a substância branca mais central tende a ser relativamente ou totalmente poupada (BEAUDET, 2001).

O Ensaio Cometa, também conhecido como SCGE (Single-Cell Gel Electrophoresis), é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA em células individualizadas. As células nas quais se deseja verificar o dano ocasionado ao seu DNA, são suspensas em agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e então colocadas

em lâminas de vidro para microscopia as quais são previamente recobertas com uma camada de agarose normal. As lâminas contendo as células são então submetidas a uma corrida de eletroforese (SPEIT; HARTMANN, 1999). Nessa técnica, observou-se que nas células irradiadas, após a corrente elétrica com pH neutro, partes do DNA foram arrastadas do seu núcleo e fragmentos produzidos por ligações cruzadas e quebradas na fita de DNA migram mais, resultando na imagem de um “cometa”, sendo a matriz nuclear a cabeça e o DNA quebrado a calda (Figura 1) (FAIRBARIN, OLIVE e O’NEIL, 1994).

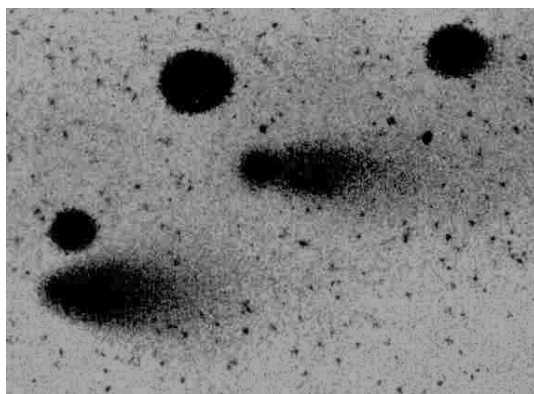


Figura 1: Visualização do Ensaio Cometa.
Fonte: Fairbairn et al., 1994.

O DNA contido em células de organismos eucariotos possui alguns centímetros de comprimento. Para que o DNA seja acomodado no interior do núcleo que possui entre 5 μm e 10 μm de largura, este DNA tem que ser fortemente condensado. Danos impostos à molécula de DNA provocam um relaxamento desta condensação e ocasionalmente quebras na estrutura molecular (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999; COLLINS et al. 2008).

O princípio desta técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não tiver dano migrará em conjunto formando um círculo (os aspectos descritos só são visíveis após a coloração adequada). Caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores. Ocorrendo um dano muito intenso em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então a figura típica de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990; COLLINS et al. 2008).

As quebras detectadas pelo ensaio podem ocorrer em virtude da digestão do DNA no processo de apoptose. Para OLIVE, BANÁTH e DURAND (1990), as células que se encontram neste processo são distinguíveis das outras, pois não apresentam um nucleóide típico, estando todo seu DNA fragmentado.

Baseado na hipótese de danos neurotóxicos induzidos por NAA que incluem potencial mutagênico e indícios de estresse oxidativo, este trabalho visa investigar o potencial genotóxico de NAA em cérebro de ratos submetidos à administração aguda deste metabólito. Para tal será realizado o ensaio cometa para a verificação de possíveis danos ao DNA.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos *in vivo* do ácido N-acetilaspártico, principal metabólito acumulado na Doença de Canavan, sobre os parâmetros de dano em DNA em cérebro e sangue de ratos jovens.

3. METODOLOGIA

Todos os experimentos serão realizados na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC – no Laboratório de Fisiopatologia Experimental e Laboratório de Biologia Celular e Molecular.

Os procedimentos experimentais serão 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 será executado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

3.1. Animais experimentais e Comitê de Ética

Serão utilizados 28 ratos Wistar de 14 dias de idade, de ambos os sexos, e diferentes ninhadas. Os animais serão mantidos com as mães até serem mortos. Os pais (machos e fêmeas) dos filhotes serão de responsabilidade do biotério, normalmente utilizados na obtenção de novas ninhadas em outros experimentos. As mães terão livre acesso a água e alimento, com ciclo claro - escuro de 12 horas (07:00 às 19:00) (Claro das 7:00-19:00h) e comida e água *ad libitum*. O ambiente será mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$.

3.1.1. Critérios de definição para o tamanho da amostra

O tamanho da amostra será de 7 ratos por grupo, totalizando uma amostra 28 animais, número suficiente para uma satisfatória análise estatística.

Os animais (28 no total) serão divididos em dois grupos (7 animais cada grupo). 1) administração de salina (1 mL/kg i.p); 2) administração de ácido N-acetilaspártico (0,6 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal subcutaneamente). Serão administrados em dose única. Uma hora após a administração os ratos serão mortos por decapitação, o sangue coletado com seringa heparinizada e o córtex cerebral separado para posterior análise. As amostras serão imediatamente armazenadas em ambiente refrigerado e ao abrigo da luz.

3.1.2 Destino dos animais após o experimento

O descarte de animais utilizados neste experimento será o acondicionamento em saco branco leitoso e encaminhados para freezer (conservação) na universidade. Após conservação, serão coletados e transportados por empresa terceirizada. Os resíduos são tratados fisicamente e posteriormente encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos são conforme RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

3.2. Desenho experimental

Administração aguda de NAA: O NAA será dissolvido em solução salina (pH será ajustado para 7,4) e a solução de NAA livre será administrado por via subcutânea. A administração aguda de NAA consistirá em uma única administração de NAA ou salina (grupo controle) administrada em ratos infantis (14 dias de idade). Serão divididos em quatro grupos.

- Grupo 1: Controle
- Grupo 2: NAA 0,6 $\mu\text{mol/g}$

3.2.1. Ensaio cometa

Um protocolo padrão para a preparação e análises do teste cometa será adotado (Singh et al., 1998; Tice et al., 2000). Os esfregaços serão preparados pela mistura de 5 μL de sangue (com tampão PBS) com 90 μl de agarose LMP (0,75%). A mistura (células/agarose) será adicionada a uma lâmina revestida com uma camada de 300 μl de agarose NMP.

Após a solidificação, as lâminas serão postas em soluções lise (NaCl 2.5M, EDTA 100mM e Tris 10mM, pH 10,0 – 10,5), adicionadas a Triton X-100 1% e sulfóxido dimetil (DMSO) 10%. Subseqüentemente, as lâminas serão incubadas em tampão alcalino (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH 12,6) por 20min. O DNA será submetido à eletroforese 15min 25 V (0.90 V/cm) e 300mA, as lâminas serão neutralizados com Tris 0.4M (pH 7,5). Finalmente, o DNA será corado com brometo de etídio e as lâminas serão analisadas em microscópio óptico de fluorescência com aumento de 400x.

3.3.1 Análise estatística

Para as análises dos parâmetros de dano em DNA, todos os dados serão expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística para o Índice de Dano e Frequência de Dano, medido pelo Ensaio Cometa serão analisados por análise de variância de uma via (ANOVA); para dados que não apresentarem distribuição normal, serão feitas comparações usando o teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn como *post hoc*.

4. Cronograma

A tabela abaixo resume o cronograma das atividades para o projeto ora proposto.

Atividades	Mai/junho. 2012	Julho/Ago. 2012	Setembro. 2012	Outubro. 2012	Novembro 2012	Dezembro 2012
Coleta de dados bibliográficos	X	X	X	X	X	
Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESC	X					
Administração aguda de NAA		X				
Ensaio Cometa		X				
Análises dos dados e redação dos manuscritos que serão submetidos a periódicos			X	X		
Apresentação dos resultados TCC II					X	
Publicação dos resultados						X

5. Orçamento

Discriminação	Quantidade	Valor Total R\$
Animais experimentais	28	364,00
Ácido N-acetilaspártico	---	450,00
Reagentes para o ensaio cometa	---	1500,00
Total		2340,00

***Projeto financiado pelo CNPq, UNESCO, INCT.**

6. REFERÊNCIAS

BASLOW, M.H. N-acetylaspartate in the vertebrate brain: metabolism and function. **Neurochem. Res.** v. 28, 2003. 941-95 p.

BASLOW, M.H. Evidence supporting a role for N-acetyl-L-aspartate as a molecular water pump in myelinated neurons in the central nervous system – An analytical review. *Neurochem*,2002. 295-300 p.

BEAUDET, A. Aspartoacylase Deficiency (Canavan Disease). In (Scriver, C.R., Beaudet, A. L., Sly, W.S., and Valle, D., eds.), **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, McGraw-Hill, New York, 2001. 5799-5805 p.

BINBAUM, S.M. Amino acid acylases I and II from hog kidney. **Methods Enzymol**, v. 2, 1955. 115–119 p.

BIRNBAUM, S. M. et al. Specificity of amino acid acylases. **J Biol Chem**, v. 194, 1952. 455–470p.

BUBENÍKOVÁ-VALESOVÁ, V. et al. Neonatal administration of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate induces early neurodegeneration in hippocampus and alters behaviour in young adult rats. **Neurochem. Int.** v. 48, 2006. 515-522p.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, 2008. 143-151 p.

FAIRBAIRN DW; OLIVE PL; O`NEILL KL. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research.** 1994. 37- 59 p.

GEORGE, R.L. et al. **Transport of Nacetylaspartate via murine sodium/dicarboxylate cotransporter NaDC3 and expression of this transporter and aspartoacylase II in ocular tissues in mouse.** *Biochim. Biophys. Acta*, 2004. 63-69 p.

GIUGLIANI, R. Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. **Pediatria Moderna**, v. 23, 1988. 29-40p.

GRODD, W. et al. In vivo assessment of N-acetylaspartate in brain in spongy degeneration (Canavan disease) by proton spectroscopy. **Lancet.** v. 336, 1990. 437-438 p.

HARTE, M.K.; BACHUS, S.B.; REYNOLDS, G.P. Increased N-acetylaspartate in rat striatum following long-term administration of haloperidol. **Schizophr. Res.** v. 75, 2005. 303-308 p.

JAKOBS, C. et. al. **Stable isotope dilution analysis of N-acetylaspartic acid in CSF, blood, urine and amniotic fluid Accurate postnatal diagnosis and the potential for prenatal diagnosis of Canavan disease**, 1991. 653 p.

JANSON, C.G. et al. Natural history of Canavan Disease revealed by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy (1H-MRS) and Diffusionweighted MRI. **Neuropediatrics**. v. 37, 2006. 209-221 p.

KARAM, S. M.; SCHWARTZ, I.V.; GIUGLIANI, R. Introdução e aspectos clínicos dos erros inatos do metabolismo. In: Carakushansky O. **Doenças Genéticas em Pediatria**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 155-158 p.

KELLEY, R. I.; STAMAS, J.N. **Quantification of N-acetyl-L-aspartic acid in urine by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry**. 1992. 97 p.

MATALON, R. et al. Aspartoacylase deficiency: the enzyme defect in Canavan disease. **J Inherit Metab Dis**. v. 12 (Suppl 2), 1989. 329-331 p.

MATALON, R.; MICHALS-MATALON, K. Biochemistry and molecular biology of Canavan disease. **Neurochem Res**. v. 24(4), 1999. 507-513 p.

MATALON, R.; MICHALS-MATALON, K. Spongy degeneration of the brain, Canavan Disease: biochemical and molecular findings. **Frontiers in Bioscience**. v. 5, 2000. 307-311 p.

MOFFETT, J.R. et al. Nacetylaspargate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. **Prog. Neurobiol**, 2007. 89-131 p.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiationinduced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiation Research, Oak Brook**, v. 122, 1990. 86-94 p.

PLISS, L. et al. Morphology and ultra-structure of rat hippocampal formation after i.c.v. administration of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. **Neuroscience**. v. 122, 2003. 93-101 p.

PLISS, L. et al. Neurotoxicity of NAAG *in vivo* is sensitive to NMDA antagonists and mGluR II ligands. **Neuroreport**. v. 11, 2000. 3651-3654 p.

PLISS, L. et al. N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamate changes functional and structural properties of rat blood-brain barrier. **Neurosci. Lett**. v. 317, 2002. 85-88 p.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B, Amsterdam**, v. 722, 1999. 225-254 p.

RUBIN, Y. et al. The effect of Nacetylaspargate on the intracellular free calcium concentration in Ntera2-neurons. **Neurosci. Lett**, 1995. 209-212 p.

SCRIVER, C.R. et al. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8^a ed. New York: McGraw-Hill, 2001. 3-45 p.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experim Cell Res.* v.175, 1998.184-191 p.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single cell gel test) – a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: **Henderson, D. S. (Ed.) Methods in Molecular Biology: DNA repair protocols – eukaryotic systems**, Totowa, v. 113, 1999. 203-212 p.

SURENDRAN, S. et al. **Canavan disease: a monogenic trait with complex genomic interaction. *Mol. Genet. Metab.* 80: 74-80, 2003.**

TALLAN, H. H.; MOORE, S.; STEIN, W.H. N-Acetyl-L-aspartic acid in brain. ***J Biol Chem.* v. 219, 1956. 257-264 p.**

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. ***Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.35, 2000. 206–221 p.**

THOMAS, A.G.; et al. N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase converts N-acetylaspartylglutamate from a neuroprotectant to a neurotoxin. ***J. Pharmacol. Exp. Ther.* v. 295, 20000. 16-22 p.**

TRAEGER, E.C.; RAPIN, I. The clinical course of Canavan Disease. ***Pediatric Neurol.* v. 18, 1988. 207-212 p.**

Normas de formatação revista Inova Saúde.

1. Folha de Rosto

- a) Deve constar título completo (no idioma português e em inglês), nome(s) do(s) autor(es) e da(s) respectiva(s) instituição(ões) por extenso, com endereço completo apenas do autor responsável pela correspondência, incluindo e-mail;
- b) Título corrido: máximo de 50 caracteres;
- c) Órgãos e instituições financiadores: quando for o caso, citar duas linhas abaixo, logo após o endereço.

2. Resumo

Todos os artigos submetidos à Revista Inova Saúde, com exceção das contribuições enviadas às seções Ponto de Vista e Relato de Experiência, deverão ter resumo na língua portuguesa e em inglês. O Resumo deverá conter no máximo 1500 caracteres com espaço, escrito em parágrafo único, contendo o texto para objetivos, desenvolvimento, resultados e conclusões. Porém, não mencionar no resumo os itens que compõem a estrutura do manuscrito. Serão aceitos entre 03 e 05 palavras-chave que deverão estar de acordo com Descritores em Ciências da Saúde - DECS (<http://decs.bvs.br>). O resumo na tradução para o inglês será nomeado Abstract e deverá conter 3 a 5 keywords de acordo com os DECS e com Medical Subject Headings - MESH (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>).

3. Apresentação das seções

O corpo de texto deve apresentar seqüência lógica, organizada em partes distintas (introdução, desenvolvimento, conclusões), considerando-se a categoria do manuscrito envolvida.

- a) corpo do texto: apresentado em folha A4, margem superior, inferior, direita e esquerda iguais a 2,5 cm. O texto deve possuir espaço 1,5 (entrelinhas), fonte Arial, tamanho 12. Deverá ser iniciado pela introdução e apresentado de maneira contínua, sem novas páginas para cada subtítulo;
- b) Notas de rodapé e anexos não serão aceitos.

4. Referências Bibliográficas

a) as referências deverão ser citadas no corpo do manuscrito, de acordo:

- Um autor: Sobrenome do autor (sem iniciais, com exceção quando houver ambiguidade) e o ano de publicação;
- Dois autores: Sobrenome de ambos os autores e o ano de publicação;
- Três ou mais autores: Sobrenome do primeiro autor seguido por "et al." e o ano de publicação;

b) as citações poderão ser feitas diretamente (ou parênteses). Grupos de referências devem ser listadas primeiro por ordem alfabética, em seguida, em ordem cronológica.

c) o número de referências deve estar de acordo com a categoria do manuscrito apresentado à Revista Inova Saúde (ver categorias de manuscritos);

d) as referências listadas serão normatizadas de acordo com o "Estilo Vancouver", norma elaborada pelo International Committee of Medical Journals Editors (<http://www.icmje.org>);

e) a apresentação das referências listadas deverá ser em espaço simples, sem parágrafos, sem recuos e ordenadas alfabeticamente;

f) Para abreviaturas de títulos de periódicos, consultar:

- em português: <http://www.ibict.br>
- em inglês: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>