

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

ELEN GOMES PEREIRA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO
ETILMALÔNICO SOBRE A ATIVIDADE DA
ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBRO DE RATOS**

**CRICIÚMA
2015**

ELEN GOMES PEREIRA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO
ETILMALÔNICO SOBRE A ATIVIDADE DA
ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBRO DE RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção
do título de Doutor em Ciências da
Saúde.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Patrícia
Fernanda Schuck

**CRICIÚMA
2015**

P436i Pereira, Elen Gomes.

Investigação dos efeitos do ácido etilmalônico sobre a atividade da acetilcolinesterase em cérebro de ratos / Elen Gomes Pereira; orientador: Patrícia Fernanda Schuck. – Criciúma, SC, Ed. do Autor, 2015.

135 p : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,, Criciúma, 2015.

1. Acetilcolinesterase. 2. Erros Inatos do Metabolismo 3 – Ácido Etilmalônico. 4. Bioinformática Estrutural. Título.

CDD. 22. ed. 616.042

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



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL, CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata Elen Gomes Pereira sob o título “Investigação dos efeitos do ácido etilmalônico sobre a atividade da acetilcolinesterase em cérebro de ratos”, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

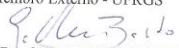
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese, com conceito A.

Criciúma, SC, 19 de junho de 2015.


Prof. Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Relator - UNESC


Prof. Dr. EDUARDO PACHECO RICO
Membro Interno - UNESC


Prof. Dr. GUILHERME LEIPNITZ
Membro Externo - UFRGS


Prof. Dr. GUILHERME BALDO
Membro Externo - UFRGS


Prof. Dra. Patrícia Fernanda Schuck
Orientadora


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurotoxicidade e Neuroproteção, Laboratório de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Dedico este trabalho a todos que estão presentes na minha vida. Em especial ao meu pai Jairo Alves Pereira e minha mãe Balbina Gomes Pereira, por serem os maiores incentivadores da minha constante vontade em aprender cada vez mais e ao Nano... meu companheiro... pela convivência diária, me completando e orientando... e me fazendo colocar os pés no chão...

AGRADECIMENTOS

É muito difícil conseguir expressar meus agradecimentos porque absolutamente TODOS que convivem comigo, e até os que mantenho a amizade à distância, possuem uma certa influência nesse trabalho. Tentarei iniciar de uma forma mais generalizada até chegar às pessoas mais específicas, mas... repito... TODOS à minha volta contribuíram de uma forma ou de outra nesse processo. Cheguei à conclusão de que somente através da interação com as pessoas que conseguimos aos poucos ter mais consciência de nós mesmos e conseqüentemente isso altera a nossa percepção das coisas que fazemos, podendo se expressar através de um trabalho acadêmico como esse. Inicialmente agradeço aos animais, em respeito, que foram mortos para obtenção dos resultados dos experimentos *in vivo* e *in vitro*. Para que eu conseguisse realizar esse ato tive que constantemente rever meus conceitos relacionados à importância dos experimentos para a ciência e principalmente para mim. Reflito e chego à conclusão que infelizmente é um mal necessário... visto que não há como substituir o computador em todos os experimentos. Então, agradeço aos ratos! Não posso deixar de mencionar e agradecer à população brasileira, que com seus impostos pagaram minha isenção das mensalidades (taxa escolar) e assim pude realizar meu doutorado em uma universidade particular... o qual na minha mente era algo inimaginável de se concretizar... e também à CAPES... meus agradecimentos ! Agradeço também à Prof^a Alexandra Latini da UFSC que me orientou a procurar a Patrícia na UNESC... e assim, numa conversa em outubro de 2012, percebi que mesmo numa universidade particular, eu poderia continuar meu doutorado que havia interrompido em 2012... E por falar nela... pati!! que me acolheu e incentivou desde minhas primeiras pisadas em solo da UNESC... sem sua ajuda e compreensão eu não teria conseguido... obrigada ! Ao grande grupo do laboratório que agora se chama Laboratório de Neurotoxicidade e Neuroproteção (Neurotox), aos que já saíram... Maíris, Tamires, Thayara, Naithan, Thaís, Kalende, Samira, Gabriela, Kizzy... aos que vão sair... Giselli, Prof. Dr^o Emílio... e aos que se mantiveram firmes e fortes... Hugo, Bruna, Ândrea, Fernanda, Geisa, Maria Luiza, Ernesto, Adália, Meline, Milena, Nádia... obrigada! À minha origem... meus pais... os quais me apóiam em todas as decisões importantes e me dão inspiração para continuar a estudar... mais que obrigada, gratidão ! Ao Nano, pela convivência e compreensão... me ajudando em todos os momentos que eu precisei... mais que gratidão... meu amor!

“Devemos acreditar que temos vocação para alguma coisa, e que essa coisa deve a qualquer custo, ser alcançada.”

Marie Curie

RESUMO

O ácido etilmalônico (EMA) acumula-se em tecidos e líquidos biológicos de pacientes acometidos pela deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCADD) e pela encefalopatia etilmalônica (EE), erros inatos do metabolismo (EIM) caracterizados por alterações neurológicas heterogêneas, incluindo atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual e sintomas neuromusculares. No entanto, a fisiopatologia da disfunção cerebral encontrada nesses pacientes ainda não é completamente conhecida. O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos *in vivo*, *in vitro* e *in silico* do EMA sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), enzima importante para finalização das sinapses colinérgicas, em córtex cerebral de ratos. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar machos com 30 dias de vida. Para os experimentos *in vivo*, os animais foram divididos em dois grupos: grupo EMA, que recebeu 3 administrações subcutâneas do EMA (6 $\mu\text{mol/g}$; 90 minutos de intervalo), e controle, que recebeu 3 administrações de solução salina nas mesmas condições. Uma hora após a última administração, os animais sofreram eutanásia por decapitação e os córtices cerebrais foram limpos e isolados para determinação da atividade e expressão da AChE. Para os experimentos *in vitro*, córtices cerebrais de animais sem prévia manipulação foram homogeneizados e incubados na presença de diferentes concentrações de EMA (0,5, 1 e 2,5 mM) por 1 h. Imediatamente após, os homogeneizados foram utilizados para a determinação da atividade da AChE. Inicialmente, foi observado um aumento da atividade da enzima AChE no grupo que recebeu administrações de EMA em comparação ao grupo controle. O mesmo efeito foi observado *in vitro* após uma hora de incubação na presença de EMA. Na tentativa de elucidar o mecanismo pelo qual o EMA ativa a AChE, foi avaliada a expressão desta enzima através da medida dos níveis de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm). Entretanto não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos, indicando que este ácido orgânico não altera a expressão desta enzima. Foram então investigados parâmetros *in silico* para avaliar a interação do EMA com a AChE de *Rattus norvegicus* (rAChE), bem como a afinidade do seu substrato (acetilcolina; ACh) com a rAChE previamente ligada ao EMA (halo-AChE) e na ausência de EMA (apo-AChE) por docagem molecular. Adicionalmente, o detalhamento atômico intermolecular da docagem do EMA em rAChE evidenciou a formação de ligações de hidrogênio entre o EMA e os resíduos fenilalanina 295 e arginina 296 de rAChE a 2,4 Å e 2,6 Å de distância, respectivamente. Vale ressaltar que

o resíduo fenilalanina 295 faz parte do sítio de ligação acil, que reconhece a entrada de moléculas na região catalítica. Também observou-se que a ACh se liga próximo à tríade catalítica da halo-AChE, e o valor de energia dessa ligação é mais negativo (- 5,2 kcal/mol) quando comparado ao valor de energia de ligação da ACh à apo-AChE (- 5,0 kcal/mol). Tomados em conjunto, os resultados do presente trabalho sugerem uma ativação da AChE causada pelo EMA, e tal efeito possivelmente se deve a um efeito alostérico. Tais alterações podem colaborar para o dano cerebral e o dano cognitivo encontrados nos pacientes acometidos por SCADD e EE.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase; ácido etilmalônico; deficiência de SCAD; docagem molecular; encefalopatia etilmalônica.

ABSTRACT

Ethylmalonic acid (EMA) accumulates in tissues and biological fluids of patients suffering from short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (SCADD) and ethylmalonic encephalopathy (EE), diseases characterized by neurological alterations, including developmental delay, intellectual disability, and neuromuscular symptoms. However, the pathophysiology of brain dysfunction in these patients is still uncertain. In this context, the aim of the present study was to investigate *in vivo*, *in vitro*, and *in silico* effects of EMA on acetylcholinesterase (AChE) activity, important enzyme for termination of cholinergic synapses, in cerebral cortex of 30-day-old male Wistar rats. For *in vivo* experiments, the animals were divided into two groups: EMA group, which received three subcutaneous EMA administrations (5 $\mu\text{mol/g}$; 90 minutes of interval), and control group, which received three saline solution administrations in the same conditions. One hour after the last administration, the animals were euthanized by decapitation and the cerebral cortex of each animal were cleaned and isolated for analysis of AChE activity and its expression. For *in vitro* experiments, cerebral cortex homogenates from animals without previous manipulation were incubated in the absence or presence of different concentrations of EMA (0.5, 1 and 2.5 mM) for 1 h. Immediately after, these homogenates were used for the determination of AChE activity. First, it was observed that EMA administration increased AChE activity when compared to control group. The same effect was observed in *in vitro* experiment after one hour of incubation. In an attempt to elucidate the mechanisms by which EMA activated AChE, it was evaluated the expression of this enzyme by measuring messenger ribonucleic acid (mRNA) levels and it was not verified any difference between groups, indicating that EMA did not affect AChE expression. In order to evaluate the interaction between EMA and AChE from *Rattus norvegicus* (rAChE), as well as the affinity between acetylcholine (ACh) and rAChE previously bonded to EMA (halo-AChE) and in the absence of EMA, it was carried out *in silico* experiments by molecular docking. It is noteworthy that phenylalanine 295 is part of acyl binding, that recognizes the entrance of molecules within the gorge. Additionally, the atomic intermolecular detail from EMA docking within rAChE showed hydrogen bonds between EMA and phenylalanine 295 and arginine 296 residues from rAChE, with 2.4 Å and 2.6 Å of distances, respectively. It was also observed that ACh bonded near the catalytic triad of rAChE in halo-AChE and that the energy value of this affinity is more negative (- 5.2 kcal/mol) when

compared to the affinity from ACh within apo-AChE (- 5.0 kcal/mol). Taken together, the present results suggest an activation of AChE caused by EMA and that this effect is possible due to an allosteric effect. These alterations might collaborate to the brain damage and intellectual disability found in patients affected by SCADD and EE.

Keywords: Acetylcholinesterase; ethylmalonic acid; ethylmalonic encephalopathy; molecular docking; SCAD deficiency.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de uma volta da espiral de β -oxidação de ácidos graxos (AG).....	40
Figura 2 - Sintomas clínicos em 114 pacientes portadores de deficiência de desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCADD).....	42
Figura 3 - Formação de metabólitos acumulados na deficiência de desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCADD).....	43
Figura 4 - Níveis de ácido etilmalônico (EMA) em 14 pacientes acometidos por deficiência de desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCADD).....	44
Figura 5 - Rotas metabólicas envolvidas na patologia da encefalopatia etilmalônica (EE).....	46
Figura 6 - Sinapse colinérgica.....	50
Figura 7 - Reação da acetilcolinesterase (AChE).....	51
Figura 8 - Diferentes estruturas quaternárias da acetilcolinesterase (AChE).....	52
Figura 9 - Estrutura do gene da acetilcolinesterase (<i>ache</i>) e processamento alternativo do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) em mamíferos.....	53
Figura 10 - Principais resíduos envolvidos no subsítio aniônico da acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE).....	57
Figura 11 - Principais resíduos envolvidos na cavidade oxianion da acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE).....	57
Figura 12 - Principais resíduos envolvidos na atividade da acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE).....	58
Figura 13 - Protocolo de administração subcutânea aguda de ácido etilmalônico (EMA) em ratos com 30 dias de vida.....	62

Figura 14 - Região de anelamento dos <i>primers</i> no gene da acetilcolinesterase (<i>ache</i>) de <i>Rattus norvegicus</i>	64
Figura 15 - Esquema geral das etapas de construção de um modelo proteico utilizando modelagem por homologia.....	67
Figura 16 - Processo de indução e seleção de conformações por ligante e receptor.....	70
Figura 17 - Parâmetros para a docagem da acetilcolina (ACh) na acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE).....	71
Figura 18 - Parâmetros para docagem do ácido etilmalônico (EMA) na acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE) previamente ligada à acetilcolina (ACh).....	72
Figura 19 - Efeito <i>in vivo</i> da administração aguda de ácido etilmalônico (EMA) sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em córtex cerebral de ratos com 30 dias de idade.....	74
Figura 20 - Expressão relativa de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) do gene da acetilcolinesterase (<i>ache</i>) após administração aguda de ácido etilmalônico (EMA) em córtex cerebral de ratos com 30 dias de idade.....	75
Figura 21 - Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico (EMA) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida.....	76
Figura 22 - Alinhamento da sequência primária de acetilcolinesterase de <i>Mus musculus</i> (mAChE), <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE) e <i>Homo sapiens</i> (hAChE).....	79
Figura 23 - Sequência do aminoácido 1 ao 360 da acetilcolinesterase de <i>Mus musculus</i> (mAChE) utilizada como molde 1.....	81
Figura 24 - Sequência do aminoácido 361 ao 542 da acetilcolinesterase de <i>Mus musculus</i> (mAChE) utilizada como molde 1.....	82
Figura 25 - Sequência do aminoácido 1 ao 360 da acetilcolinesterase de <i>Mus musculus</i> (mAChE) utilizada como molde 2.....	83

Figura 26 - Sequência do aminoácido 361 ao 542 da acetilcolinesterase de <i>Mus musculus</i> (mAChE) utilizada como molde 2.....	84
Figura 27 - Modelo por homologia da acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE).....	85
Figura 28 - Sítios de fosforilação preditos para acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE).....	86
Figura 29 - Gráfico de Ramachandran da estrutura de acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE) baseado nos ângulos torcionais ϕ e Ψ	87
Figura 30 - Localização dos dois <i>outliers</i> na estrutura de acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE).....	88
Figura 31 - Principais regiões da estrutura da acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE) envolvidos na ligação da acetilcolina (ACh) previamente ligado ao ácido etilmalônico (EMA).....	89
Figura 32 - Representação da ligação da acetilcolina (ACh) e do ácido etilmalônico (EMA) na estrutura da acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE).....	90
Figura 33 - Orientação do grupo acetil da acetilcolina (ACh) com a região esterásica da estrutura da acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE) previamente ligada ao ácido etilmalônico (EMA).....	91
Figura 34 - Orientação do grupo caudal da acetilcolina (ACh) com o subsítio aniônico da acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE) previamente ligada ao ácido etilmalônico (EMA).....	92
Figura 35 - Modo de interação da acetilcolina ACh e do ácido etilmalônico EMA na estrutura da acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE).....	93

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Sequência dos *primers* para a avaliação de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm).....64
- Tabela 2** - Sequências primárias de acetilcolinesterase de *Mus musculus* (mAChE), *Rattus norvegicus* (rAChE) e *Homo sapiens* (hAChE).....77
- Tabela 3** - Posições e *scores* dos 26 aminoácidos da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE) que podem ser fosforilados.....86
- Tabela 4** - Média das distâncias de ligação da acetilcolina (ACh) na região esterásica da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE) na presença de ácido etilmalônico (EMA)..... 92
- Tabela 5** - Média das distâncias de ligação da acetilcolina (ACh) no subsítio aniônico da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE) na presença de ácido etilmalônico (EMA).....93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA – Acetil-coenzima A
ACh – Acetilcolina (do inglês *acetylcholine*)
AChE – Acetilcolinesterase (do inglês *acetylcholinesterase*)
AcSch – Iodeto de acetilcolina
ADT – AutodockTools
AG – Ácido graxo
Ala – Alanina
AMS – Ácido metilsuccínico
ANOVA – Análise de variância
apo-AChE – Acetilcolinesterase na ausência de ácido etilmalônico
Arg – Arginina
Asn – Asparagina
Asp – Ácido aspártico
ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)
BuChE – Butirilcolinesterase (do inglês *butyrylcholinesterase*)
C4-CoA – Butiril-coenzima A
CAS – Sítio aniônico catalítico (do inglês *catalytic anionic site*)
ChAT – Colina acetiltransferase
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*)
ChE – Colinesterase (do inglês *cholinesterase*)
CK – Creatina cinase (do inglês *creatine kinase*)
C4-CoA – Butiril-CoA
CoA – Coenzima A
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DA – Doença de Alzheimer
DM – Dinâmica molecular
DTNB – Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (do inglês *5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*)
EE – Encefalopatia etilmalônica
EMA – Ácido etilmalônico (do inglês *ethylmalonic acid*)
ERO – Espécies reativas de oxigênio
ETF – Flavoproteína transferidora de elétrons (do inglês *electron-transfer flavoprotein*)
ETHE1 – Persulfeto dioxigenase (do inglês *persulfide dioxygenase*)
FADH₂ – Dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido
Gln – Glutamina
Glu – Ácido glutâmico

Gly – Glicina
halo-AChE – acetilcolinesterase na presença de ácido etilmalônico
His – Histidina
Ile – Isoleucina
Leu – Leucina
Lys – Lisina
GPx – Glutationa peroxidase (do inglês *glutathione peroxidase*)
GSH – Glutationa reduzida
GSSH – Persulfeto de glutationa (do inglês *glutathione persulfide*)
hAChE – Acetilcolinesterase de *Homo sapiens*
LCAD – Desidrogenase de acilcoenzima A de cadeia longa (do inglês *long-chain acyl-CoA dehydrogenase*)
LCR – Líquido cefalorraquidiano
mAChE – Acetilcolinesterase de *Mus musculus*
MBL – Metalo-beta-lactamases
MCAD – Desidrogenase de acilcoenzima A de cadeia média (do inglês *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*)
Met – Metionina
MLSD – Docagem de ligantes múltiplos simultâneos (do inglês, *multiple ligand simultaneous docking*)
MS/MS – Espectrometria de massas em sequência (do inglês *mass spectrometry in tandem*)
NAC – N-acetilcisteína
NADH – Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido
NAK – Na⁺,K⁺-ATPase
OMIM – Herança mendeliana em homens online (do inglês *Online Mendelian Inheritance in Man*)
PAS – Sítio aniônico periférico (do inglês *peripheral anionic site*)
Phe – Fenilalanina
PKA – Proteína cinase dependente de monofosfato de adenosina cíclico (do inglês *cyclic adenosine monophosphate dependent protein kinase*)
PRiMA – Proteína transmembranar de ancoragem rica em prolina
Pro – Prolina
rAChE – Acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus*
RMI – Ressonância magnética por imagem (do inglês *magnetic resonance imaging*)
RMN – Ressonância magnética nuclear (do inglês *nuclear magnetic resonance*)
RMSD – Média quadrática do desvio padrão
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês *messenger ribonucleic acid*)

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase e transcriptase reversa (do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*)
SBCAD – Desidrogenase de acil-coenzima A de cadeia curta ramificada (do inglês *short-branched-chain acyl-coA dehydrogenase*)
SCAD – Desidrogenase de acil-coenzima A de cadeia curta (do inglês *short-chain acyl-CoA dehydrogenase*)
SCADD – Deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (do inglês *short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*)
Ser – Serina
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico
SOD2 – Superóxido dismutase 2 (do inglês *superoxide dismutase 2*)
SPSS – Pacote Estatístico para as Ciências Sociais (do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*)
SUS – Sistema Único de Saúde
tAChE – Acetilcolinesterase de *Torpedo californica*
TCA – Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (do inglês *tricarboxylic acids cycle*)
Thr – Treonina
Trp – Triptofano
Tyr – Tirosina
Val – Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	39
1.1 DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DE ACIL-COA DE CADEIA CURTA	39
1.1.1 β -Oxidação dos Ácidos Graxos.....	39
1.1.2 Histórico	40
1.1.3 Etiologia	41
1.1.4 Sinais e sintomas.....	41
1.1.5 Dados epidemiológicos	42
1.1.6 Achados laboratoriais	42
1.2 ENCEFALOPATIA ETILMALÔNICA	44
1.2.1 Histórico	44
1.2.2 Etiologia	44
1.2.3 Sinais e sintomas.....	46
1.2.4 Dados epidemiológicos	47
1.2.5 Achados laboratoriais	47
1.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO NA SCADD E EE	47
1.3 O PAPEL DO EMA NA FISIOPATOLOGIA DA SCADD E DA EE.....	48
1.4 SISTEMA COLINÉRGICO.....	49
1.4.1 Relação entre acetilcolinesterase e os erros inatos do metabolismo	54
1.5 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS (<i>IN SILICO</i>).....	54
1.5.1 Modelagem Molecular	55
1.5.2 Aspectos estruturais da acetilcolinesterase	56
1.6 JUSTIFICATIVA	59
2 OBJETIVOS	60
2.1 OBJETIVO GERAL	60
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
3 MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1 REAGENTES	61
3.2 ANIMAIS.....	61
3.2.1 Experimentos <i>in vivo</i>	61
3.2.2 Experimentos <i>in vitro</i>	62
3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	63
3.3.1 Atividade da AChE	63
3.3.2 Expressão de RNAm da AChE.....	63
3.3.3 Quantificação de Proteínas.....	65
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65

3.5 EFEITO <i>IN SILICO</i> DO EMA SOBRE A ACHE DE <i>RATTUS NORVEGICUS</i>	65
3.5.1 Modelo por homologia de acetilcolinesterase de <i>Rattus norvegicus</i> (rAChE).....	65
3.5.2 Predição de sítios para fosforilação da rAChE por PKA	69
3.5.3 Docagem Molecular.....	70
4 RESULTADOS.....	74
5 DISCUSSÃO	94
6 CONCLUSÕES	106
7 PERSPECTIVAS	107
REFERÊNCIAS	109
ANEXOS	133
ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	135

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DE ACIL-COA DE CADEIA CURTA

1.1.1 β -Oxidação dos Ácidos Graxos

O ácido graxo (AG) é o principal substrato energético durante o jejum, fornecendo energia pela sua oxidação em um processo chamado de β -oxidação de AG, que resulta na produção de acetil-coenzima A (acetil-CoA), dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido (NADH) e dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido (FADH₂) (Nelson e Cox, 2014). São armazenados na forma de triacilgliceróis especialmente no tecido adiposo, mas também no tecido muscular (Smith et al., 2005). Os AG fornecem aproximadamente 80% da energia para órgãos como coração, fígado e músculo esquelético quando os níveis de glicogênio estão diminuídos (Bennet et al., 2000).

Previamente à entrada do AG na espiral de β -oxidação, há a captação celular de AG e ativação a ésteres de acil-CoA, transesterificação a acilcarnitinas, translocação através da membrana mitocondrial e re-esterificação a acil-CoA, o qual é então oxidado (Nelson e Cox, 2014). Na Figura 1 está esquematizada a via da espiral de β -oxidação. Inicialmente, há oxidação do AG em seu carbono 2 (carbono β) a trans- Δ^2 -enoil-CoA pelas enzimas desidrogenase de acil-CoA, que são específicas para cada comprimento de carbono (cadeia longa, média ou curta). Nesta primeira reação, ocorre a formação de uma molécula de FADH₂. O próximo passo consiste em uma hidratação de uma insaturação presente na molécula de enoil-CoA pela enzima enoil-CoA hidratase, formando 3-hidroxiacil-CoA. A seguir, ocorre uma nova oxidação, esta da hidroxila presente na molécula de 3-hidroxiacil-CoA a carbonila pela enzima 3-L-hidroxiacil-CoA desidrogenase, resultando em β -cetoacil-CoA e liberando uma molécula de NADH. Na última reação da espiral, há a reação do β -cetoacil-CoA com uma nova molécula de coenzima A (CoA) e posterior clivagem desta molécula a acetil-CoA e acil-CoA (AG inicial com 2 carbonos a menos), reação catalisada pela enzima tiolase. Esta via metabólica ocorre na matriz mitocondrial (Nelson e Cox, 2014; Smith et al., 2005).

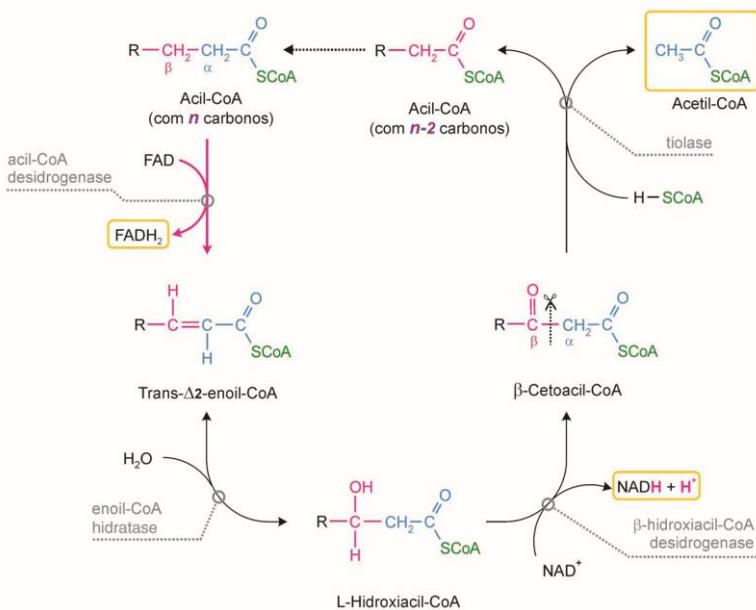


Figura 1: Esquema de uma volta da espiral de β -oxidação de ácidos graxos (AG). Cada volta da espiral é composta por quatro reações: oxidação, hidratação, nova oxidação e clivagem. Os produtos finais da via são acil-CoA, acetil-CoA, NADH e FADH₂. FADH₂: dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido; n: número indefinido; NADH: dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido; SCoA: coenzima A (Marzzoco e Torres, 2007).

Nesta via metabólica, há uma desidrogenase de acil-CoA específica para cada tamanho de carbono: desidrogenase de acil-CoA de cadeia longa (LCAD; EC 1.3.8.8), desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (MCAD; 1.3.8.7) e desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCAD; EC 1.3.8.1) (Marzzoco e Torres, 2007).

1.1.2 Histórico

Em 1984, Turnbull e colaboradores descreveram o caso de uma paciente de 53 anos de idade com progressiva miopatia, cujos sintomas começaram por volta dos 40 anos de idade, em que a atividade da SCAD estava diminuída em músculo esquelético, mas normal em seus fibroblastos. Em outro paciente, Bennett e colaboradores (1985) verificaram excreção urinária de EMA (ácido etilmalônico), bem como defeitos na oxidação de butirato e hexanoato em cultura de fibroblastos,

mas oxidação normal de AG de cadeia média e longa, indicando uma anormalidade específica para AG de cadeia curta.

Entretanto apenas em 1987 Amendt e colaboradores descreveram pela primeira vez dois pacientes neonatos que não oxidavam totalmente o [1-¹⁴C]butirato em fibroblastos. Pela primeira vez o diagnóstico de deficiência de SCAD (SCADD) foi confirmado por dois métodos: medida da atividade da flavoproteína de transferência de elétrons (ETF) e ensaio de liberação de trício utilizando-se [2,3-³H]acil-CoA como substrato. Estes foram considerados os primeiros casos verdadeiramente confirmados de SCADD (Amendt et al., 1987).

1.1.3 Etiologia

A SCADD (OMIM 201470) é um defeito de oxidação de AG potencialmente letal de herança autossômica recessiva. É caracterizada pela deficiência da oxidação de AG de cadeia curta (cadeias de 4 a 6 carbonos) (Roe e Ding, 2001). Embora de origem genética, especula-se que tenha causa multifatorial, pois o mecanismo que caracteriza essa doença é consideravelmente complexo (Gregersen et al., 2008).

1.1.4 Sinais e sintomas

O espectro de sinais e sintomas clínicos da SCADD é heterogêneo e estes podem se manifestar no primeiro dia de vida (25%), no primeiro ano de vida (61%) ou em mais de 10 anos após o diagnóstico (4%) (Pedersen et al., 2008). Entretanto os sintomas nos pacientes podem frequentemente se amenizar e até desaparecer espontaneamente durante o crescimento, permanecendo assintomáticos (Van Maldegem et al., 2010). Os pacientes acometidos pela SCADD apresentam alterações neurológicas de grau moderado a grave, incluindo atraso cognitivo, alterações comportamentais, hipertonia e epilepsia, podendo levar ao coma e à morte (Kraus et al., 2008; Walsh et al., 2010). Também podem apresentar sintomatologia muscular, como fraqueza (Amendt et al., 1987; Coates et al., 1988; Sewell et al., 1993; Bhala et al., 1995; Van Maldegem et al., 2010). Além disso, má formação cerebral também pode ocorrer nestes pacientes (Nissenkorn et al., 2001). A Figura 2 resume dados clínicos obtidos por Pedersen e colaboradores através de um estudo de coorte de 114 pacientes acometidos por SCADD da Europa, Nova Zelândia e Canadá. Esse estudo mostrou que os sintomas clínicos são predominantemente neurológicos (Pedersen et al., 2008), corroborando estudos anteriores

(Corydon et al., 2001; Van Maldegem et al., 2006).

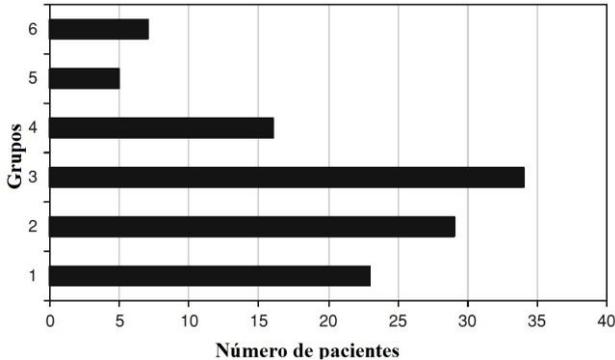


Figura 2: Sintomas clínicos em 114 pacientes portadores de deficiência de desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCADD). Grupo 1: perda de força com hipotonia; Grupo 2: atraso no desenvolvimento e convulsões; Grupo 3: atraso no desenvolvimento e hipotonia sem convulsões; Grupo 4: perda de força, atraso no desenvolvimento e hipotonia; Grupo 5: sem características definidas; Grupo 6: outros sintomas incluindo miopatia, cardiomiopatia, esteatose hepática, dificuldades respiratórias, atraso no crescimento intrauterino e indivíduos assintomáticos (Adaptado de Pedersen et al., 2008).

1.1.5 Dados epidemiológicos

Os dados apontam para uma prevalência de 1 para cada 50.000 nascidos vivos (Van Maldegem et al., 2006). Resultados de triagens neonatais na Inglaterra sugerem a prevalência de 1:33.000 quando se aplica um ponto de corte de $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a concentração de butirilcarnitina (Zytkovicz, et al., 2001). Em outro estudo utilizando-se MS/MS realizado em Pittsburgh, estima-se a prevalência de aproximadamente 1:340.000 (Chace et al., 2002). No Brasil, não há dados epidemiológicos sobre a SCADD, visto que esta doença não faz parte da triagem neonatal básica oferecida pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A investigação desta doença apenas se dá por suspeita clínica, sendo sua prevalência provavelmente subestimada.

1.1.6 Achados laboratoriais

Quando a atividade da enzima SCAD está deficiente, seu substrato butiril-CoA (C4-CoA) se acumula e é subsequentemente convertido a diferentes metabólitos, principalmente a EMA devido à

carboxilação de butiril-CoA a etilmalonil-CoA pela enzima propionil-CoA carboxilase (EC 6.4.1.2), facilitando a hidrólise de etilmalonil-CoA para EMA livre (Corydon et al., 1996) (Figura 3). Outros metabólitos acumulados nos tecidos e líquidos biológicos de pacientes acometidos pela SCADD incluem butirilcarnitina, ácido butírico e ácido metilsuccínico (AMS) (Roe e Ding, 2001).

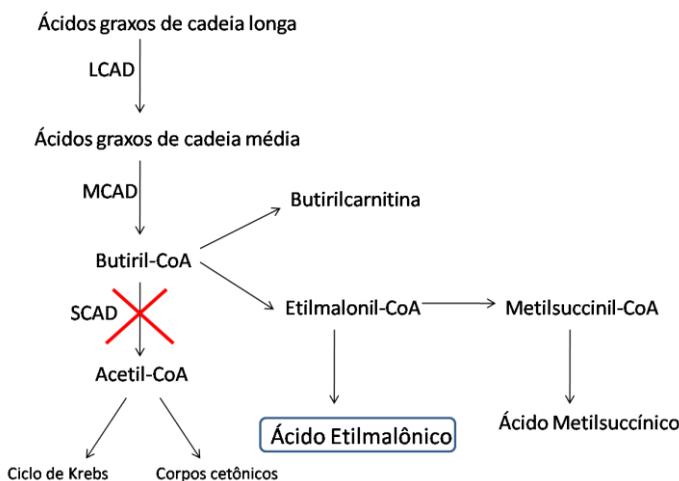


Figura 3: Formação de metabólitos acumulados na deficiência de desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCADD). O acúmulo de butiril-CoA que é transformado a butirilcarnitina e ácido etilmalônico. LCAD: desidrogenase de acil-CoA de cadeia longa; MCAD: desidrogenase de acil-CoA de cadeia média; SCAD: desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (Adaptado de Turpin e Tobias, 2005).

Na SCADD, os níveis de butirilcarnitina variam conforme as horas de jejum e os diferentes genótipos, podendo atingir 2,25 μM (Van Maldegem et al., 2010). Por outro lado, os níveis de excreção urinária de EMA podem atingir 260 $\mu\text{mol mmol}^{-1}$ de creatinina, podendo também variar de acordo com o genótipo (Van Maldegem et al., 2010) (Figura 4). A análise das acilglicinas demonstra um aumento na concentração de butirilglicina e um leve aumento nos níveis de isovalerilglicina (Tein et al., 1999). Pacientes acometidos por SCADD também apresentam níveis elevados de ácido láctico e hipocetose (Roe e Ding, 2001).

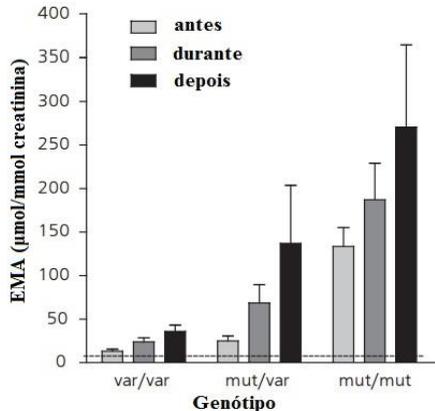


Figura 4: Níveis de ácido etilmalônico (EMA) em 14 pacientes acometidos por deficiência de desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCADD). Os pacientes foram divididos de acordo com os diferentes genótipos antes, durante e após o jejum. mut/mut: mutação em dois alelos; mut/var: mutação em um alelo e variação em outro alelo diferente; var/var: mesma variante nos mesmos alelos; Os níveis normais de EMA estão representados por uma linha tracejada ($8 \mu\text{mol mmol}^{-1}$) (Adaptado de Van Maldegem et al., 2010).

1.2 ENCEFALOPATIA ETILMALÔNICA

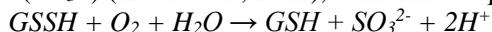
1.2.1 Histórico

A encefalopatia etilmalônica (EE; OMIM 602473) foi descrita pela primeira vez em 1994 por Burlina e colaboradores. Quatro crianças italianas, todos meninos, apresentavam acrocianose ortostática, petéquias recorrentes, diarreia crônica, sinais piramidais progressivos, atraso no desenvolvimento e anormalidades cerebrais observadas por ressonância magnética por imagem (RMI). Após uma década da descrição fenotípica inicial, a causa genética da deficiência foi caracterizada (Tiranti et al., 2004).

1.2.2 Etiologia

A EE é um erro inato do metabolismo dos sulfetos causado pela deficiência da enzima mitocondrial persulfeto dioxigenase (ETHE1; EC 1.13.11.18) (Burlina et al., 1994; Tiranti et al., 2006). Tal defeito é transmitido por herança autossômica recessiva e ocasiona um bloqueio da oxidação de sulfetos pela sulfeto oxidase durante o metabolismo de

aminoácidos que contenham enxofre em suas estruturas, especialmente a metionina (Hildebrandt e Grieshaber, 2008; Tiranti et al., 2009; Kabil e Banerjee, 2010). A ETHE1 é uma proteína não dependente de grupo heme, da família das metalo-beta-lactamases (MBL), que contém ferro em sua estrutura. Está envolvida na catálise da oxidação dependente de oxigênio de persulfeto de glutationa (GSSH) a glutationa reduzida (GSH) e sulfito (SO_3^{2-}) (Kabil et al., 2012), conforme a equação:



Algumas mutações levam a níveis quase normais de proteína ETHE1 e nesses casos a hipótese para o mecanismo da doença seria devido ao comprometimento da atividade catalítica (Henriques et al., 2014). Pettinati e colaboradores (2015) propõem que os resíduos de arginina 163 (Arg163), treonina 164 (Thr164) e aspartato 165 (Asp165) estão relacionados ao canal de ligação ao substrato.

Especula-se que uma das explicações para o acúmulo de EMA na EE seja devido à deficiência da enzima SCAD, induzida pelo acúmulo do H_2S , além de outros fatores como mostrado na Figura 5. O perfil metabólico, no geral, sugere que múltiplas rotas são afetadas por EE. O concomitante aumento de alloseleucina no plasma, assim como de EMA e AMS na urina, sugere que o catabolismo da isoleucina está envolvido nessa rota. A combinação da deficiência de SBCAD e SCAD provoca o aumento da produção de EMA a partir da isoleucina. Devido ao fato da butiril-CoA ser menos eficientemente metabolizada pela SCAD, assim como na deficiência de SCAD, na EE também ocorre aumento da produção de EMA pela propionil-CoA carboxilase, e seus elevados níveis levam à formação de AMS pela metilmalonil-CoA mutase.

1.2.4 Dados epidemiológicos

A EE é uma doença rara e sua epidemiologia ainda é desconhecida, pois seu diagnóstico é solicitado apenas por suspeita clínica e é comumente confundida com a SCADD, o que torna difícil estabelecer sua prevalência. Sabe-se, contudo que é mais comum em descendentes árabes (Ozand et al., 1994) e de regiões do Mediterrâneo (Garcia-Silva et al., 1997; Grosso et al., 2002).

1.2.5 Achados laboratoriais

Pacientes acometidos pela EE apresentam altos níveis de EMA, bem como de butirilglicina e AMS, de forma semelhante à SCADD (Burlina et al., 1994; Zafeiriou et al., 2007; Drousiotou et al., 2011). Por isso, é comum incluir a SCADD como alternativa de diagnóstico até que o teste diferencial para EE seja realizado (Merinero et al., 2006; Gregersen et al., 2008). Os níveis urinários de EMA na EE podem variar de 45 a 730 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina (Burlina et al., 1994; Zafeiriou et al., 2007; Drousiotou et al., 2011). Pacientes acometidos por EE também apresentam níveis elevados de sulfetos e sulfitos, bem como de ácido láctico e isovalerilglicina nos líquidos biológicos (Tiranti e Zeviani, 2013).

1.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO NA SCADD E EE

O diagnóstico precoce de SCADD e EE é um importante fator para que seja evitado o jejum prolongado e para que se inicie o rápido tratamento de infecções, fatores que levam à descompensação metabólica e, conseqüentemente, o aumento dos níveis de metabólitos tóxicos (Tein et al., 2008). Ele é feito pela determinação dos níveis plasmáticos de butirilcarnitina e dos níveis urinários de EMA, ambos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) principalmente por suspeita clínica (Roe e Ding, 2001; Uluç et al., 2015). Adicionalmente, devem-se realizar ensaios enzimáticos e análise mutacional para identificação do genótipo do paciente (Grosso et al., 2004; Tiranti et al., 2004). Evidências clínicas e neuroradiológicas devem ser levadas em consideração para o diagnóstico de EE, mesmo na ausência de anormalidades bioquímicas (Rocco et al., 2006).

Não há um tratamento específico para essas doenças, mas de uma forma geral, após o diagnóstico aconselha-se a evitar jejum, manter uma dieta saudável com restrição de lipídeos e acompanhar os níveis de

metabólitos em análises bioquímicas frequentes (Van Maldegem et al., 2010). Especificamente na EE, uma restrição de metionina na dieta também se faz necessária (McGowan et al., 2004). Em ambas as doenças também se preconiza a suplementação de L-carnitina para acelerar a eliminação dos AG na forma de conjugados de carnitina, embora poucos estudos suportem essa estratégia terapêutica (Jethva et al., 2008). Adicionalmente, faz-se suplementação com riboflavina, precursora do dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) devido à sua potencial habilidade de agir como uma chaperona química e estabilizar a enzima mutante (Dawson et al., 1995).

1.3 O PAPEL DO EMA NA FISIOPATOLOGIA DA SCADD E DA EE

O acúmulo de EMA nos tecidos e líquidos biológicos é comum tanto à SCADD quanto à EE, sendo, portanto, um marcador bioquímico inespecífico para ambas as doenças (Pedersen et al., 2008). Atualmente, acredita-se que o acúmulo de EMA leva a alterações bioquímicas importantes e parece ser um importante agente neurotóxico (Zolkipli et al., 2011), mesmo em pacientes com níveis aumentados de EMA e acometidos por disfunções cerebrais não específicas, como o espectro autista ou atraso mental (Zannolli et al., 2010).

Estudos demonstraram que altas concentrações de EMA estão relacionadas ao estresse oxidativo por induzirem aumento da produção de espécies reativas, dano oxidativo a lipídeos e proteínas e diminuição de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas em córtex cerebral de ratos tanto *in vitro* (Schuck et al., 2010) como *in vivo* (Schuck et al., 2015). Tais achados também foram encontrados em fibroblastos de pacientes acometidos por SCADD e atribuídos ao EMA (Zolkipli et al., 2011). Além disso, a análise do proteoma mitocondrial em cultura de fibroblasto de pacientes com deficiência neuromuscular e elevados níveis de EMA ($>50 \text{ mmol mol}^{-1}$ de creatinina) identificou uma redução na expressão da enzima superóxido dismutase 2 (SOD2), o que também colaboraria para o estresse oxidativo (Pedersen et al., 2010).

Outro importante mecanismo pelo qual o EMA poderia contribuir para o dano cerebral encontrado em pacientes afetados por SCADD e EE é a disfunção mitocondrial. Neste sentido, diversos estudos demonstraram o efeito do EMA sobre parâmetros de bioenergética. Este ácido orgânico inibe *in vitro* a atividade da enzima creatina cinase mitocondrial, uma enzima crucial para a homeostase energética celular (Wallimann et al., 2011), em córtex cerebral de ratos jovens (Schuck et

al., 2002; Leipnitz et al., 2003). Além disso, o EMA aumenta o consumo de oxigênio e reduz o transporte de succinato e malato (por inibição competitiva entre o succinato e o EMA pelo mesmo transportador) em mitocôndrias isoladas de cérebro total de ratos (Amaral et al., 2011). Recentemente, foi demonstrado que a administração intraestriatal de EMA reduziu significativamente a produção de dióxido de carbônico marcado com ^{14}C ($^{14}\text{CO}_2$) a partir de glicose também marcada com ^{14}C ($[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glicose), inibiu as atividades dos complexos II e II-III da cadeia respiratória, bem como a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase (NAK) em estriado de ratos (Ritter et al., 2014).

Por outro lado, Schuck e colaboradores (2013) demonstraram uma ativação da atividade da enzima ATPase, importante enzima para a manutenção do gradiente iônico e neurotransmissão, quando EMA foi administrado subcutaneamente a ratos jovens. Contrariamente, sua expressão foi diminuída por esse ácido orgânico no mesmo estudo. Tal efeito foi atribuído pelos autores a uma possível regulação por fosforilação da NAK causada pelo EMA.

Adicionalmente, a administração crônica de EMA do 5º ao 28º dia de vida induziu alterações comportamentais em ratos, causando alterações nos processos de aprendizado e memória. Possíveis mecanimos sugeridos pelos autores são disfunções bioenergéticas e/ou aumento de produção de espécies reativas (Schuck et al., 2009). Entretanto não se pode descartar o efeito do EMA sobre sistemas de neurotransmissão, como o sistema colinérgico, atuando sobre a cognição.

1.4 SISTEMA COLINÉRGICO

O sistema colinérgico possui um papel importante no desenvolvimento das estruturas cerebrais (Zirger et al., 2003) e alterações na neurotransmissão colinérgica durante o desenvolvimento produzem danos estruturais com efeitos sobre comportamento, incluindo aprendizado e memória (Bachman et al., 1994; Hohmann et al., 2003). A sinalização colinérgica mediada pela acetilcolina (ACh) é fundamental para o funcionamento do sistema nervoso central (SNC) (Gotti e Clementi, 2004), assim como da musculatura voluntária e involuntária controladas pelo sistema nervoso periférico (SNP) (Soreq e Seidman, 2001).

A ACh é um neurotransmissor presente no sistema colinérgico e amplamente distribuída em ambos sistemas nervosos, central e periférico. Suas principais ações estão envolvidas nas sinapses

associadas ao controle motor, memória e cognição (Hasselmo, 2006). Este neurotransmissor é sintetizado no neurônio pré-sináptico pela enzima colina acetiltransferase (ChAT; EC 2.3.1.6), armazenada em vesículas e liberada para a fenda sináptica para se ligar aos receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos presentes no neurônio pós-sináptico. Sua ação sobre esses receptores é terminada pela ação da enzima acetilcolina acetil-hidrolase, também conhecida por acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) (Brady et al., 2012) (Figura 6).

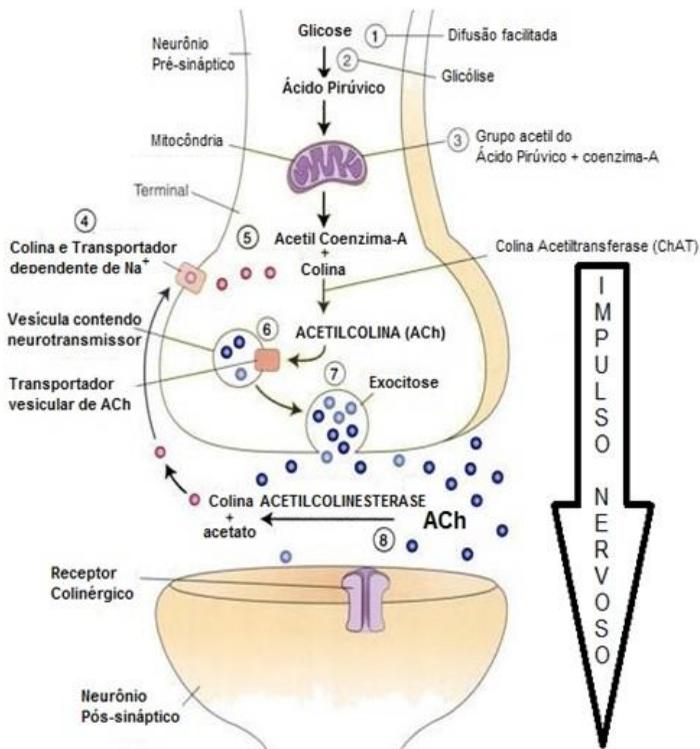


Figura 6: Sinapse colinérgica. A acetilcolina, neurotransmissor colinérgico, é sintetizada no neurônio pré-sináptico pela enzima colina acetiltransferase a partir de acetil-coenzima A proveniente da oxidação do piruvato e colina. A acetilcolina recém-sintetizada é armazenada em vesículas e liberada à fenda sináptica por excitose para ação sobre os receptores colinérgicos presentes na membrana plasmática do neurônio pós-sináptico. A ação deste neurotransmissor é terminada pela ação da enzima acetilcolinesterase, que hidrolisa a acetilcolina a acetato e colina, os quais voltam para o neurônio pré-sináptico. ACh: acetilcolina; ChAT: colina acetiltransferase (Adaptado de Siegel e Sapul, 2006).

A AChE é uma serina hidrolase responsável pela catálise da reação de formação de ácido acético e colina a partir da ACh (Figura 7) (Soreq e Seidman, 2001).

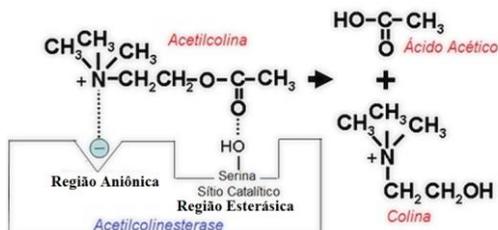


Figura 7: Reação da acetilcolinesterase (AChE). A AChE é composta basicamente por duas regiões, aniônica e esterásica, que interagem com a ACh. A carga positiva no nitrogênio da ACh é atraída pela região aniônica e o grupamento éster da ACh sofre hidrólise na região esterásica da AChE com auxílio da serina, presente no sítio catalítico. Após a reação, produz-se colina e ácido acético. AChE: acetilcolinesterase; ACh: acetilcolina (Elaborado pelo autor).

Devido à sua função regulatória nas sinapses colinérgicas, a AChE se torna extremamente importante para o equilíbrio do CNS, das funções cardíaca e respiratória. Dependendo da sua atividade, a AChE atua desencadeando ou prevenindo doenças (Hammond e Brimijoin, 1988; Rinne et al., 1991). Um dos maiores desafios na biologia da AChE é a elucidação das suas funções fisiológicas e o reconhecimento das alterações que acontecem nesta enzima em estados de doença (Rakonczay, 1988). Níveis de AChE podem variar gradualmente durante a proliferação, diferenciação, apoptose e na gênese de doenças neurodegenerativas, tais como a Doença de Alzheimer (DA) e Parkinson, assim como na mania, depressão e esquizofrenia (Rakonczay, 1988; Soreq e Seidman, 2001; Dori et al., 2005; Toiber e Soreq, 2005). Em se tratando de estrutura quaternária, existem as formas globulares (G1, G2 e G4), que estão presentes principalmente no SNC, e as formas assimétricas (A4, A8 e A12), que são encontradas principalmente no SNP e nos músculos (Rakonczay et al., 2005).

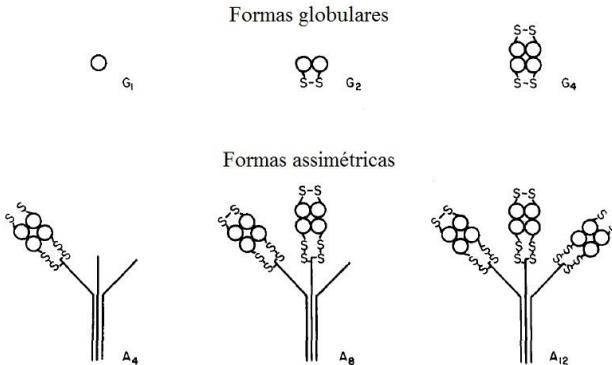


Figura 8: Diferentes estruturas quaternárias da acetilcolinesterase (AChE). Formas globulares estão representadas por 'G' (SNC) e formas assimétricas por 'A' (SNP) (Adaptado de Brimijoin, 1983).

Essas isoformas enzimáticas diferentes contêm o mesmo domínio catalítico, porém, sequências no C-terminal determinarão a maturação pós-traducional, as diferentes localizações no organismo e a estrutura quaternária (Brimijoin, 1983; Massoulié et al., 1993). Nos mamíferos, a AChE é codificada por um único gene: *ache*, porém, sua expressão apresenta polimorfismos por ocorrer um processo em que certos éxons são incluídos ou excluídos na extremidade C-terminal do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) desta proteína (Legay, 2000). Sendo assim existem três formas distintas da proteína AChE produzidas a partir do RNAm precursor: AChE-R (*read-through*), AChE-E (eritrocitária) e AChE-S (sináptica) (Massoulié et al., 1998). A AChE-R está presente em células embrionárias e tumorais e contém os éxons 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (E1, E2, E3, E4, E5 e E6) além de um íntron 4 (I4). A AChE-E contém os éxons E1, E2, E3, E4, E5 e E6 e está associada a membrana das células vermelhas. E a AChE-S contém os éxons E1, E2, E3, E4 e E6 e está presente no cérebro e músculo (Grisaru et al., 1999). O *core* da AChE é comum para todas três variantes e consiste de 543 aminoácidos codificados pelos E2, E3 e E4 do gene *ache*. O E1 é um éxon não codificante e o E2 está presente em todos os organismos, pois contém os aminoácidos responsáveis pela reação catalítica. Cada éxon influencia na expressão tecido-específica como podemos observar na Figura 9 (Grisaru et al., 1999; Jameson et al., 2007).

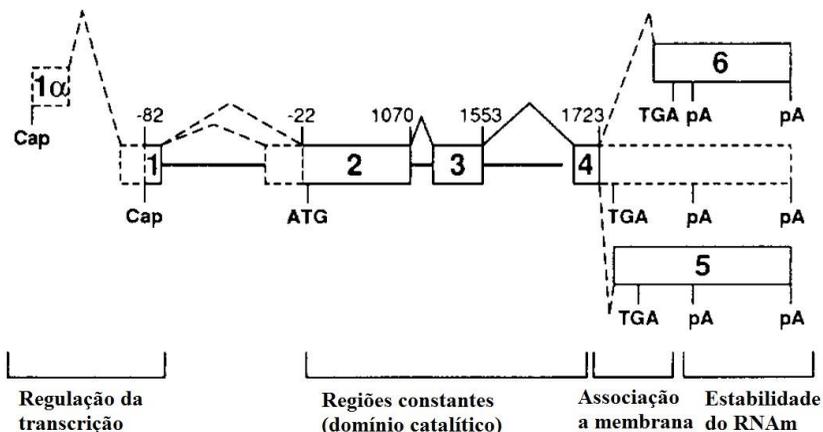


Figura 9: Estrutura do gene da acetilcolinesterase (*ache*) e processamento alternativo do ácido ribonucleio mensageiro (RNAm) em mamíferos. Os éxons variam de 1 à 6 (E1, E2, E3, E4, E5 e E6) e determinam funções diferentes. Cap: regulação da transcrição. E1: éxon não codificante; E2, E3 e E4: região constante do domínio catalítico; E5 e E6: associação a membrana e estabilidade do RNAm; Cap: região promotora; ATG: códon iniciador; TGA: códon finalizador (Adaptado de Taylor et al., 1993).

Portanto, no SNC e junções neuromuscular dos mamíferos ocorre expressão principalmente da variante sináptica AChE-S, também chamada de AChE-T (*tailed* AChE) (Ohno et al., 1998). Essa isoforma se apresenta solúvel ou insolúvel, dependendo da sua estrutura quaternária, onde o domínio catalítico está associado a um C-terminal composto por 40 resíduos chamado de peptídeo T (Massoulié, 2005). O peptídeo T não afeta a atividade catalítica da AChE-S, mas determina a função fisiológica pela formação de oligômeros, associação à proteína ancoradora ColQ (colágeno-Q) e interação com proteínas transmembranas como a PRiMA (proteína transmembranar de ancoragem rica em prolina) (Soreq e Seidman, 2001; Massoulié, 2002; Noureddine et al., 2008). A localização da AChE-S no cérebro é regulada por um processo dinâmico e geralmente a forma tetramérica, ligada à membranas, é ativada pelo sistema colinérgico (Hicks et al., 2011). Quando reduzido apenas ao seu domínio catalítico, a AChE-S sem o peptídeo T exerce atividade catalítica, porém permanece monomérica e solúvel (Massoulié e Bom, 2006).

A enzima butirilcolinesterase (BuChE; EC 3.1.1.8), também conhecida por colinesterase (ChE) não específica ou

pseudocolinesterase, está presente no soro, células hematopoiéticas, fígado, coração, endotélio vascular, sinapses colinérgicas e no SNC (Silver, 1974; Pohanka 2011). Ela é responsável pela hidrólise de outros ésteres, além da ACh (Alles e Hawes, 1940; Mendel e Rudney, 1943). A comparação entre os níveis totais de ChE isto é, AChE e BuChE, em diferentes regiões do cérebro foi investigada por Menequz e colaboradores (1992) em ratos adultos (3 meses) e idosos (24 meses). As formas globulares G4 (tetramérica) e G1 (monomérica) foram detectadas em todas as regiões do cérebro e não houve diferença nas razões AChE/BuChE nas diferentes idades. Os mesmos autores verificaram também que a expressão da razão G4/G1 estava diminuída nos ratos idosos e que há uma significativa perda de atividade enzimática da isoforma G4 em córtex cerebral, hipocampo, estriado e hipotálamo com o passar da idade. Essas variantes, portanto, determinarão tanto a distribuição quanto o papel da enzima (Massoulié et al., 1998). A expressão de variantes de AChE depende da ativação do promotor induzida por estresse e modulação pós-transcricional, incluindo a estabilidade do RNAm, o *splicing* alternativo de RNAm, o controle da tradução e modificações de proteínas (Jiang e Zhang, 2008).

1.4.1 Relação entre acetilcolinesterase e os erros inatos do metabolismo

Estudos sugerem que o sistema colinérgico, mediado pela AChE, pode estar alterado em pacientes acometidos por EIM (Palmer e Percy, 2001; Chaves-Carballo, 1992). Dados de pacientes portadores de EIM apontam uma relação entre as alterações eletroencefalográficas e atraso no neurodesenvolvimento (Souza et al., 2007). Sabe-se que a atividade da AChE é alterada em modelos animais para EIM como tirosinemia do tipo II (Ferreira et al., 2012), deficiência da guanidinoacetato metiltransferase (Zugno et al., 2008), doença da urina do xarope do bordo (Scaini et al., 2012) e fenilcetonúria (Souza, 2002). Diante desses fatos e dos sintomas clínicos já descritos da SCADD e EE, acredita-se que a AChE pode estar alterada nos pacientes acometidos por ambas doenças.

1.5 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS (*IN SILICO*)

Avanços fundamentais para o conhecimento sobre a biologia dos mamíferos puderam ser alcançados a partir de experimentos com animais (Matfield, 1996). Porém, o interesse por métodos alternativos,

inicialmente almeçados pelos três R's propostos por Russel e Burch em 1959 (redução, refinamento e substituição; do inglês *reduction*, *refinement* e *replacement*), tem crescido na tentativa de diminuir o número de animais utilizados em experimentação e também reduzir o custo dos experimentos. Além disso, questões éticas sobre dor e angústia em animais usados em pesquisa, ensino e em testes na indústria de cosméticos têm preocupado o público e a comunidade científica mundial (Rezende et al., 2008). Uma importante frente de desenvolvimento de alternativas a testes em animais são as simulações computacionais, chamadas de testes *in silico*. Os modelos computacionais podem contribuir para o trabalho experimental testando hipóteses, reduzindo o custo de experimentos com animais e/ou tornando estes experimentos mais eficazes (Ramos et al., 2004). Segundo Eduardo Pagani (2015), nos testes computacionais, uma das possibilidades é a de acessar bases de dados de substâncias já testadas e buscar semelhanças com novas substâncias, efeitos semelhantes de toxicidade e absorção farmacocinética ou até mesmo eficácia para determinadas indicações.

1.5.1 Modelagem Molecular

Modelagem molecular é um termo genérico utilizado para se referir a métodos técnicos e/ou técnicas computacionais que modelam e/ou mimetizam o comportamento de moléculas, com o objetivo de entender e prever propriedades macroscópicas baseadas no conhecimento detalhado em nível atômico (Cohen et al., 1990). O uso de computadores na solução de problemas relacionados à busca de novos fármacos baseando-se nos resultados de química teórica para calcular as propriedades de moléculas pode complementar informações obtidas de experimentos *in vivo* e *in vitro* e até prever a ocorrência de certo fenômeno químico (Namba et al., 2008; Nogara et al., 2015). Alguns estudos foram realizados computacionalmente através de técnicas como Docagem Molecular e Dinâmica Molecular (DM) com a AChE com o intuito de compreender melhor os aspectos da enzima, assim como do seu complexo com ligantes (Tai et al., 2001; Tai et al., 2002; Hadí e Mohammed, 2008). Sabe-se que a AChE deve realizar movimentos substanciais para a catálise e entrada/saída de ligantes. Com a adição de vários ligantes ou por modificação covalente por moléculas como organofosforados ou carbamatos, ocorrem mudanças conformacionais importantes que não são observadas nas estruturas cristalinas dos mesmos complexos/conjugados (Shi et al., 2001). É importante mencionar que a AChE é alvo de várias toxinas que estão

presentes na natureza, como o veneno de cobras fasciculin II, pesticidas paration e malation, e agentes químicos utilizados na guerra como sarin, tabun e soman (Taylor et al., 1996; Sanson et al., 2009).

1.5.2 Aspectos estruturais da acetilcolinesterase

As principais regiões que desempenham importante papel na ligação de ACh à AChE são a tríade catalítica, o local aniônico catalítico (CAS), o local aniônico periférico (PAS), o sítio de ligação acil, o subsítio aniônico e a cavidade oxiânion. Essas regiões estão descritas a seguir e numeradas conforme a sequência de aminoácidos da AChE de *Rattus norvegicus* (rAChE). **Tríade catalítica:** os resíduos serina 203 (Ser203), histidina 447 (His447) e ácido glutâmico (Glu334) permanecem próximos à ACh, que é rodeada pela proteína AChE. Esse fato permite que ocorram múltiplas interações entre substrato e enzima, levando a um estado de transição mais eficaz (Silman e Sussman, 2008). **Local aniônico catalítico (CAS):** contém a região catalítica, é revestida por até 14 resíduos aromáticos conservados e se localiza ao fundo da cavidade. Os anéis aromáticos compõem aproximadamente 70 % da superfície do sítio ativo, com triptofano 86 (Trp86) e tirosina 337 (Tyr337) influenciando o CAS. **Local aniônico periférico (PAS):** os resíduos de tirosina 124, 337 e 341 (Tyr124, Tyr337 e Tyr341) e o triptofano 286 (Trp286), juntamente com o resíduo de ácido aspártico 74 (Asp74) e a serina 125 (Ser125) constituem o PAS, uma região remota ao sítio catalítico e que varia em diferentes espécies. Do meio para baixo da cavidade, existe um afunilamento formado pelas tirosinas 337 e 124 (Tyr337 e Tyr124) que fazem parte do PAS. O triptofano 286 (Trp286) contribui para a entrada da cavidade e serve como comutação do tráfego molecular em direção ao sítio ativo. Esses resíduos do PAS acomodam um grande número de ligantes estruturalmente diferentes, como propidium, galamina ou fasciculun (Rosenberry, 1975). Sabe-se que, enquanto a tirosina 124 (Tyr124) está fixa em toda estrutura cristalina, a tirosina 337 (Tyr337) atua como uma porta oscilante. Este resíduo é bastante flexível e adota diferentes conformações para interagir através de interações de empilhamento- π ou de cátion- π com os ligantes que possam se ligar a essa região (Bartolucci et al., 2010). **Sítio de ligação acil:** os resíduos triptofano 236 (Trp236), fenilalaninas 295, 297 e 338 (Phe295, Phe297 e Phe338) compõem essa região, que determina um papel na limitação da dimensão de substratos capazes de entrar no sítio ativo (Kua et al., 2002). **Subsítio aniônico:** também chamado de subsítio de ligação à colina ou subsítio hidrofóbico, é composto pelos

resíduos triptofano 86, tirosina 133, ácido glutâmico 202, glicina 448 e isoleucina 451 (Trp86, Tyr133, Glu202, Gly448 e Ile451), responsáveis pela ligação ao amônio quaternário por interações cátion- π . A carga positiva do amônio quaternário da ACh pode formar uma interação estável com os elétrons- π dos anéis aromáticos. O Trp86 é um importante resíduo para ligação de ACh e sua substituição por resíduos alifáticos (alanina) resulta em decréscimo da reatividade com ACh, mas não decresce com a mudança para ligantes sem carga (Sussman et al., 1991) (Figura 10).

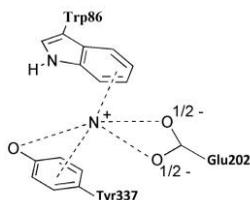


Figura 10: Principais resíduos envolvidos no subsítio aniônico da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE). A linha tracejada indica ligações de hidrogênio e interações cátion- π com o grupo quaternário da ACh. Glu: ácido glutâmico; Trp: triptofano; Tyr: tirosina (Adaptado de Houghton et al., 2006).

Cavidade oxianion: esta região é composta pelas glicinas 121 e 122 (Gly121 e Gly122), e alanina 204 (Ala204). São três resíduos que contêm doadores de ligação de hidrogênio e podem estabilizar o intermediário tetraédrico da ACh formado durante o processo catalítico (Ordentlich et al., 1998) (Figura 11).

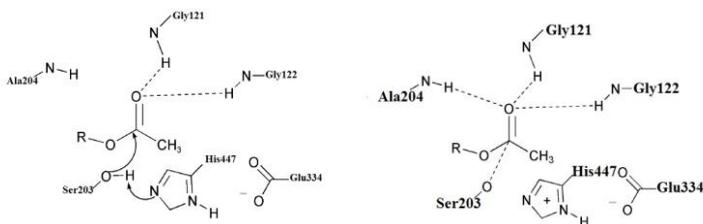


Figura 11: Principais resíduos envolvidos na cavidade oxianion da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE). Interação da tríade catalítica e a cavidade oxianion da AChE com a ACh mostra o estado de transferência do substrato e a formação do intermediário tetraédrico (Adaptado de Houghton et al., 2006)

Todas essas regiões mencionadas estão ilustradas na Figura 12:

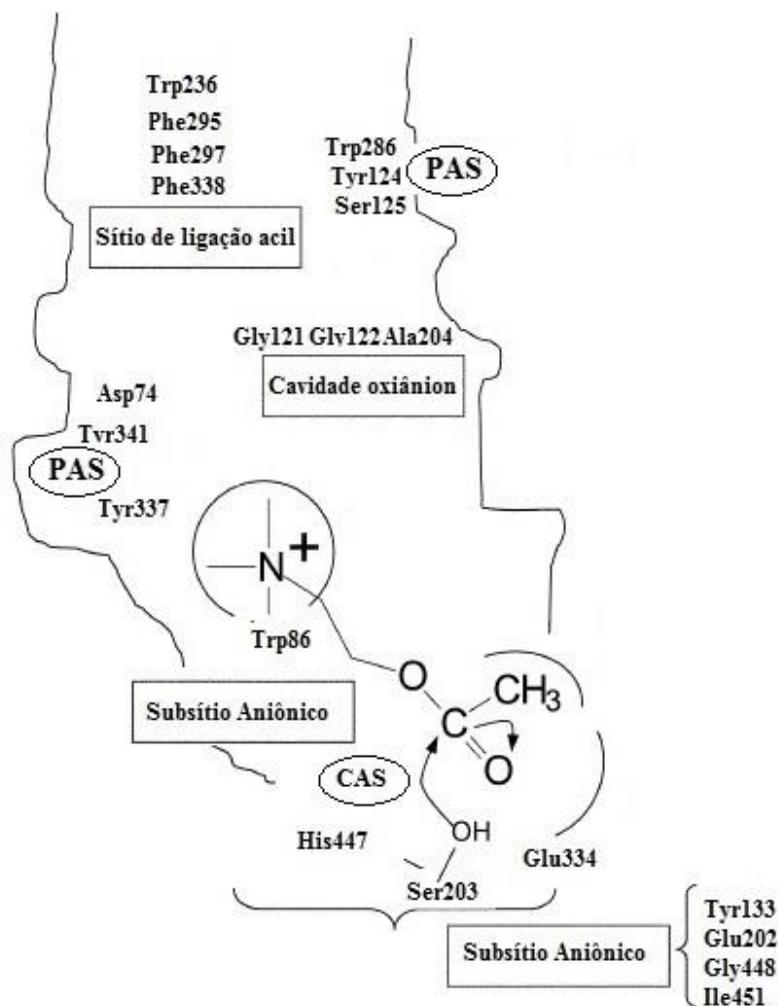


Figura 12: Principais resíduos envolvidos na atividade da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE). Triade catalítica: Ser203, His447 e Glu334; PAS: local aniônico periférico; CAS: local aniônico catalítico. Glu = ácido glutâmico, His = histidina, Phe = fenilalanina, Ser = serina, Trp = triptofano, Tyr = tirosina (Adaptado de Houghton et al., 2006).

1.6 JUSTIFICATIVA

Considerando que os mecanismos fisiopatológicos das doenças SCADD e EE não estão completamente estabelecidos, que em ambas as doenças há o acúmulo tecidual de EMA; que este apresenta diversos efeitos neurotóxicos, altera processos de memória e aprendizado; que o sistema colinérgico está implicado nestes processos; torna-se importante investigar o efeito do EMA sobre a atividade da enzima AChE. Este estudo investiga os mecanismos fisiopatológicos da SCADD e EE, envolvendo o sistema colinérgico para estabelecer novas estratégias terapêuticas a estas doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos *in vitro*, *in vivo* e *in silico* do EMA sobre a atividade da enzima AChE em córtex cerebral de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos *in vivo* da administração aguda do EMA sobre a atividade e níveis de RNAm da enzima AChE em córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida;

- Avaliar os efeitos *in vitro* do EMA sobre a atividade da enzima AChE em córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida;

- Investigar os possíveis modos de interação entre o EMA e a AChE em modelo *in silico*;

- Verificar os possíveis efeitos dinâmicos na região catalítica da AChE provocados pela presença do EMA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

O EMA foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) (Código Sigma 102687) e os demais reagentes foram obtidos conforme mencionado no texto. No dia dos experimentos, o EMA foi dissolvido em tampão específico para cada técnica e o pH foi ajustado para 7,4.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 18 ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar com idade de 30 dias de vida provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram mantidos em caixas com no máximo 5 animais por caixa e mantidos em um ciclo de 12h de claro/escuro à temperatura de aproximadamente $23 \pm 1^\circ\text{C}$ com água e alimento *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações da Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Didáticos e Científicos e das Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob protocolo número 18/2014.

3.2.1 Experimentos *in vivo*

O EMA foi administrado de forma aguda de acordo com Ferreira et al. (2006), como demonstrado na Figura 13:

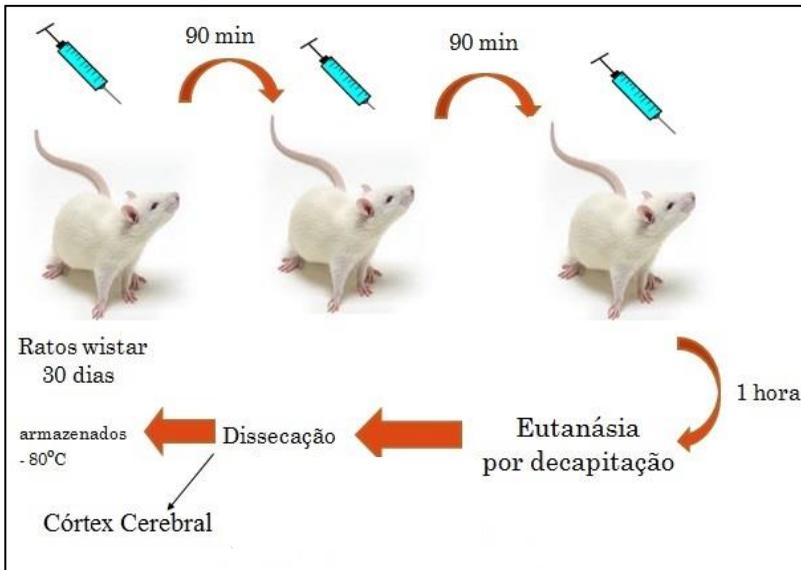


Figura 13: Protocolo de administração subcutânea aguda de ácido etilmalônico (EMA) em ratos com 30 dias de vida. O protocolo é baseado em três injeções subcutâneas de EMA ($6 \mu\text{mol g}^{-1}$ de peso corporal) ou solução salina (grupo controle), de mesmo volumes, em intervalos de noventa minutos. Uma hora após a última injeção, os animais foram mortos por decapitação e o córtex cerebral total foi dissecado e armazenados a -80°C (Figura elaborada pelo autor).

Os animais foram submetidos a três administrações subcutâneas de EMA ($6 \mu\text{mol/g}$ de peso corporal) ou solução salina (grupo controle), nas mesmas condições, com um intervalo de noventa minutos entre as administrações. Sessenta minutos após a última administração, os animais sofreram eutanásia por decapitação e sem anestesia e o córtex cerebral foi isolado, homogeneizado em tampão específico para cada técnica e utilizado para a avaliação da atividade e da expressão de RNAm da AChE.

3.2.2 Experimentos *in vitro*

Para os estudos *in vitro*, os córtices cerebrais de animais com 30 dias de idade sem prévia manipulação foram homogeneizados em tampão da técnica pH 7,4 e centrifugados. O sobrenadante foi incubado na ausência (grupo controle) ou na presença de EMA, nas concentrações de 0,5, 1 ou 2,5 mM durante 60 min a 37°C , de acordo com Schuck et

al. (2002). Imediatamente após a incubação, os homogeneizados foram utilizados para a determinação da atividade da AChE.

3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.3.1 Atividade da AChE

A atividade de AChE foi avaliada nos experimentos *in vivo* e *in vitro* de acordo com o método previamente descrito por Ellman et al. (1961). O meio de reação consistia de 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 1 mM de 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB). O método é baseado na formação do ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) que é medido por absorvância a 412 nm durante 2 minutos de incubação a 25 °C. A enzima (40-50 µg de proteína) foi pré-incubada por 2 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 0,8 mM de iodeto de acetilcolina (AcSCh). Todas amostras foram analisadas em duplicata ou triplicata, e a atividade da enzima foi expressa por µmol de AcSCh.h⁻¹.mg de proteína⁻¹.

3.3.2 Expressão de RNAm da AChE

Para os estudos *in vivo*, o RNA total foi extraído a partir de córtex cerebral total de ratos com o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, o reagente TRIzol foi adicionado às amostras, e a mistura foi homogeneizada. Foi adicionado clorofórmio ao homogeneizado e, após centrifugação, o RNA foi recolhido na fase aquosa superior, o qual foi removido, precipitado com álcool isopropílico, e o sedimento de RNA foi ressuspenso. Os ácidos desoxirribonucleicos complementares (DNAC) foram sintetizadas utilizando *SuperScript First-Strand Synthesis System* para reação em cadeia da polimerase e transcriptase reversa (RT-PCR) (Invitrogen, Carlsbad, CA). As reações de PCR foram realizadas com *primers*, na concentração de 0,1 µM, específicos para AChE e β-actina (Tabela 1). Utilizou-se 0,2 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂ e 0,1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen) em um volume total de 25 µL para AChE e 20 µL para β-actina. As seguintes condições foram utilizadas para as reações de PCR: para o primeiro passo de desnaturação, a reação foi submetida a 94 °C por 1 minuto; 1 minuto na temperatura de anelamento (54 °C para β-actina e 55 °C para AChE) e 1 minuto a 72 °C por 35 ciclos. Extensão a 72 °C foi realizada por 10 minutos. Para cada reação de PCR, um controle negativo foi incluído.

Os produtos de PCR amplificados (AChE 785 pares de base; β -actina, 210 pares de base) foram submetidos a eletroforese através de um gel a 1 % de agarose com GelRed® (Invitrogen, Carlsbad, CA). A abundância relativa de cada RNAm vs β -actina foi determinada por densitometria utilizando o programa gratuito ImageJ 1.37 para Windows.

Tabela 1: Sequência dos *primers* para avaliação de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm)

Gene	Sequência do iniciador direto	Sequência do iniciador inverso
<i>ache</i> *	5'- GAC TGC CTT TAT CTT AAT GTG -3'	5'- CGG CTG ATG AGA GAT TCA TTG -3'
β -actina**	5'- TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG-3'	5'- TAC TCC TGC TTC CTG ATC CAC AT-3'

* Elaborado por Scaini (2012); ** Elaborado por da Da Silva et al. (2008).

Utilizando-se a ferramenta *Primer Blast* (Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>>) observa-se que os *primers* iniciador direto e inverso foram pareados a partir da base 376 até a 1160, com relação à numeração do RNAm precursor da AChE que contém 2066 pares de bases (pb), resultando em um produto com 785 pb. A Figura 14 mostra que o RNAm obtido inclui o éxon 2 (E2) da AChE de rato, ou seja, engloba a região que contém os aminoácidos responsáveis pela catálise enzimática.

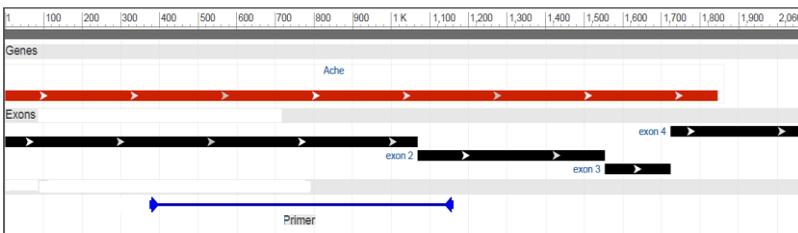


Figura 14: Região de anelamento dos *primers* utilizados no gene da acetilcolinesterase (*ache*) de *Rattus norvegicus*. Os *primers* englobam o éxon 2 (E2) que contém os aminoácidos responsáveis pela catálise enzimática. Tamanho da sequência do produto de PCR (*PCR product length*): 785. Precursor do RNAm da AChE de rato: código NCBI NM_172009.1 contém 2066 pares de bases (2.1 Kbp).

3.3.3 Quantificação de Proteínas

As concentrações de proteínas nas amostras foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em duplicata ou triplicata e a média dos valores obtidos foi utilizada para análise estatística. O teste *t* de Student foi utilizado para comparação entre as duas médias (experimento *in vivo*). Assumindo que os dados tenham uma distribuição normal, para comparação de três ou mais médias (experimentos *in vitro*) foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Duncan para análise dos dados obtidos na determinação dos efeitos bioquímicos das concentrações testadas. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor de $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas em um computador com o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Os resultados foram representados como média \pm erro padrão da média.

3.5 EFEITO *IN SILICO* DO EMA SOBRE A ACHE DE *RATTUS NORVEGICUS*

3.5.1 Modelo por homologia de acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE)

Muitas sequências de proteínas são conhecidas, descritas e suas estruturas depositadas no banco de dados público de estruturas de proteínas *Protein Data Bank* (PDB). Por outro lado, muitas das proteínas nunca terão suas estruturas determinadas experimentalmente (Larsson et al., 2008). A modelagem por homologia tornou-se o método de escolha para obtenção das coordenadas tridimensionais para proteínas cujas estruturas são ainda desconhecidas (Filho e Alencastro, 2003).

Essa técnica é uma ferramenta para determinação de estruturas de alta qualidade a partir de uma ou mais estruturas molde (*template*) que possuam uma estrutura tridimensional resolvida, determinada por técnicas de cristalografia de raio-X ou ressonância magnética nuclear (RMN). Essa técnica consegue prever a estrutura de proteínas homólogas pelo uso apenas de sua informação sequencial (alvo)

(Rodriguez et al., 1998; Goldsmith-Fischman e Honig, 2003). A construção de um modelo por homologia é composto por quatro etapas principais: (1) identificação de modelo estrutural, (2) o alinhamento da sequência alvo e estrutura de modelo, (3) a construção de modelos e (4) avaliação da qualidade do modelo. (Eswar et al., 2007).

A identificação do *template* é o primeiro crítico passo que parte da identificação do homólogo apropriado de uma estrutura de proteína já conhecida, a qual é suficientemente similar à sequência alvo a ser modelada. O ideal é a identificação do *template* com a maior porcentagem de identidade (alinhamento idêntico de aminoácidos) e similaridade (alinhamento de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes) com relação ao alvo, a melhor resolução assim como estruturas com (ou sem) os ligantes apropriados e/ou cofatores. O próximo passo envolve o alinhamento da sequência alvo com a estrutura do *template*, sendo um passo muito importante o qual há várias formas de validar sua acurácia. A construção do modelo pode ser realizada por programas disponíveis gratuitamente, apesar da teoria por trás da sua construção ser complexa. Esses programas utilizam diferentes métodos para construção da estrutura 3D, porém o método mais comumente utilizado é o da satisfação de restrição espacial dos átomos da proteína. Um problema usualmente encontrado é a modelagem dos *loops*, que pode ser melhor tratado utilizando programas específicos para esse caso. O modelo inicial obtido deve conter ângulos e comprimento de ligação ajustados por um processo de minimização de energia, que pode ser ainda melhorado com o uso de dinâmica molecular. Após sua construção, o modelo precisa ser validado e em alguns casos necessita de refinamento baseado no ajuste do alinhamento (Figura 15).

são as principais fontes de erros na modelagem por homologia (Arnold et al., 2006).

Os modelos tridimensionais gerados pela técnica de modelagem por homologia podem ser aplicados não somente em predição funcional e em desenho racional de fármacos baseado em estrutura, mas também no desenho de experimentos de mutagênese sítio-dirigida, fornecendo possíveis mutações para testar hipóteses funcionais, modelar a especificidade de um substrato, fazer a predição de epítomos antigênicos, possibilitar simulações de interações entre proteínas por técnicas de dinâmica molecular, auxiliar no refinamento de estruturas resolvidas por cristalografia de raios-X e por experimentos RMN, dentre outras (Rössle, 2004). As duas estruturas de AChE obtidas a partir da técnica de cristalografia de raio-X mais estudadas são as de *Torpedo californica* (tcAChE) e de *Mus musculus* (mAChE). A AChE tende a ser muito bem conservada entre as espécies. Neste sentido, a AChE humana (huAChE) apresenta 88% de identidade (aminoácidos idênticos quando se compara as duas sequências) e 97% de grau de homologia (ancestralidade comum) com a mAChE. Apesar da grande divergência evolutiva, huAChE e tcAChE possuem 57% de identidade e 86% de grau de homologia ao longo de suas sequências (Lushington et al., 2006), sendo os estudos de estrutura e função extrapolados a partir de tcAChE para huAChE (Silman e Sussman, 2008), tendo sido modelada por homologia (Bennion et al., 2013).

A partir de uma pesquisa no PDB verificou-se a ausência da estrutura da rAChE, ou seja, a estrutura da AChE para esse organismo ainda não foi obtida, tanto por cristalografia de raio-X como por ressonância magnética nuclear (RMN). Em vista disso, houve a necessidade de construção do modelo por homologia de rAChE utilizando-se duas estruturas de cristalografia de raio-X de AChE da espécie *Mus musculus* como molde, a qual possui grande homologia com a estrutura desejada.

As duas estruturas cristalográficas moldes foram retiradas do PDB, sob os códigos 4B82 e 4BC0 (2.10 Å e 3.35 Å de resolução), e tiveram seus inibidores removidos para se obter os moldes iniciais para realização da modelagem comparativa. A sequência de aminoácidos da proteína alvo (rAChE) foi obtida do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob o código de referência de NP_742006.1 com 614 aminoácidos. A seleção da sequência homóloga foi baseada na porcentagem de cobertura ao longo da sequência, assim como nos níveis de identidade e similaridade acima de 30 % e 60 %, respectivamente. O alinhamento entre a sequência alvo e as sequências moldes foi realizado

pelo programa ClustalW2 (Thompson et al., 1994; Larkin et al., 2007). Os parâmetros padrões foram aplicados para processar o alinhamento local. O modelo tridimensional de rAChE (apo-AChE) foi construído utilizando-se o programa MODELLER 9v6 (Sali et al., 1993; Eswar et al., 2007).

Cem modelos foram gerados e o modelo com a menor pontuação de função objetiva foi escolhido. Após a submissão do modelo, com o uso de *scripts* do MODELLER, uma análise de média quadrática do desvio padrão (RMSD) foi realizada utilizando-se como referência as estruturas dos moldes. O modelo foi otimizado utilizando-se método de variável da função alvo (Braun et al., 1985) pelo emprego de algoritmo de gradiente conjugado, além de DM com anelamento simulado para melhor estabilizar o modelo. Os processos foram realizados em computador com processador Intel® Dual Core™ CPU (1.8 GHz) em sistema operacional Windows.

Para se verificar a qualidade estereoquímica dos contatos atômicos do modelo por homologia construído, submeteu-se este modelo para uma avaliação da sua qualidade através do servidor RAMPAGE (Lovell et al., 2002). (Disponível em: <<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>>) o qual mede, para cada resíduo, os ângulos torcionais da cadeia principal, Phi e Psi, ângulos torcionais das cadeias laterais, maus contatos (ou impedimentos estéricos), planaridade das ligações peptídicas, desvios em relação à geometria tetraédrica dos carbonos-alpha, dentre outros.

3.5.2 Predição de sítios para fosforilação da rAChE por PKA

Para esta etapa utilizou-se a ferramenta de predição *in silico* NetPhos 2.0 (Blom et al., 1999) dos sítios potencialmente fosforiláveis de rAChE por PKA. O algoritmo computacional é baseado em banco de dados experimentais (*learning sets*) programados para relacionar a sequência alvo com os aminoácidos da sequência consenso já previamente conhecidas por PKA. O programa confronta a sequência primária de rAChE com a base de dados, e como resultado obtém-se serinas, treoninas ou tirosinas com probabilidade de fosforilação acima do limiar de confiabilidade mínimo estabelecido pela ferramenta (*score*), que é de 0,5. Os resíduos que obtiverem o maior *score* teórico, são mais confiáveis na predição da fosforilação devido à maior similaridade com outros sítios de fosforilação existente no banco de dados alimentado pelo *Phospho Database*.

3.5.3 Docagem Molecular

Docagem (do inglês *docking*) é um termo utilizado computacionalmente que se esforça em encontrar a melhor ligação entre duas moléculas: um receptor (proteína) e um ligante (Halperin et al., 2002). O problema de docagem proteína-ligante consiste basicamente na predição do modo de ligação de uma pequena molécula (ligante) à região de ligação (sítio ativo) ou a uma outra região de um alvo molecular (Figura 16). Um alvo molecular é uma molécula receptora, podendo ser proteína/enzima, ácidos nucleicos, lipídeos ou polissacarídeos (Magalhães, 2006).

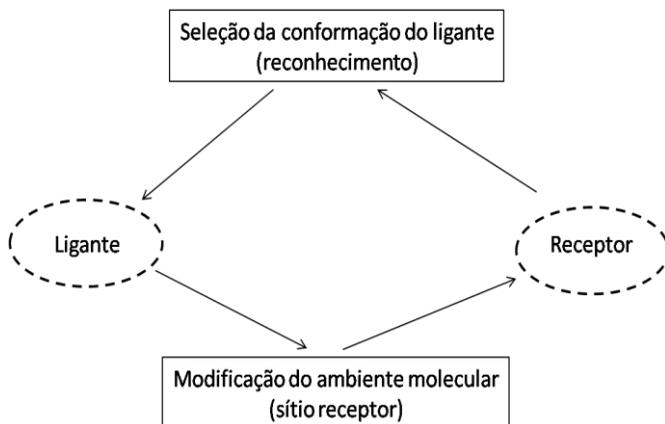


Figura 16: Processo de indução e seleção de conformações por ligante e receptor. Receptor e ligante modificam-se mutuamente no processo de interação, podendo resultar em uma resposta de interesse terapêutico (Adaptado de Testa et al., 2000).

O programa de docagem proteína-ligante consiste de dois componentes essenciais: *sampling* e *scoring*. *Sampling* se refere à geração de orientações/conformações do modo de ligação do ligante à proteína. *Scoring* é a predição da força de ligação de ligantes individuais utilizando uma função de energia, isto é, o melhor modo de ligação é predito com aquele que possui o menor valor de energia (Huang e Zou, 2010). O conhecimento da estrutura tridimensional de proteínas é de grande valor para a compreensão das bases moleculares de suas funções (Vyas et al., 2012).

Os experimentos de docagem molecular foram realizados para explorar o modo de ligação do EMA no sítio ativo de rAChE. Também

comparou-e as energias de ligação da ACh interagindo com a forma apo-AChE (sem ligantes) e também com a halo-AChE (ACh previamente ligada ao EMA) utilizando o programa AutoDockVina Versão 4.2 (Trott et al., 2010). A estrutura inicial de rAChE (542 resíduos) foi obtida por modelagem comparativa e as coordenadas do EMA e ACh foram obtidas do banco de dados de ligantes ZINC (Irwin e Shoichet, 2005), sendo os códigos do EMA e da ACh 00388046 e 03079336, respectivamente (*ZINC Database*)

AutodockTools 1.5.6 (ADT) (Morris et al., 2009) foi empregado na preparação das estruturas iniciais do receptor e dos ligantes (ACh e EMA) no formato de arquivo reconhecido pelo programa (arquivos Pdbqt). Os hidrogênios da proteína foram protonados em pH fisiológico e as cargas Gasteiger foram adicionadas. Diferentes parâmetros foram utilizados para gerar a caixa (*grid*) e os arquivos da docagem.

Inicialmente, para a realização das simulações de docagem da ACh no sítio ativo da rAChE, uma *grid* de dimensões 70 Å x 70 Å x 70 Å foi definida e aplicou-se um espaçamento de 0,375 Å (Figura 17).

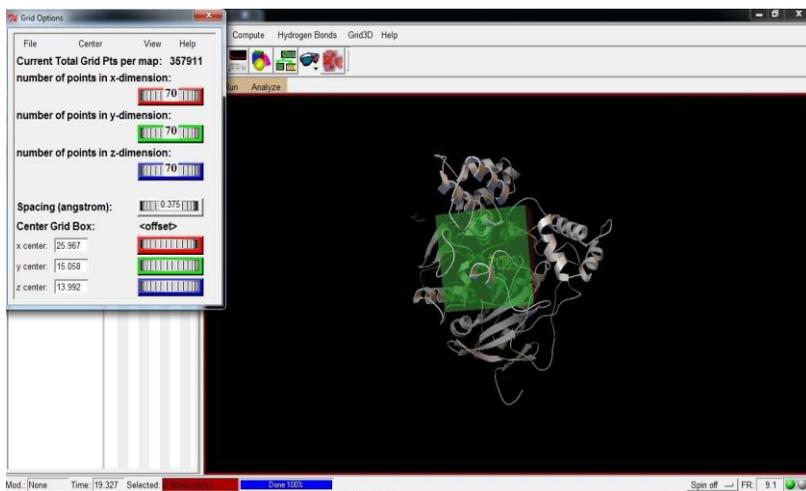


Figura 17: Parâmetros para a docagem da acetilcolina (ACh) na acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE). O ligante que será docado (ACh) procurará, dentro dos parâmetros definidos, modificar sua conformação para encontrar uma interação mais energeticamente favorável com o sítio ativo da AChE livre de ligantes e que resultará no menor valor de energia de ligação possível (ΔG). A *grid* está centralizada no oxigênio da Ser203.

Diferentemente, a detecção do possível modo de ligação do EMA

na AChE previamente ligada à ACh foi realizada através de uma docagem cega com o intuito de mapear toda a superfície da proteína. Sendo assim utilizou-se uma *grid* de dimensões maiores (110 Å x 80 Å x 120 Å) e aplicou-se um espaçamento de 0,6 Å (Figura 18). Nos dois procedimentos, o receptor foi centralizado na posição do oxigênio da cadeia lateral da serina catalítica (Ser203) (posições $x=25,967$, $y=15,058$ e $z=13,992$).

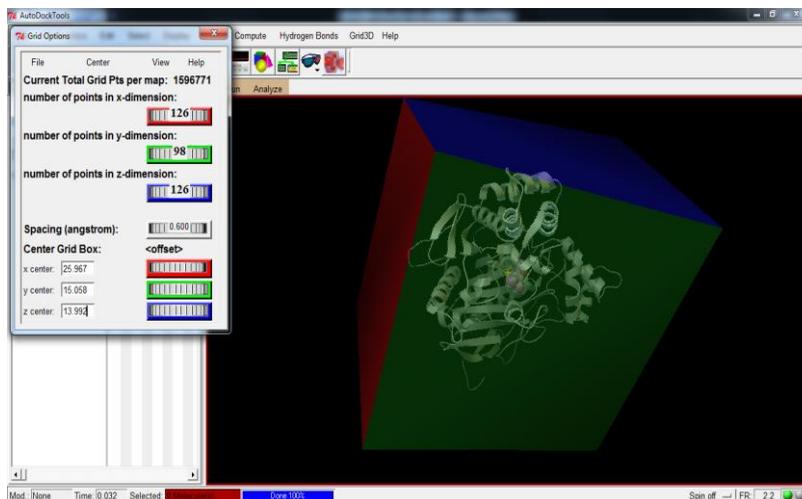


Figura 18: Parâmetros para a docagem do ácido etilmalônico (EMA) na acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE) previamente ligada à acetilcolina (ACh). O ligante que será docado (EMA) procurará de forma cega modificar sua conformação para encontrar uma interação mais energeticamente favorável na AChE conforme os parâmetros definidos e levando em consideração a presença prévia da ACh, que resultará em um menor valor de energia de ligação possível (ΔG). A ACh está mostrada no formato “bola e bastão” no sítio ativo da AChE. A *grid* está centralizada no oxigênio da Ser203.

Em resumo, o protocolo experimental seguiu 4 etapas, sendo o ΔG_1 a afinidade de ligação da ACh na AChE livre de ligantes e ΔG_2 a afinidade de ligação da ACh na AChE previamente ligada ao EMA (complexo EMA-AChE):

Etapa 1: obtenção do ΔG_1 pela docagem da ACh no sítio ativo da AChE (formando o complexo ACh-AChE);

Etapa 2: docagem cega do EMA na AChE na presença do seu substrato (formando o complexo EMA-ACh-AChE);

Etapa 3: retirada da ACh do complexo para formar o novo complexo EMA-AChE;

Etapa 4: obtenção do ΔG_2 pela nova docagem da ACh no sítio ativo da AChE, utilizando o complexo EMA-AChE e os mesmos parâmetros da Etapa 1.

Os valores padrão para os parâmetros específicos de busca local, assim como os utilizados na simulação por anelamento, foram designados pelo programa. Os cálculos da docagem foram realizados pelo método do algoritmo genético Lamarckiano (LGA) também utilizando os valores padrão do programa. A mais alta pontuação dos modelos gerados (isto é, com a menor energia de ligação) do composto foi escolhida como sendo o mais representativo modo de ligação do EMA à AChE. Os dados gerados foram visualizados pelo programa PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6 – 2013* Schrödinger, LCC) e RasMol (Sayle e Milner-White, 1995).

4 RESULTADOS

Primeiramente, foram examinados os efeitos causados pela administração aguda subcutânea de EMA sobre a atividade da AChE em córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida. A Figura 19 mostra que a administração aguda de EMA aumentou a atividade da AChE em córtex cerebral de ratos, quando comparada ao grupo controle.

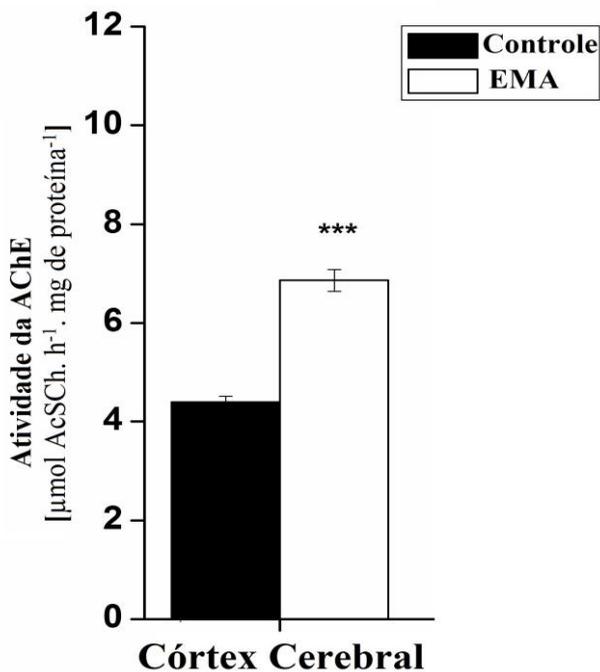


Figura 19: Efeito *in vivo* da administração aguda de ácido etilmalônico (EMA) sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em córtex cerebral de ratos com 30 dias de idade. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata ($n=6$) e são expressos em μmol de acetilcolina. $\cdot\text{h}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $***p<0,001$ comparado ao grupo controle (teste *t* de Student para amostras independentes).

Por outro lado, a Figura 20 mostra que os níveis de mRNA não foram diferentes dos encontrados no tecido dos animais do grupo controle.

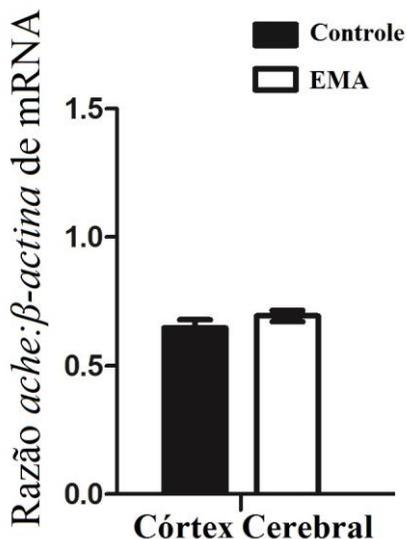


Figura 20: Expressão relativa de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) do gene da acetilcolinesterase (*ache*) após administração aguda de ácido etilmalônico (EMA) em córtex cerebral de ratos com 30 dias de idade. Os resultados de RT-PCR semiquantitativo são expressos como média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6) em unidades da razão *ache*: β -actina de densidade óptica. Não houve diferença significativa entre os grupos (teste *t* de Student para amostras independentes).

O próximo passo foi investigar o efeito direto de concentrações crescentes de EMA *in vitro* (0,5, 1 e 2,5 mM) sobre a atividade da AChE em homogeneizados de córtex cerebral. A Figura 21 mostra que o EMA, na concentração de 2,5 mM, aumentou significativamente a atividade da AChE em córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida.

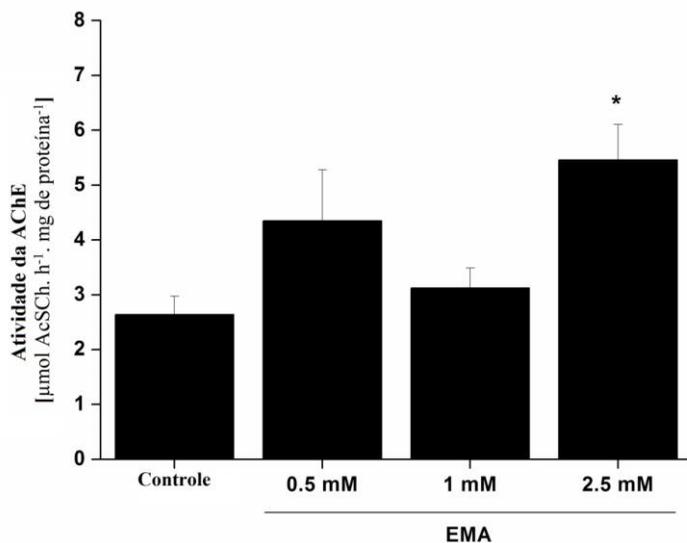


Figura 21: Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (EMA) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em duplicata ($n=6$) e estão expressos em μmol de acetilcolina. h^{-1} . mg de proteína $^{-1}$. * $p<0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de teste dos múltiplos raios de Duncan).

Baseado nos experimentos apresentados acima, foram realizados experimentos *in silico* utilizando-se de métodos computacionais com o intuito de investigar a hipótese de que o EMA poderia interagir com o sítio ativo da AChE. Foi comparado, por docagem molecular, o modo de ligação do EMA à rAChE. A Tabela 2 mostra as sequências de AChE obtidas pelo NCBI (Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>>) e seus respectivos códigos:

Tabela 2: Sequências primárias de acetilcolinesterase de *Mus musculus* (mAChE), *Homo sapiens* (hAChE) e *Rattus norvegicus* (rAChE).

Sequência dos 614 aminoácidos
<p>><i>Mus musculus</i> (NP_033729.1)</p> <p>MRPPWYPLHTPSLAFPLLFLLLSLLGGGARAEGREDPQLLV RVRGGQLRGIRLKAPGGPVSAFLGIPFAEPPVGSRRFMPPEP KRPWSGVLDATTFQNVCYQYVDTLYPGFEGTEMWNP NRE LSEDCLYLNWVTPYPRPASPTPVLIIWIYGGGFYSGAASLDV YDGRFLAQVEGAVLVSMNYRVGTFGFLALPGSREAPGNV GLLDQRLALQVWQENIAAFGGDPMSVTLFGESAGAASVG MHILSLPSRSLFHRAVLQSGTPNGPWATVSAGEARRRATLL ARLVGCPPGGAGGNDTELIACLRTRPAQDLVDHEWHVLPQ ESIFRFSFVPVVDGDFLSDTPEALINTGDFQDLQVLVGVVK DEGSYFLVYGVPGFSDNESLISRAQFLAGVRIGVPQASDL AAEAVVLHYTDWLHPEDPThLRDAMSAVVGDNVVCV AQLAGRLAAQGARVYAYIFEHRASLTWPLWMGVPHGYE IEFIFGLPLDPSLNYTTEERIFAQRLMKYWTNFARTGDPNDP RDSKSPQWPPYTTAAQQYVSLNLKPLEVRRGLRAQTCAFW NRFLPKLLSATDTLDEAERQWKAEFHRWSSYMVHWKNQF DHYSKQERCSDL</p>
<p>><i>Homo sapiens</i> (NP_000656.1)</p> <p>MRPPQCLLHTPSLASPLLLLLLWLLGGGVGAEGREDAELL VTVRGGRLRGIRLKTTPGGPVSAFLGIPFAEPPMGPRRFLPPE PKQPWSGVVDATTFQSVCYQYVDTLYPGFEGTEMWNP NR ELSEDCLYLNWVTPYPRPTSPTPVLVWIYGGGFYSGASSLD VYDGRFLVQAERTVLVSMNYRVGAFGFLALPGSREAPGNV GLLDQRLALQVWQENVAAFGGDPTSVTLFGESAGAASVG MHLLSPSRGLFHRAVLQSGAPNGPWATVGMGEARRRAT QLAHLVGCPPGGTGGNDTELVACLTRTRPAQVLVNH EWHV LPQESVFRFSFVPVVDGDFLSDTPEALINAGDFHGLQVLV GVVKDEGSYFLVYGAPGFSDNESLISRAEFLAGVRV GVPQ VSDLAEEAVVLHYTDWLHPEDPARLREALSDV VGDHNVV CPVAQLAGRLAAQGARVYAYVFEHRASLT SWPLWMGVPH GYEIEFIFGIPLDPSRNYTAEKIFAQRL MRYWANFARTGDP NEPRDPKAPQWPPYTAGAQQYV SLDLRPLEVRRGLRAQAC AFWNRFLPKLLSATDTL DEAERQWKAEFHRWSSYMVHWKNQFDHYSKQDRCS DL</p>

>*Rattus norvegicus* (NP_742006.1)

MRPPWYPLHTPSLASPLLFLLLSLLGGGARAEGREDPQLLV
 RVRGGQLRGIRLKAPGGPVSAFLGIPFAEPPVGSRRFMPPEP
 KRPWSGILDATTFQNVCYQYVDTLYPGFEGTEMWNPNREL
 SEDCLYLNWTPYPRPTSPTPVLWIYGGGFYSGASSLDVY
 DGRFLAQVEGTVLVSMNYRVGTFGLALPGSREAPGNVGL
 LDQRLALQWVQENIAAFGGDPMSVTLFGESAGAASVGMHI
 LSLPSRSLFHRAVLQSGTPNGPWATVSAGEARRRATLLARL
 VGCPPGGAGGNDTELISCLRTRPAQDLVDHEWHVLPQESIF
 RFSFVPVVDGDFLSDTPDALINTGDFQDLQVLVGVVKDEGS
 YFLVYGVPGFSKDNESLISRAQFLAGVRIGVPQASDLAAEA
 VVLHYTDWLHPEDPAHLRDAMSAVVGDNVVCVPAQLA
 GRLAAQGARVYAYIFEHRASLTWPLWMGVPHGYEIEFIF
 GLPLDPSLNYTVEERIFAQRLMQYWTNFARTGDPNDPRDS
 KSPRWPPYTTAAQQYVSLNLKPLEVRRGLRAQTCAFWNRF
 LPKLLSATDTLDEAERQWKAEFHRWSSYMVHWKNQFDHY
 SKQERCSDL

A Figura 22 mostra o alinhamento das sequências primárias de mAChE, rAChE e hAChE. Pode-se observar que não há resíduos com diferentes propriedades físico-químicas entre elas e que a tríade catalítica está completamente preservada.

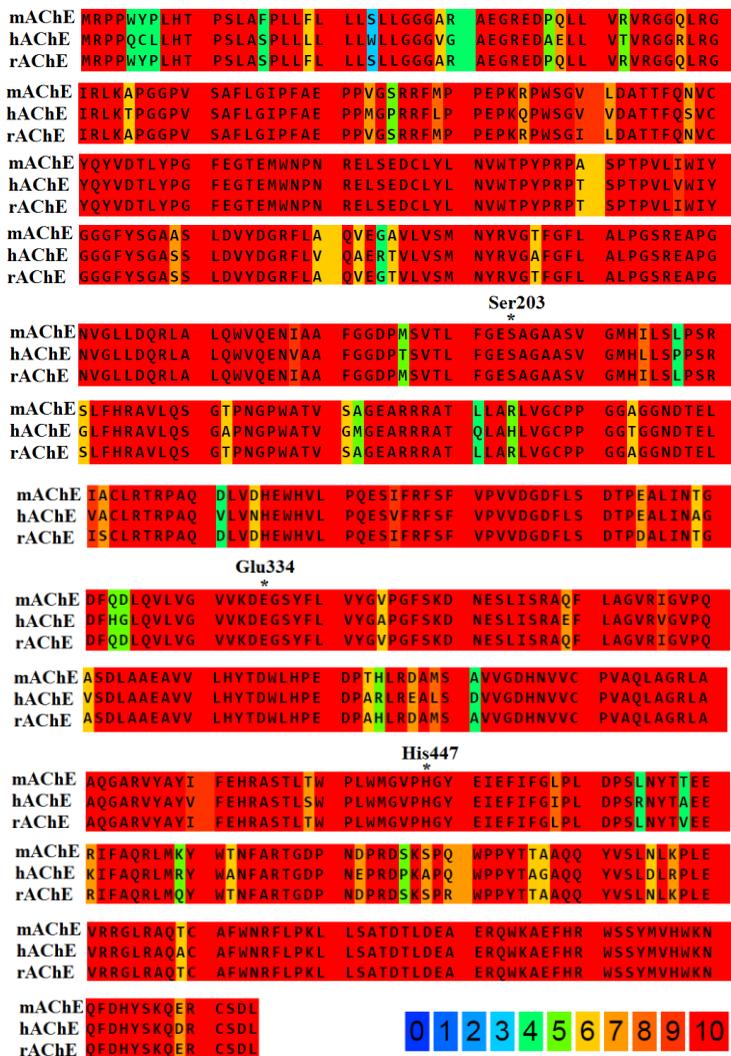


Figura 22: Alinhamento da sequência primária de acetilcolinesterase de *Mus musculus* (mAChE), *Homo sapiens* (hAChE) e *Rattus norvegicus* (rAChE). Em vermelho: regiões conservadas. Em verde, amarelo e laranja: resíduos com semelhanças físico-químicas. Em azul: resíduos com diferentes propriedades químicas. Na base do alinhamento, a conservação está mostrada em forma de escala de 0 para não conservada até 10 para conservada. A tríade catalítica serina 203 (Ser203), histidina 447 (His447) e ácido glutâmico (Glu334) estão marcadas com asterisco (*).

O alinhamento das proteínas, realizado pelo servidor PRALINE (Disponível em: <<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww>>), mostra que a sequência primária de rAChE é muito semelhante às sequências primárias de mAChE e hAChE, apresentando idênticas propriedades no sítio ativo. No entanto, decidiu-se pela construção de um modelo por homologia de rAChE ao invés de usar a estrutura cristalográfica mAChE ou hAChE disponível no PDB para melhor mimetizar os experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* que foram feitos em *Rattus norvegicus*. A partir da sequência alvo de aminoácidos desse organismo obtida do NCBI (NP_742006.1), utilizou-se o molde de duas estruturas cristalográficas de *Mus musculus*, conforme mostrado nas Figuras 23 e 24 (molde 1) e Figuras 25 e 26 (molde 2), com o intuito de obter o melhor modelo por homologia.

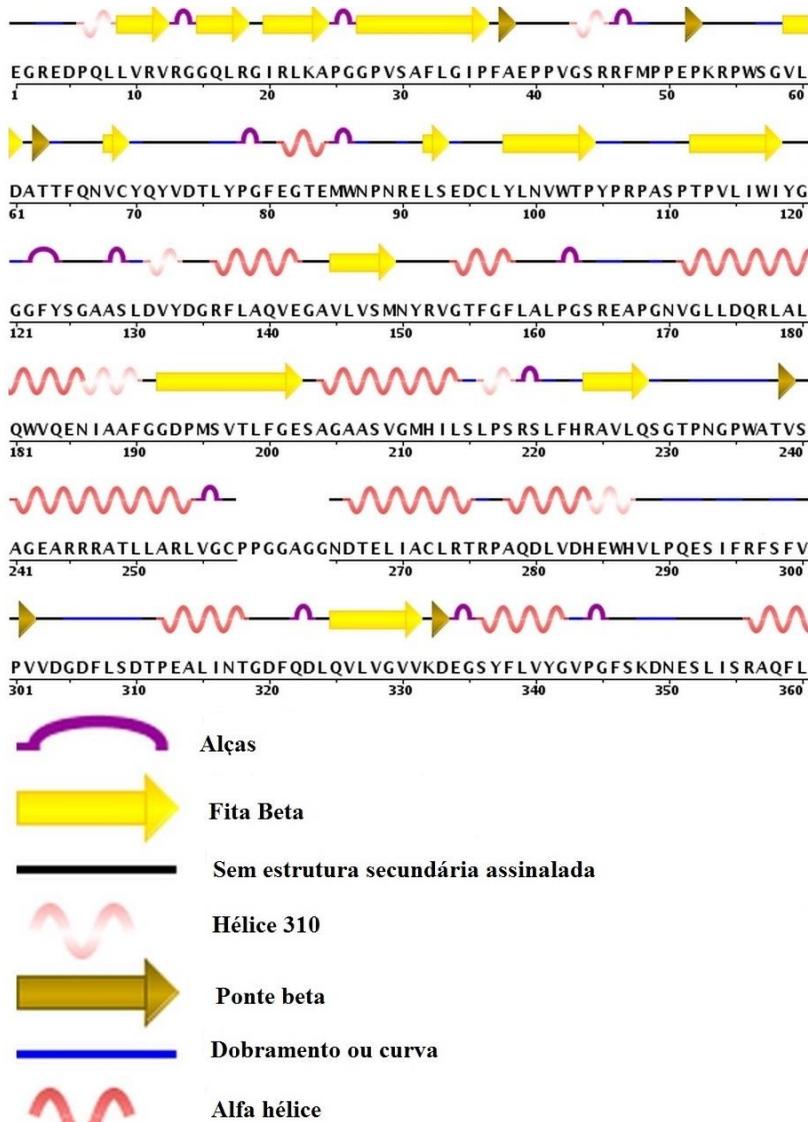
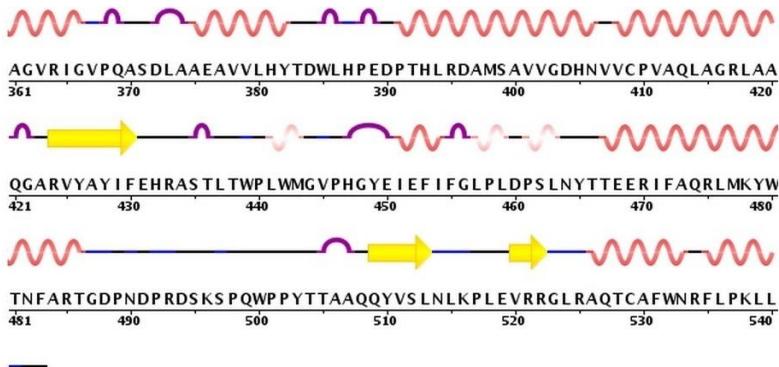


Figura 23: Sequência do aminoácido 1 ao 360 da acetilcolinesterase de *Mus musculus* (mACHE) utilizada como molde 1. PDB ID: 4B82 (resolução de 2,10 Å) e 7 resíduos da cadeia A faltantes prolina 258 (Pro258), prolina 259 (Pro259), glicina 260 (Gly260), glicina 261 (Gly261), alanina 262 (Ala262), glicina 263 (Gly263), glicina 264 (Gly264). Figura adaptada do PDB <<http://www.pdb.org>>.



SAT
541

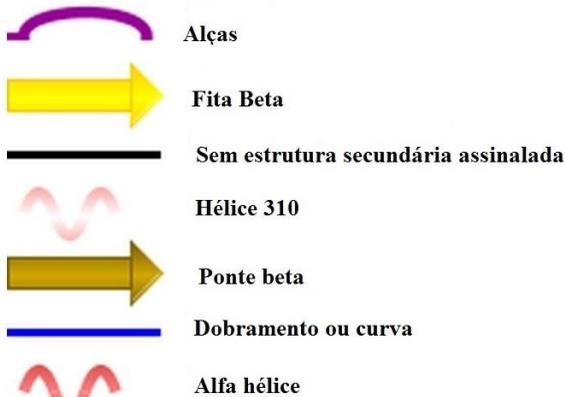


Figura 24: Sequência do aminoácido 361 ao 542 da acetilcolinesterase de *Mus musculus* (mAChE) utilizada como molde 1. PDB ID: 4B82 (resolução de 2,10 Å) e 6 resíduos da cadeia A faltantes treonina 543 (Thr543), alanina 544 (Ala544), treonina 545 (Thr545), ácido glutâmico 546 (Glu546), alanina 547 (Ala547) e prolina 548 (Pro548). Figura adaptada do PDB <<http://www.pdb.org>>.

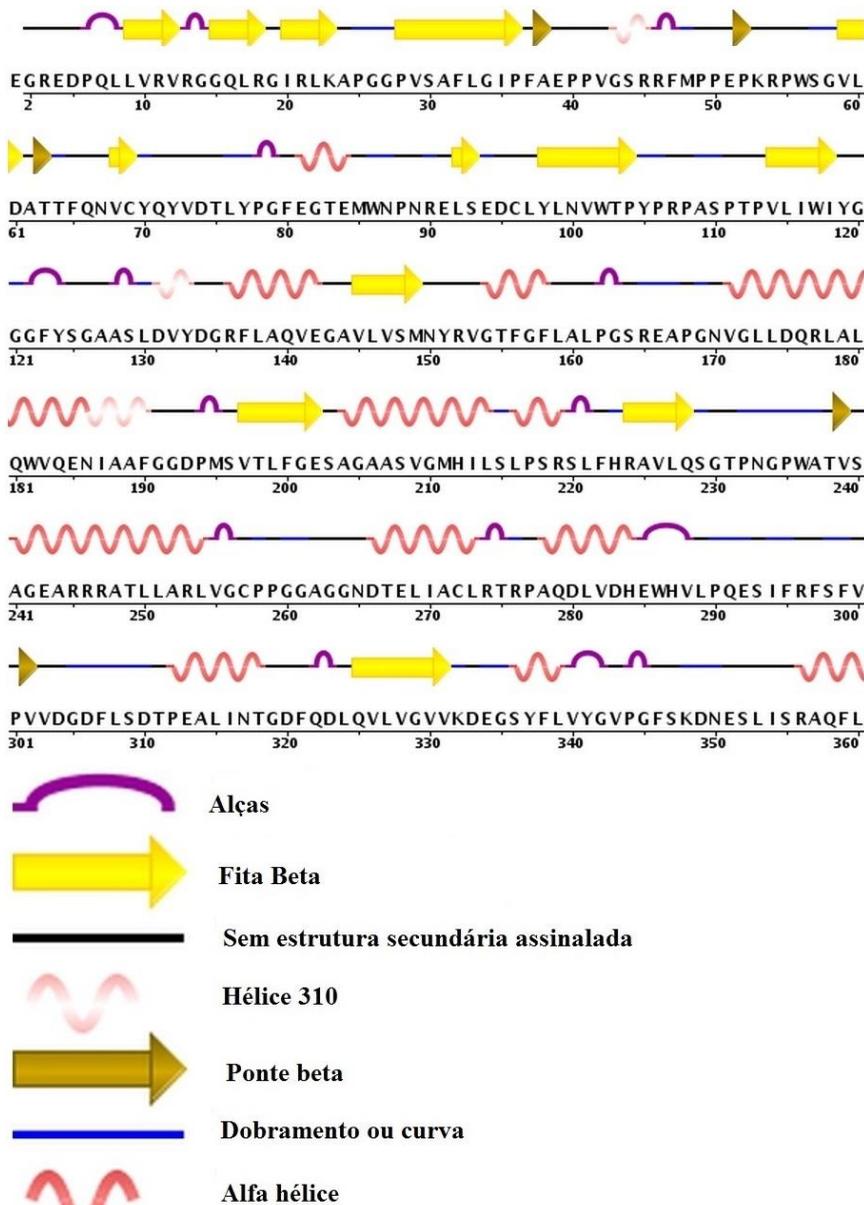


Figura 25: Sequência o aminoácido 1 ao 360 da acetilcolinesterase de *Mus musculus* (mAChE) utilizada como molde 2. PDB ID: 4BC0 (resolução de 3,35 Å) e apenas o ácido glutâmico 1 (Glu1) da cadeia A ausente. Figura adaptada do PDB <<http://www.pdb.org>>.

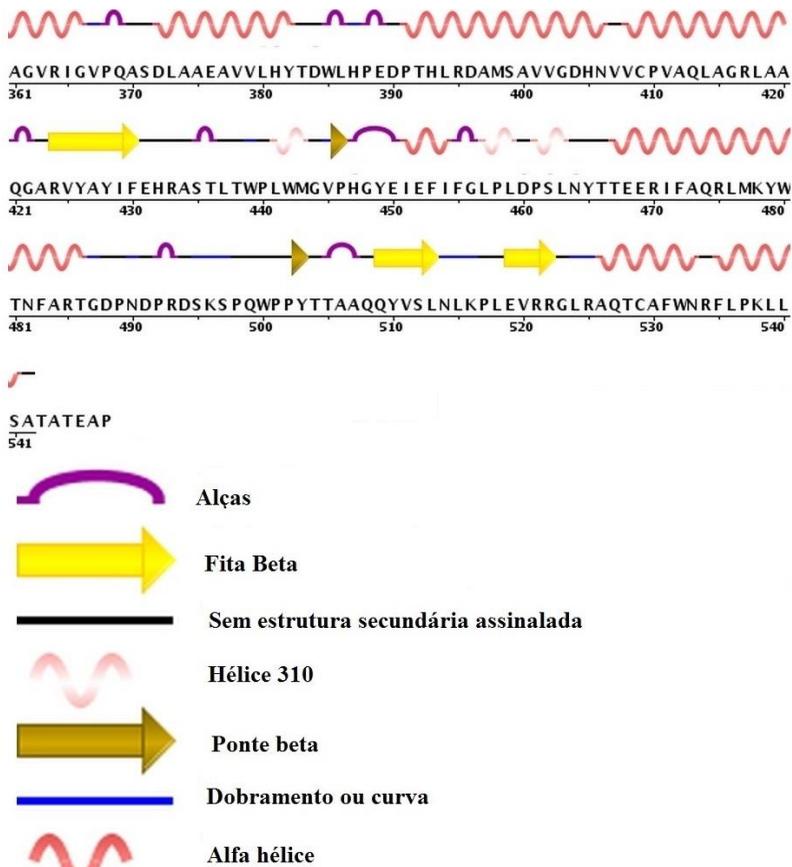


Figura 26: Sequência de aminoácidos do 361 ao 542 da acetilcolinesterase de *Mus musculus* (mAChE) utilizada como molde 2. PDB ID: 4BC0 (resolução de 3,35 Å) e apenas o ácido glutâmico 1 (Glu1) da cadeia A ausente. Figura adaptada do PDB <<http://www.pdb.org>>.

A estratégia de se utilizar as duas sequências de aminoácidos de mAChE, molde 1 e molde 2, levou à obtenção de resultados mais confiáveis, visto que há uma clara relação de homologia entre a sequência alvo (rAChE) e a estrutura conhecida dos moldes, nesse caso, a mAChE. Analisando o modelo por homologia de rAChE na Figura 27, foi observado que todos os resíduos modificados de mAChE para rAChE não pertencem ao sítio ativo e que as posições desses resíduos quimicamente similares prevalecem na superfície da proteína, longe do sítio catalítico.

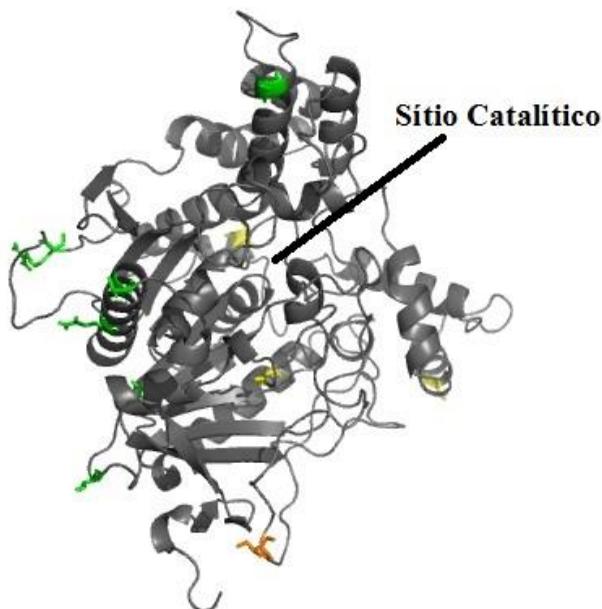


Figura 27: Modelo por homologia da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE). Total de resíduos: 542. Resíduos modificados estão mostrados no formato 'bastão' e numerados de acordo com o precursor de AChE. Val59Ile (laranja), Ala109Thr (verde), Ala128Ser (amarelo), Ala144Thr (verde), Ala271Ser (amarelo), Glu313Asp (amarelo), Thr392Ala (verde), Thr467Val (verde), Lys478Gln (verde), Gln499Arg (verde). As cores em verde, amarelo e laranja representam os resíduos com semelhanças físico-químicas entre 50 %, 60 % e 70 %, respectivamente. A figura foi criada utilizando-se o programa Pymol (<http://www.pymol.org>).

Uma ferramenta de predição de sítios de fosforilação de serinas, treoninas e tirosinas, em proteínas cinase-específicas, foi utilizada. Através dela, obtivemos os possíveis locais de fosforilação da rAChE por PKA (proteína cinase dependente de cAMP) (Figura 28).

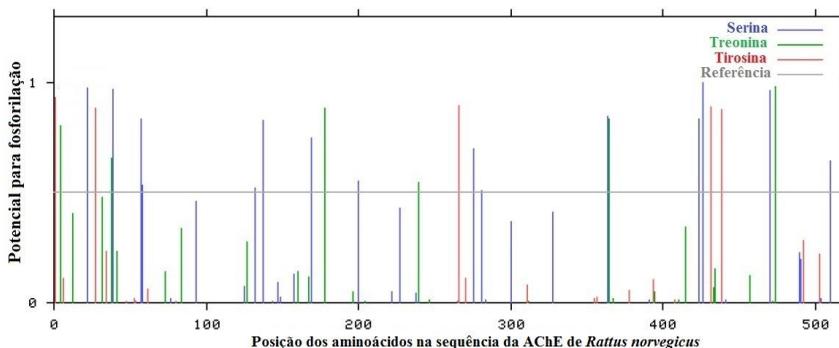


Figura 28: Sítios de fosforilação preditos para acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE). Resultado obtido através da ferramenta *online* NetPhosk 2.0 mostra os possíveis resíduos que podem ser fosforilados. Em azul: resíduos de serina. Em verde: resíduos de treonina. Em vermelho: resíduos de tirosina. Em cinza: referência (*cut off*).

A Tabela 3 mostra todas as possíveis posições e os *scores* dos prováveis sítios de fosforilação dessa enzima.

Tabela 3: Posições e *scores* dos 26 aminoácidos da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE) que podem ser fosforilados. Resultados obtidos através da ferramenta *online* NetPhos 2.0.

Serinas	Treoninas	Tirosinas
22 (0,973)	4 (0,806)	1 (0,935)
39 (0,967)	38 (0,657)	27 (0,885)
57 (0,834)	178 (0,883)	266 (0,893)
58 (0,535)	240 (0,545)	432 (0,890)
132 (0,524)	365 (0,831)	439 (0,874)
137 (0,829)	474 (0,980)	
169 (0,750)		
200 (0,554)		
276 (0,699)		
281 (0,507)		
364 (0,845)		
424 (0,834)		
426 (0,997)		
470 (0,964)		
510 (0,642)		

A Figura 29 mostra que o modelo gerado apresentou 524 resíduos em regiões favoráveis (97,2 %), 13 resíduos em regiões permitidas (2,4 %) e apenas a lisina 496 (Lys496) e serina 497 (Ser497) em regiões desfavoráveis (0,4%).

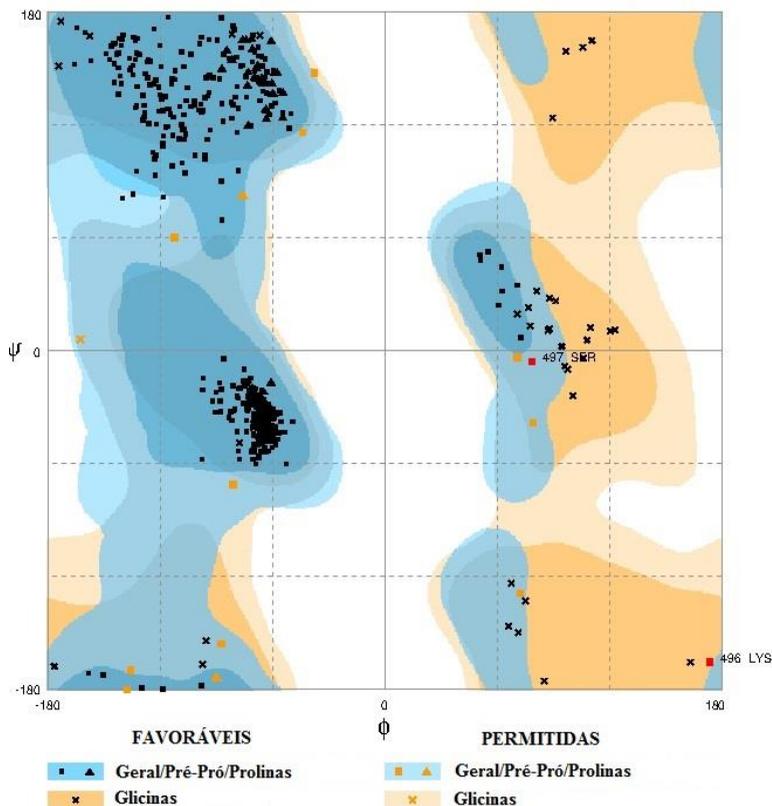


Figura 29: Gráfico de Ramachandran da estrutura de acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE) obtida por modelagem por homologia baseado nos ângulos torcionais ϕ e ψ . ϕ = ângulos PHI; ψ = ângulos PSI. A região azul representa a região favorável geral Pré-Pró/Prolina e a azul clara a região permitida geral Pré-Pró/Prolina. Em laranja escuro região favorável geral para Glicina e em laranja claro região permitida geral para Glicina. Os resíduos *outliers* lisina 496 (Lys496) e serina 497 (Ser497) correspondem a 0,4% do total de resíduos e foram simbolizados por quadrados vermelhos.

A Figura 30 mostra que a lisina 496 (Lys496) e a serina 497 (Ser497), que estão em regiões desfavoráveis segundo gráfico do

Ramachadran, estão localizadas na superfície do modelo por homologia obtido e em regiões sem estrutura secundária definida (*loops*).

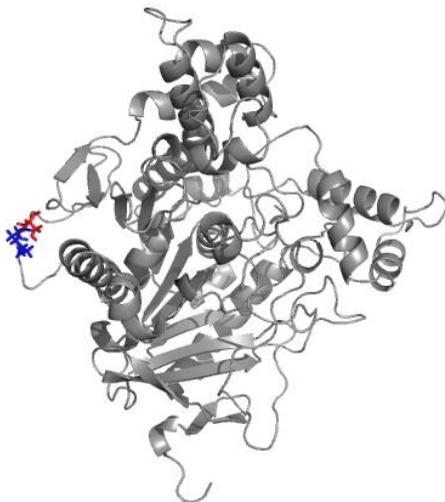


Figura 30: Localização dos dois outliers na estrutura da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE) obtida por modelagem por homologia. Em formato “bastão” mostra-se a localização dos dois resíduos detectados como pertencentes a regiões desfavoráveis na estrutura do modelo de rAChE. Em azul: lisina 496 (Lys496); Em vermelho: serina 497 (Ser 497).

Dessa maneira, o modelo por homologia elaborado e, posteriormente validado, foi submetido a experimentos *in silico*. Para isso, utilizando-se o programa AutoDock Vina e realizou-se a docagem molecular da ACh na AChE de duas maneiras: na ausência do EMA (AChE livre) e na presença do EMA (AChE ligada ao EMA). O ADT detectou 16 hidrogênios apolares e 4 ligações possíveis de rotação para a ACh, bem como 6 hidrogênios não polares e 3 ligações possíveis de rotação no EMA.

Obteve-se um arquivo de saída com 10 conformações do complexo proteína-ligante e cada estrutura foi pontuada e ranqueada pelo programa através do cálculo da energia de ligação. A melhor estrutura obtida através da simulação de docagem molecular foi escolhida e facilmente visualizada com informações sobre o modo de ligação do EMA na cavidade da AChE (Figura 31).

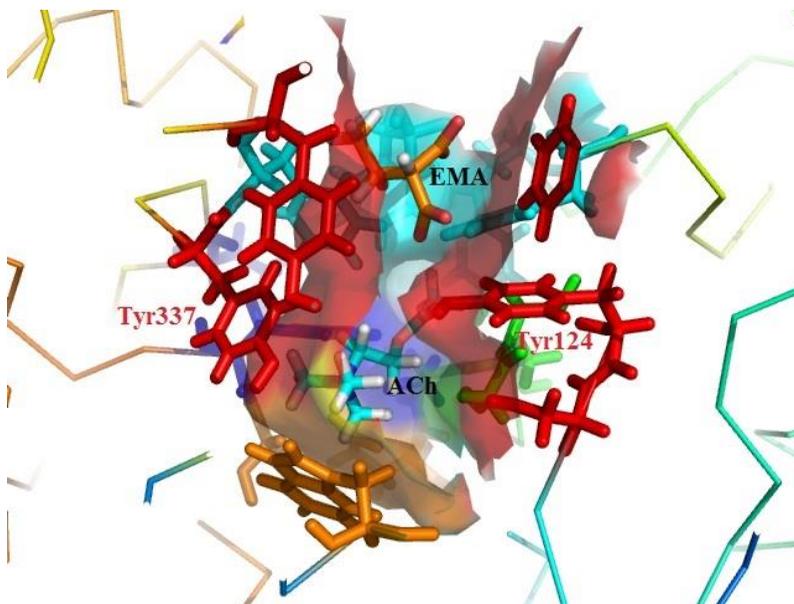


Figura 31: Principais regiões da estrutura da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE) envolvidos na ligação de acetilcolina (ACh) previamente ligado ao ácido etilmalônico (EMA). ACh (em ciano) e EMA (em laranja). Os subsítios importantes para o papel da ligação da ACh estão coloridos como se segue. Azul: tríade catalítica. Verde: cavidade oxianion. Laranja: subsítio aniônico. Ciano: sítio de ligação acil. Vermelho: PAS (sítio aniônico periférico). Amarelo: Ω -loop. Em destaque os resíduos que causam o afinamento da cavidade: tirosina 337 (Tyr337) e tirosina 124 (Tyr124).

Com a presença da ACh no sítio ativo, observou-se que o EMA se liga através de ligações de hidrogênio ao subsítio da rAChE chamado de sítio de ligação acil (Figura 32).

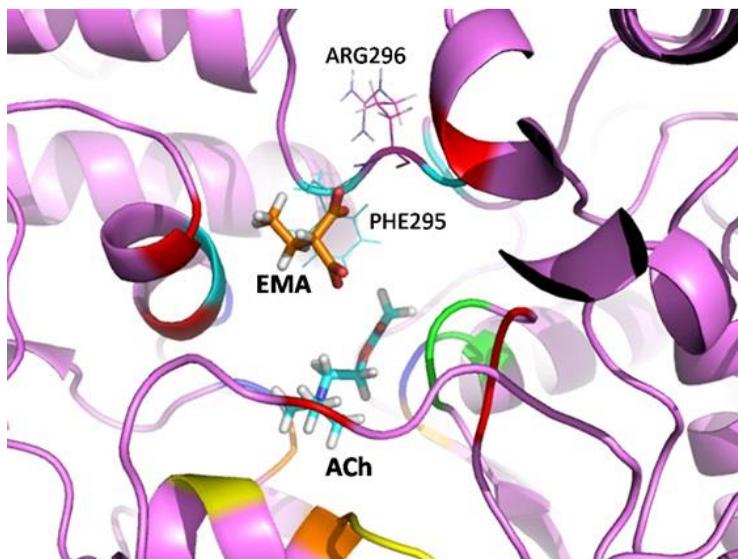


Figura 32: Representação da ligação da acetilcolina (ACh) e do ácido etilmalônico (EMA) na estrutura da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE). ACh (em ciano) e EMA (em laranja). Os subsítios importantes para o papel da ligação da ACh estão coloridos como se segue. Azul: tríade catalítica. Verde: cavidade oxianion. Laranja: subsítio aniônico. Ciano: sítio de ligação acil. Vermelho: PAS (sítio aniônico periférico). Amarelo: Ω -loop. Os resíduos Phe295 (sítio de ligação acil) e Arg296 interagem com EMA como mostrado no formato 'lines'.

Observou-se também que a ACh se liga corretamente à tríade catalítica de rAChE quando o EMA está previamente ligado a ela, pois o grupo acetil interage com a cavidade oxianion no subsítio tetraédrico e a região caudal está localizada no subsítio aniônico (Figura 33 e Tabela 4).

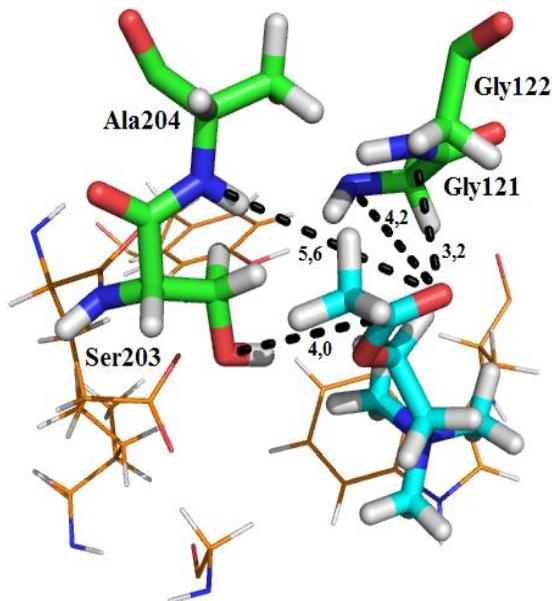


Figura 33: Orientação do grupo acetil da acetilcolina (ACh) com a região esterásica da estrutura da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE) previamente ligada ao ácido etilmalônico (EMA). serina 203 (Ser203); alanina 204 (Ala204); glicina 121 (Gly121); glicina 122 (Gly122). Detalhe da ligação do grupo esterásico da AChE (resíduos em verde) com o grupo acetil da ACh (em ciano). Detalhamento atômico intermolecular evidenciam ligações de hidrogênio previstas entre o carbono da carbolina da ACh e o oxigênio da Ser203 (d_{C-O}), do nitrogênio da Ala204 e oxigênio da carbonila da ACh (d_{N-O^1}), do nitrogênio da Gly121 e carbonila da ACh (d_{N-O^2}), do nitrogênio da Gly122 e carbonila da ACh (d_{N-O^3}) a 4,0 Å, 5,6 Å, 4,2 Å e 3,2 Å de distâncias, respectivamente. Os resíduos Ala204, Gly121 e Gly122 fazem parte da cavidade oxianion. Em destaque, representação em formato de linhas e em laranja, os resíduos que fazem parte do subsítio aniônico envolvendo a região caudal da ACh.

Tabela 4: Média das distâncias de ligação da acetilcolina (ACh) na região esterásica da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rChE) na presença de ácido etilmalônico (EMA).

	acetil-C Ser203-O (Å)	acetil-O Gly121-N (Å)	acetil-O Gly122-N (Å)	acetil-O Ala204-N (Å)
rAChE	4,0	4,2	3,2	5,6
Kua et al. (2003)	3,78	2,92	3,0	3,66

Observou-se também que a ACh se liga corretamente ao subsítio aniônico de rAChE quando o EMA está previamente ligado a ela, pois a região caudal da ACh interage os resíduos triptofano 86 (Trp86), ácido glutâmico 202 (Glu202) e tirosina 337 (Tyr337) estabilizando o amônio quaternário (Figura 34 e Tabela 5).

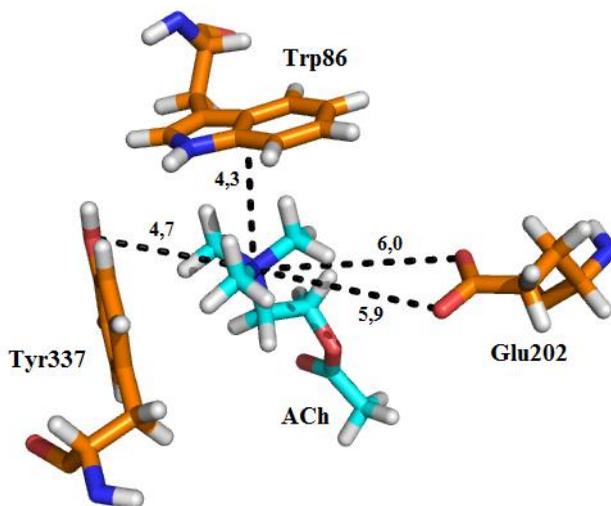


Figura 34: Orientação do grupo caudal da acetilcolina (ACh) com o subsítio aniônico da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE) previamente ligada ao ácido etilmalônico (EMA). ACh: acetilcolina; triptofano 86 (Trp86); tirosina 337 (Tyr337); ácido glutâmico 202 (Glu202). Detalhe da ligação de resíduos da AChE (em laranja) com o nitrogênio da ACh (em ciano). Detalhamento atômico intermolecular indicam as ligações de hidrogênio entre o nitrogênio da ACh com o oxigênio da Tyr337 (d_{N-O}^{337}), o anel do Trp86 (d_{N-anel}^{86}) e os oxigênios do Glu202 (d_{N-O1}^{202} e d_{N-O2}^{202}) a 4,7 Å, 4,3 Å, 6,0 Å e 5,9 Å de distâncias, respectivamente. O resíduo Tyr337 faz parte do PAS e os resíduos Trp86 e Glu202 fazem parte do subsítio aniônico.

Tabela 5: Média das distâncias de ligação da acetilcolina (ACh) no subsítio aniônico da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE) na presença de ácido etilmalônico (EMA).

	d_{N-anel}^{86}	d_{N-O}^{337}	$d_{N-O1}^{202 e}$	d_{N-O2}^{202}
rAChE	4,3	4,7	6,0	5,9
Kua et al. (2003)	4,5	5,13	5,13	3,82

Finalmente, observou-se duas ligações de hidrogênio formadas entre os resíduos fenilalanina 295 (Phe295) e arginina 296 (Arg296), com um oxigênio do EMA (Figura 35).

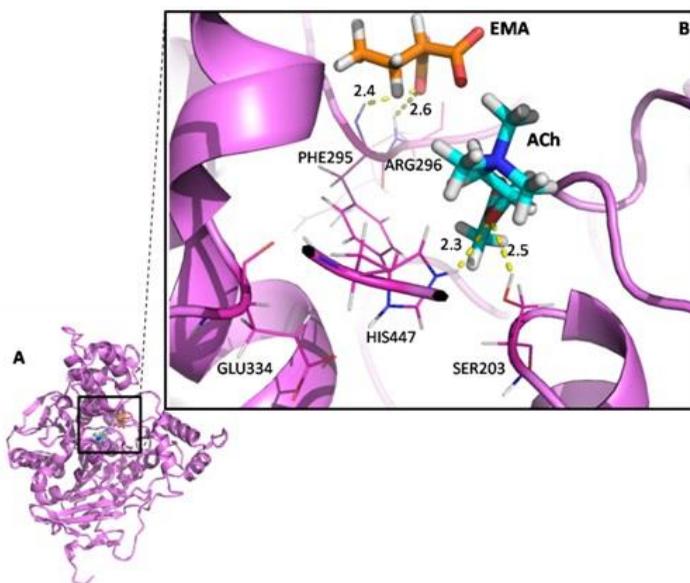


Figura 35: Modo de interação da acetilcolina (ACh) e do ácido etilmalônico (EMA) na estrutura da acetilcolinesterase de *Rattus norvegicus* (rAChE). ACh: acetilcolina (em ciano); EMA: ácido etilmalônico (em laranja). Em A) ACh e EMA dockados na região catalítica do modelo por homologia de rAChE. B) Detalhamento atômico intermolecular. Ligações de hidrogênio previstas entre EMA e os resíduos fenilalanina 295 (Phe295) e arginina 296 (Arg296) a 2,4 Å e 2,6 Å de distâncias, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

Deformações cerebrais evidenciadas por lesões simétricas e assimétricas, distribuídas na substância cinzenta, incluindo tronco cerebral, tálamo e estriado são geralmente encontradas em pacientes acometidos por SCADD e por EE (Grosso *et al.*, 2004; Mikati *et al.*, 2006). Investigou-se nesse estudo o córtex cerebral, pois sob o ponto de vista neuropatológico da primeira autópsia de um paciente que excretava altos níveis de EMA na urina demonstrou-se notórias modificações cerebrais majoritariamente no córtex cerebral, o qual possuía graves danos em suas regiões internas, sem estratificação normal e substituição desse tecido por grânulos levando à destruição total do mesmo (Jamroz *et al.*, 2011). Por consequência da má formação cerebral há ocorrência no atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e disfunções neurológicas que podem variar de grau moderado à grave (Tiranti *et al.*, 2004; Maldegem *et al.*, 2010). Apesar dos danos cerebrais e sequelas neurológicas serem comuns nesses pacientes, o mecanismo fisiopatológico responsável por esses sinais e sintomas ainda é pouco conhecido. Em vista disso, o presente trabalho contribui com o intuito de propor explicações para esse fato.

A importância do SNC em sustentar e modular os diferentes aspectos da atividade cerebral é notória, porém o sistema colinérgico exerce um papel fundamental durante o desenvolvimento cerebral (Abreu-Villaça *et al.*, 2011; Waarde *et al.*, 2011). Em se tratando de seus componentes, tem sido demonstrado que a enzima AChE atua na regulação do mesmo e que seu mau funcionamento afeta o desenvolvimento de estruturas cerebrais (Soreq e Seidman, 2001; Zirger *et al.*, 2003). Por isso, escolheu-se avaliar a atividade da AChE por ser responsável pela terminação da propagação do impulso nervoso e regulação dos níveis do principal neurotransmissor do sistema colinérgico, a ACh (Soreq e Seidman, 2001; Siegel e Sapul, 2006).

Sabe-se que algumas substâncias neurotóxicas causam alterações no correto funcionamento da atividade da AChE afetando assim a propagação do impulso nervoso e influenciando em estados patológicos, sendo a atividade dessa enzima muitas vezes utilizada como um biomarcador para contaminantes neurotóxicos (Forget *et al.*, 2003; Gaitonde *et al.*, 2006). Em EIMs, evidências experimentais em modelos animais sugerem que a atividade da AChE é alterada na presença de níveis elevados de metabólitos acumulados (Souza *et al.*, 2002; Zugno *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2012; Scaini *et al.*, 2012). Especificamente na SCADD e na EE, os dois EIMs estudados nesse trabalho, ainda não

encontramos na literatura dados sobre a atividade da AChE, tanto em humanos como em modelos animais.

Sabe-se que em pacientes acometidos por SCADD e EE há o aumento nos níveis de alguns metabólitos em comum como, por exemplo, butirilglicinas, isovalerilglicinas, AMS e EMA quando comparado com níveis normais (Burlina et al, 1994; Roe e Ding, 2001; Maldegem et al, 2010; Tiranti e Zeviani, 2013). Avaliou-se o efeito na atividade da AChE provocado pelo EMA pois, evidências sugerem que possivelmente esse seja o principal metabólito acumulado responsável pelo dano cerebral observado nessas doenças (Tein et al., 1999; Roe e Ding, 2001; Maldegem et al., 2010; Schuck *et al.*, 2015). Vale ressaltar que não podemos descartar a possibilidade de um efeito neurotóxico advindo daquelas outras substâncias e sendo assim, mais estudos deverão ser realizados para investigar essa hipótese. Contudo, sabe-se previamente que a concentração do EMA excretado nesses pacientes é a maior dentre os demais metabólitos, podendo atingir excreção urinária de $260 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de creatinina em pacientes acometidos por SCADD e de 45 a $730 \mu\text{mol mmol}^{-1}$ de creatinina em portadores de EE, quando o nível normal de EMA é aproximadamente $8 \mu\text{mol mmol}^{-1}$ de creatinina (Burlina *et al.*, 1994; Maldegem *et al.*, 2010). Mesmo tendo em vista que elevados níveis desse ácido estão associados ao aparecimento de sintomas neurológicos, sendo estes os mais prevalentes nesses pacientes, os níveis de EMA atingido no cérebro total de humanos, assim como em suas diferentes estruturas, permanecem desconhecidos.

Apesar de modelos animais não mimetizar perfeitamente a manifestação dessas doenças em humanos, pode-se verificar a influência exclusivamente do EMA na atividade da AChE, sem a contribuição dos outros metabólitos que se acumulam nos pacientes, pois os animais modelo utilizados possuíam a enzima SCAD funcionando normalmente. Utilizou-se o modelo animal quimicamente induzido pelo EMA, elaborado por Ferreira e colaboradores (2006), em que o córtex cerebral estava em plena maturação neuronal. Portanto, a escolha desse estágio de desenvolvimento do SNC garantiu que os resultados encontrados não sofreram interferência de picos de diferenciação, pois estes poderiam influenciar na atividade da AChE e nos níveis de RNAm como previamente relatado por Fuentes e Taylor (1993). Segundo o modelo utilizado nesse trabalho a concentração do EMA atingida no cérebro total é de 0,6 - $0,9 \mu\text{mol g}^{-1}$ ($\sim 0,6 - 0,9 \text{ mM}$), havendo quebra da barreira hematoencefálica. Porém, não há dados na literatura para realizar-se um estudo comparativo desse modelo, assim como não há dados de concentrações atingidas mais especificamente nas diferentes

estruturas como córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos.

Inicialmente nossos resultados *in vivo* evidenciaram que após a administração aguda do EMA, houve um aumento da atividade da AChE em córtex cerebral, e este aumento não está diretamente relacionado ao aumento da expressão do gene da *ache*. Uma das possíveis explicações para esse fato é a possibilidade de que a concentração de EMA atingida especificamente no córtex cerebral não tenha sido satisfatória. Sabe-se, por exemplo, que em ratos jovens a barreira hematoencefálica é menos permeável ao EMA quando comparado com neonatos. Em vista disso, não podemos descartar que a sua biodistribuição pode não ter sido suficiente a ponto de alterar a expressão de RNAm da AChE.

Tal resultado, aparentemente discrepante, pode também ser atribuído a vários fatores que regulam a expressão gênica, os quais envolvem a maquinaria celular e rotas de sinalização celular. Pode-se sugerir, que sob as condições do experimento realizado alguns mecanismos pós-transcricionais podem ter sido alterados como *splicing*, maturação, transporte e tradução, levando à degradação sem tempo suficiente para que a expressão fosse aumentada.

No CNS, o principal transcrito expresso é o RNAm sináptico (RNA-S), no entanto sob condições estressantes outros transcritos de RNAm como o *read-through* (RNA-R) podem aumentar (Adamec et al., 2008; Farchi et al., 2007). Dados de experimentos *in vitro* e *in vivo* em ratos demonstram a indução de estresse oxidativo provocado pelo EMA (Schuck et al., 2015). Além disso, estudos em fibroblastos de pacientes sugerem uma sensibilidade significativamente alta às espécies reativas de oxigênio (ERO) quando comparado a fibroblastos controle, incluindo expressão reduzida do antioxidante superóxido dismutase 2 (SOD2) (Pedersen et al 2010). Como os *primers* utilizados nesse trabalho englobaram apenas o éxon 2 (E2) da sequência do gene *ache*, que contém a tríade catalítica, não podemos descartar a possibilidade de ter ocorrido uma variação no nível de transcritos alternativos de mRNA (RNA-S e RNA-R) devido ao estresse oxidativo provocado pela administração do EMA.

A AChE pode existir em várias estruturas quaternárias (monoméricas, diméricas ou tetraméricas) e possui propriedades de se ligar à membrana (Meshorer e Soreq 2006; Nijholt et al, 2004). Vários grupos de pesquisa têm demonstrado atividades não-catalíticas para a AChE, ou seja, além de regular os níveis de ACh, a AChE também participa de uma diversidade de funções que não envolvem a catálise de ACh como adesão celular, crescimento neuronal e hematopoiese (Soreq e Seidman 2001; Silman e Sussman 2008; Paraoanu e Layer 2008). O

aumento da transcrição do RNA-R, leva ao aumento dos níveis da proteína AChE-R, podendo alterar o equilíbrio entre as formas solúveis e ligada à membrana (Sáez-Valero et al., 2003) e da mesma forma, a expressão aumentada de AChE-S pode produzir morfologias dendríticas aberrantes e fragmentação neuronal (Mutero et al., 1992; Sternfeld et al., 2000). Levando em consideração a possibilidade desse fato, variação da expressão dos transcritos alternativos, pode-se explicar em partes a desregulação do sistema colinérgico induzido pelo estresse oxidativo provocado pelo EMA. Assim, o não aumento dos níveis de RNAm podem ser explicados pela “preferência” pela célula em aumentar o nível de determinado transcrito em relação a outro e assim haveria constância nos níveis de RNAm detectados por RT-PCR, pois nos diferentes transcritos o E2 é constante. Assim, a quantificação dos diferentes transcritos de RNAm (RNA-S e RNA-R) em cérebro de ratos submetidos ao tratamento agudo de EMA irá elucidar com mais clareza essa hipótese.

Sabe-se que os níveis de expressão de RNAm para AChE no cérebro de ratos adultos variam conforme a estrutura, sendo o córtex cerebral aquele que possui menor quantidade de RNAm quando comparado com cerebelo, medula, estriado, pons e tálamo (Hammond et al., 1994). Porém, níveis baixos de RNAm não indicam que a atividade da AChE deva ser menor, visto que em pons há uma maior quantidade de RNAm mas a atividade da AChE é notavelmente maior no estriado, segundo Hammond e colaboradores (1994). Nossos resultados *in vivo* demonstraram que especificamente para o córtex cerebral a administração aguda de EMA não altera os níveis de expressão de RNAm da AChE e aumenta a atividade dessa enzima, o que sugere que o mecanismo pelo qual o EMA afeta tanto a expressão de RNAm quanto a atividade da AChE possa ser tecido-específica. Neste sentido, deve-se realizar a correlação dos níveis de EMA nas diferentes estruturas cerebrais do modelo utilizado com a expressão de RNAm e a atividade da AChE em diferentes estruturas cerebrais. Como foi dito acima, a produção de ERO pode perturbar o nível dos diferentes transcritos possíveis para o RNAm da AChE. Da mesma forma, as ERO presentes no córtex cerebral poderiam modular o *turnover* da AChE aumentando a eficiência catalítica da mesma.

O aumento da atividade da AChE sem ocorrer o concomitante aumento da expressão de RNAm em córtex cerebral também pode ser explicado, em partes, pelo aumento da quantidade de AChE nessa estrutura através de outros mecanismos que a célula possui. Pode-se citar, por exemplo, mudanças na distribuição das distintas isoformas de

AChE no cérebro, o que é comumente encontrado em estados neuropatológicos (Rakonczay, 1988; Talesa, 2001). Esse fato altera a transmissão sináptica, pois as isoformas tetraméricas (G4), diméricas (G2) e monoméricas (G1) diferem entre si com relação a parâmetros hidrodinâmicos, iônicos e/ou interações hidrofóbicas, com manutenção da atividade catalítica (Silman e Futerman, 1987; Grisaru, 1999; Zimmerman G et al., 2008). Dito isto, a quantificação das diferentes isoformas dessa enzima no córtex cerebral não deve ser descartada.

Os níveis de substrato, a ACh, também podem ter influenciado no aumento da atividade da AChE. Sabe-se que para a AChE o excesso de ACh provoca a diminuição da sua velocidade enzimática, sendo aumentada quando ocorre a diminuição de ACh (Aldridge et al., 1969; Reed et al., 2010). A enzima ChAT é responsável pela síntese da ACh a partir de acetil-coenzima A e colina e uma vez sintetizada, a ACh é transportada, armazenada em vesículas e liberada na fenda sináptica por exocitose facilitada pelo aumento da concentração de Ca^{2+} intraneuronal. Esse processo ocorre através de vários passos do qual participam várias proteínas e uma interferência nesses passos, como a inibição da atividade da ChAT, poderia acarretar em baixos níveis de ACh na fenda sináptica que poderiam explicar o aumento da catálise da AChE diminuindo ainda mais a quantidade de ACh nesse local e consequentemente diminuindo a eficácia da transmissão do impulso nervoso. Não podemos descartar também a possibilidade da atividade enzima BuChE, presente no modelo animal utilizado nesse estudo, estar aumentada e assim hidrolisar a ACh, diminuindo seus níveis. Portanto, deve-se levar em consideração a dosagem de BuChE afim de comparar seus níveis com os níveis de AChE.

Além da diminuição dos níveis de ACh com o aumento da atividade da AChE pelos mecanismos acima expostos, pode-se propor uma possível interferência do EMA em receptores colinérgicos (muscarínicos ou nicotínicos), tornado-os inativos. Nesse sentido pode-se sugerir, que o EMA seja um antagonista, impedindo que a ACh se ligue nos seus receptores e impedindo ou dificultando a transmissão elétrica. Além disso, os receptores colinérgicos estão envolvidos em processos de sobrevivência de neurônios, além da fisiologia e manutenção dos circuitos sinápticos neuronais (Quick e Lester, 2002), o que explicaria parcialmente os danos neurológicos encontrados em pacientes acometidos por SCADD e EE.

Sabe-se que algumas modificações pós-traducionais na proteína AChE podem ser transientes ou permanentes e não influenciam na atividade catalítica, mas sim na sua estabilidade e enovelamento, como

exemplo, troca do peptídeo C-terminal por glicolípídeos, dimerização por ponte de dissulfeto, glicosilação *N-linked* em sítios Asn-X-Ser/Thr (onde X pode ser qualquer aminoácido exceto prolina) e formação de subunidades por clivagem proteolítica (Estrada-Mondaca et al., 1998; Nalivaeva e Turner 2001). Contudo, modificações covalentes via fosforilação de importantes resíduos da enzima por cinases como proteína cinase A (PKA; cinase dependente de monofosfato de adenosina cíclico - AMPc) e proteína cinase C (PKC), causam um aumento na afinidade enzima-substrato influenciando assim no aumento da atividade da AChE (Grifman et al., 1997). Portanto, podemos sugerir que a administração aguda de EMA facilita a fosforilação da AChE e assim poderíamos explicar o aumento da atividade dessa enzima.

Uma possível explicação para a indução da fosforilação pode ser o fato de que o EMA é uma molécula de caráter extremamente ácido, ou seja, quando diluído em água é capaz de diminuir o pH do meio drasticamente. A diminuição do pH provocado pelo EMA pode ter sido tão drástica que a célula não tenha conseguido reestabelecer o equilíbrio ácido-base e esse aumento da concentração de H^+ pode ter contribuído com o aumento da taxa de fosforilação da AChE, assim como já foi observado por Yahuaca et al (2000) em que a fosforilação da proteína connexin43 ocorre de forma pH-dependente. Neste sentido, a análise utilizando-se um programa específico para predição de possíveis sítios de fosforilação (Blom et al., 1999) desta enzima indica 26 resíduos como sítios de fosforilação por PKA, todos pertencentes à estrutura de rAChE. A fosforilação dos resíduos detectados podem alterar a conformação da AChE e portanto modular positivamente a sua atividade.

Como nossos resultados *in vivo* relatam um efeito independente de expressão gênica, o próximo passo foi avaliar o efeito *in vitro* do EMA sobre a atividade da AChE, para identificar se o aumento da atividade desta enzima se dá por mecanismo direto ou indireto. As concentrações de EMA nos experimentos *in vitro* foram de 0,5, 1,0 ou 2,5 mM, e apesar de não haver dados na literatura que correlacione esses valores em humanos, optou-se por utilizar altas concentrações de EMA a nível mM com o intuito de mimetizar ao máximo o estado das doenças SCADD e EE em pacientes. Da mesma forma que os experimentos *in vivo*, altas concentrações de EMA (2,5 mM) também induziram um aumento *in vitro* da atividade da AChE. A escolha da temperatura de 37° C e o intervalo de tempo de 60 minutos de incubação podem ter influenciado no *turnover* da AChE, aumentando a eficiência catalítica da mesma apenas para concentrações de 2,5 mM de EMA. Porém, mesmo

sendo um experimento *in vitro* pode ter ocorrido uma interferência biológica desconhecida, e por isso não podemos descartar a possibilidade do aumento gradual da atividade da AChE com o aumento da concentração de EMA. Muitos trabalhos relatam a possibilidade de moléculas, como atropina, e outros sais quaternários de amônio, acelerarem a taxa de hidrólise de acetilcolina quando sua concentração está acima da saturação da enzima (Kato et al., 1972; Suszkiw et al., 1973). Portanto, faz-se necessário realizar um experimento de cinética enzimática com excesso de ACh e com a AChE purificada, sem conteúdo biológico, variando a concentração de EMA em uma faixa mais abrangente.

Considerando que o aumento da atividade de AChE *in vitro* foi observado sob condições enzimáticas ótimas (pH, concentração de substrato, composição do meio de reação), pode-se especular que o EMA atua como um modulador para a atividade dessa enzima, ou seja, possíveis modificações alostéricas influenciam a atividade catalítica da AChE. Portanto, a ação do EMA sobre a AChE pode ocorrer de forma direta e essa enzima provavelmente sofre mudanças conformacionais não-covalentes, ou seja, a afinidade da ligação enzima-substrato pode ter sido modificada pela ligação do EMA em sítios regulatórios específicos da estrutura tridimensional proteica. Nesse caso, sugerimos a hipótese de que o EMA seja um efector positivo da AChE.

Para avaliar se a ativação da AChE observada em córtex cerebral pode ser atribuída a possíveis modulações pelo EMA na dinâmica estrutural de rAChE através de um efeito direto, investigou-se pela primeira vez como o EMA possivelmente interage com a enzima AChE utilizando-se ferramentas de bioinformática estrutural. Estudos estruturais e dinâmicos relacionados à AChE foram realizados por diferentes grupos através de simulações computacionais. Esses experimentos *in silico* incluem métodos como modelagem por homologia, docagem molecular e dinâmica molecular (Tai, 2001; Shen et al., 2002; Lushington et al., 2006; Nazam et al., 2014), e foram realizados especialmente após a primeira determinação da estrutura cristalográfica de AChE em 1991, obtida do organismo *Torpedo californica* (PDB ID: 1ACE) (Sussman et al., 1991). A importância do conhecimento de interações moleculares da AChE com inibidores é bastante conhecida (Millard et al., 1999; Greenblatt et al., 1999), pois diversas doenças neurológicas levam à diminuição das concentrações de ACh na fenda sináptica devido à maior atividade de AChE, como observado em pacientes com DA (Terry et al., 2003). Dessa forma, a inibição da atividade da AChE é considerada o principal objetivo no

desenvolvimento de drogas para tratar essa doença (Sussman et al., 1993; Khan, 2009; Berg et al., 2011).

A validação do modelo por homologia obtido de rAChE demonstrou que apenas os resíduos serina 497 (Ser47) e lisina 496 (Lys496) estavam fora de regiões permitidas e/ou favoráveis no gráfico de Ramachandran. Avaliando-se a localização desses resíduos no modelo, observou-se que se tratam de resíduos pertencentes a regiões não estruturantes da rAChE (*loops*) e que estão na superfície da mesma. Portanto, acredita-se que a não adequação desses resíduos no modelo não influenciam na análise de interações atômicas entre a rAChE e os ligantes estudados neste trabalho (EMA e ACh).

Os resultados de docagem molecular da ACh na rAChE no presente estudo, tanto na ausência do EMA como previamente ligada a este ácido orgânico, demonstrou as mesmas orientações de alguns resíduos importantes que definem a correta orientação da ACh no sítio ativo da rAChE (Ser203, Ala204, Gly121 e Gly122). Também foi observado que os resíduos Glu202 e Tyr337 envolvem a cauda quaternária da ACh em distâncias opostas um em relação ao outro no espaço, e o Trp86 permanece acima do grupo acetil da ACh. Esses dados juntamente com os resultados da validação do modelo por homologia expostos acima, confirmam a possibilidade do mesmo ser utilizado para elucidação dos resultados encontrados de atividade aumentada da AChE nos experimentos *in vivo* e *in vitro*.

De acordo com esses resultados, a conformação de energia livre mais estável demonstra que o EMA é estabilizado por ligações de hidrogênio entre dois resíduos: Phe295 (pertencente ao sítio de ligação acil) e Arg296. Sabe-se que mutações da Phe295 para leucina 295 (Leu295) na rAChE resultam em um aumento da sensibilidade desta enzima frente a organofosfatos e da capacidade de hidrolizar butirilcolina (o que normalmente não é realizado pela AChE selvagem, apenas pela BuAChE) (Harel et al., 1995, Pleiss et al., 1999). Portanto, a ligação do EMA especificamente na Phe295 pode estar relacionado à alteração do padrão de especificidade dessa enzima, aumentando a sua atividade não-natural de substratos como butirilcolina.

Estudos realizados por diferentes grupos de pesquisa levaram à caracterização de diferentes subsítios, além do sítio ativo da AChE (Houghton et al., 2006; Silman et al., 2008), que incluem resumidamente:

(i) o **CAS**, local aniônico catalítico, contém o sítio catalítico e é composto por até 14 resíduos aromáticos conservados (Silman e Sussman, 2008).

(ii) o **PAS**, local aniônico periférico, é a região de ligação inicial de moléculas e se encontra distante do sítio catalítico, ou seja, está no início da cavidade de entrada da ACh (Bourne et al 1995).

(iii) o **sítio de ligação acil** localizado na base da cavidade, que se acredita estar relacionado à limitação das dimensões do substrato que estará apto a entrar no sítio ativo (Kua et al., 2002).

(iv) o **subsítio aniônico** que é representado por resíduos aromáticos e que se acredita ligar a amônia quaternária por interações π -cátion (Kua et al., 2003).

Evidências recentes de função não-catalítica da AChE tem sugerido que o PAS, além do seu papel na regulação alostérica da hidrólise catalítica de ACh pela AChE, também participa da associação de proteínas heterólogas que contribuem ao reconhecimento celular e processos de adesão durante a sinaptogênese, e na nucleação de peptídios amilóides na DA. Portanto, estruturas comparativas da região PAS da AChE, sem ligantes ou associada a ligantes pequenos e específicos à essa região, se torna essencial para prever não só os determinantes que definem os mecanismos moleculares de acoplamento que modulam a catálise alostericamente, mas também no envolvimento de funções não-catalíticas de reconhecimento heterólogo (Bourne et al., 2003). Rosenberry e colaboradores (2005) demonstraram que o PAS envolve o substrato ACh, aumentando assim a probabilidade de que ele continue em seu caminho para o CAS. Os mesmos autores também forneceram evidências de um efeito alostérico do substrato ligado ao PAS na etapa de acilação (Johnson et al., 2005). A interação de ligantes no PAS da AChE frequentemente provoca mudanças conformacionais no seu sítio ativo, e essas interações podem ser a chave para a modulação alostérica da atividade catalítica da AChE (Patočka et al. 2005; Gonçalves, 2009). Nos nossos resultados, o EMA posicionou-se entre os resíduos do PAS (Tyr341 e Trp286) e, portanto pode-se sugerir que o EMA tem influência direta no PAS e com isso explicaríamos o aumento da atividade da AChE observada nos experimentos *in vivo* e *in vitro* através de um mecanismo de alosteria.

Baseado em estudos de modelagem molecular com o Trp86, Ordentlich et al. (1995) revelou uma forma funcional (sem obstruir o subsítio aniônico) e uma não-funcional (obstruindo o subsítio aniônico) como uma explicação para a atividade reduzida da AChE. Enfatizamos que esse dado é mais um exemplo de que a atividade da AChE pode ser modulada devido às mudanças conformacionais provocadas na estrutura tridimensional da proteína, expondo ou obstruindo o seu sítio catalítico, fato que pode ter acontecido nos experimentos *in vivo* e *in vitro* devido à

influência do EMA diretamente no PAS da rAChE.

Movimentos nas alças móveis (Omega *loops* - Ω -*loops*) da AChE que abrangem da cisteína 69 à 96 (Cys69-Cys96) induzem mudanças conformacionais no Trp86 e são moduladas pela ocupação do PAS (Barak et al 1995; Velan et al 1996). Os Ω -*loops* são estruturas secundárias irregulares encontradas em proteínas globulares e caracterizadas por uma cadeia polipeptídica que segue um formato de alça no espaço tridimensional, sendo importantes na função e estabilização de proteínas (Fetrow, 1995). Os Ω -*loops* tem sido validados por estudos cinéticos enzimáticos como parte chave na ligação da ACh ao sítio catalítico da AChE (Velan et al., 1996). O movimento de resíduos adicionais também foi postulado como sendo de importância fundamental para essa ligação (Millard et al., 1999). Em outro estudo realizado por Gilson et al. (1994), houve a confirmação da existência de aberturas chamadas “*back doors*”, por onde são expelidos os produtos da catálise (Sanson et al., 2011). Não podemos descartar a hipótese dos Ω -*loops* presentes na estrutura da rAChE exercerem um papel importante que explicaria o aumento da sua atividade na presença do EMA em sua estrutura.

Portanto, considerando-se que o sítio de ligação acil e o PAS interagem com o EMA, e que essas são regiões importantes para a alteração da atividade catalítica da AChE, demonstramos que possíveis modulações alostéricas podem ocorrer, particularmente movimentações no resíduo Trp86 e/ou através de modificações na dinâmica do Ω -loop. Como perspectivas futuras deve-se avaliar a flutuação desses resíduos e/ou regiões importantes, para corroborar nossa hipótese, através de experimentos *in silico* como a DM.

Obteve-se o valor de energia de ligação da ACh na AChE na ausência (apo-AChE) ou na presença do EMA (halo-AChE). Um trabalho prévio publicado por Bennion e colaboradores (2013) encontraram o resultado de energia de ligação da ACh na apo-AChE no valor de $-6,12 \text{ kcal mol}^{-1}$ para rAChE, e no presente trabalho foi observado o valor de $-5,0 \text{ kcal mol}^{-1}$. Os mesmos autores também realizaram modelagem comparativa para construção da estrutura de rAChE, mas utilizaram uma estrutura cristalográfica de *Mus musculus* como molde (PDB ID: 1N5M) de 2.2 \AA de resolução em que há vários resíduos ausentes (Gly260, Gly261, Gly262, Gly263 na cadeia A e Glu1, Gly2, Arg3, Pro259, Gly260, Gly261, Ala262, Gly263, Gly264 e Ser541 da cadeia B). No entanto, não foi esclarecido como estes autores superaram esta dificuldade para a construção da estrutura da rAChE.

No intuito de evitar tais dificuldades, no presente trabalho foi

utilizado o molde de duas estruturas cristalográficas de *Mus musculus*: PDB ID: 4B82 (resolução de 2,10 Å e 13 resíduos da cadeia A faltantes Pro258, Pro259, Gly260, Gly261, Ala262, Gly263, Gly264, Thr543, Ala544, Thr545, Glu546, Ala547 e Pro548) e PDB ID: 4BC0 (resolução de 3,35 Å e apenas o Glu1 da cadeia A). Portanto, as diferenças entre os valores observados por Bennion e colaboradores (2013) e os observados no presente trabalho podem ser explicadas pela possível distinta estrutura inicial modelada por homologia, inclusive de sua minimização de energia antes da docagem, assim como possivelmente por eventuais parâmetros diferentes utilizados para a simulação de docagem, incluindo o tamanho da caixa utilizado. Vale ressaltar que essas diferenças não devem interferir no presente estudo porque o protocolo experimental utilizado foi desenvolvido com o objetivo de comparar o ΔG_1 (docagem da ACh na rAChE) e ΔG_2 (docagem da ACh com o EMA presente na estrutura da rAChE).

A estratégia utilizada em nossos experimentos *in silico* é importante, visto que na literatura observam-se outros trabalhos em que há o interesse no estudo de docagem de ligantes em um receptor que já possui outro ligante (Kua et al., 2002) ou, mesmo, diversos ligantes (Dos Santos et al., 2015). Essa modalidade de docagem é chamada de docagem de ligantes múltiplos simultâneos (do inglês, MLSD - *multiple ligand simultaneous docking*), em que múltiplos ligantes afetam o modo de ligação e conseqüentemente a energia livre de uma reação por um processo de sinergismo de um em relação ao outro. Encontrou-se um valor mais negativo (- 5,2 kcal mol⁻¹) para o ΔG_2 quando comparado com o valor de ΔG_1 (- 5,0 kcal/mol). Portanto, a partir dos dados obtidos nas simulações computacionais, pode-se sugerir que a presença do EMA aumenta a afinidade da ACh pela rAChE e pode ser uma possível explicação para o aumento da catálise enzimática nos experimentos *in vivo* e *in vitro* em córtex cerebral de ratos.

A pouca diferença na comparação dos dois valores ($\Delta G_2 - \Delta G_1 = 0,2$ kcal mol⁻¹) pode ser explicado pelo fato de realizar-se a docagem de ACh na estrutura de rAChE complexada com EMA, sem ter sido realizado uma minimização de energia por DM por exemplo, assim como também pelo fato de utilizar-se a estratégia de docagem que altera o parâmetro da *grid* para um valor maior, visto que essa é a primeira vez que se faz uma tentativa de busca do modo de ligação do EMA na rAChE. Assim, como um próximo passo pode-se realizar a docagem do EMA utilizando uma *grid* menor, ou ainda, submeter o complexo EMA-rAChE a um processo de minimização de energia por DM, e com isso obter uma maior diferença entre os valores de energia de ligação de

interesse que comprove ainda mais a hipótese de maior afinidade da ACh pela rAChE quanto esta contém o EMA na sua estrutura.

Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a exposição a elevadas concentrações de EMA aumenta a atividade da AChE em córtex cerebral de ratos de maneira independente da expressão gênica, em um possível efeito direto como modulador alostérico não-clássico desta enzima. Considerando que o aumento da atividade da AChE pode estar relacionada a um progressivo dano neurológico (Beeri et al., 1995; García-Ayllón et al., 2008), pode-se presumir que um desequilíbrio do sistema colinérgico pode estar envolvido na fisiopatologia das alterações neurológicas observadas em pacientes afetados por SCADD e EE.

No entanto, diversos parâmetros ainda devem ser investigados antes de se propor moduladores da neurotransmissão colinérgica como alternativa terapêutica para estes pacientes, incluindo a investigação dos efeitos do EMA sobre os mecanismos envolvidos no controle dos níveis de acetilcolina na fenda sináptica (síntese, liberação, degradação e recaptação deste neurotransmissor), bem como sobre a quantidade, distribuição e funcionalidade dos diferentes tipos de receptores colinérgicos. Caso estas alterações sejam confirmadas, pode-se sugerir o desenvolvimento de uma molécula que diminua a atividade da AChE pela inibição competitiva com o EMA e isso pode contribuir com o aumento de níveis de ACh na fenda sináptica e consequentemente melhorar as funções cognitivas, como o aprendizado e a memória.

O primeiro inibidor especificamente aprovado para AChE foi o 1,2,3,4-tetrahidro-9-aminocridina (tacrina), introduzido no mercado em 1993 para o combate à DA. O estudo de várias plantas medicinais que atuam inibindo a AChE, inclusive exercendo propriedades antioxidantes e antimicrobianas, possibilitou descobrir e desenvolver algumas moléculas que são hoje em dia autorizadas para o tratamento da DA (Dvir H et al., 2002; Adewusi et al., 2010; Pendota SC et al., 2013; Sadashiva et al., 2014). Portanto, neste contexto, pode-se sugerir a investigação inicial de moléculas como a fisostigmina, a huperzina-A, o donezepil, a rivastigmina e a galantamina, que são reconhecidamente inibidores da AChE, como possíveis propostas terapêuticas em pacientes acometidos por SCADD e EE. Com isso, o desenvolvimento racional alvo-específico com o intuito de reativar o correto funcionamento da atividade catalítica da AChE, baseado na sua estrutura, possivelmente minimizará ou eliminará os danos neurológicos observados.

6 CONCLUSÕES

Diante dos objetivos iniciais da tese, chegou-se às seguintes conclusões:

- A administração aguda de EMA aumenta a atividade da AChE em córtex cerebral de ratos jovens;
- A administração aguda de EMA não altera a expressão da enzima AChE em córtex cerebral de ratos jovens;
- O EMA *in vitro* aumenta a atividade da AChE em córtex cerebral de ratos jovens;
- A interação entre EMA e AChE no local de ligação acil sugere um possível efeito alostérico na modulação positiva da atividade dessa enzima provocado por um mecanismo de rearranjo conformacional da estrutura proteica induzido pelo EMA;
- A presença do EMA aumenta a afinidade da AChE pela ACh.

7 PERSPECTIVAS

A continuidade deste trabalho, confirmando os resultados apresentados e expandindo-os, pode abordar os seguintes aspectos:

- Verificar a possível modificação na atividade da AChE de outros metabólitos acumulados nos pacientes acometidos por SCADD e EE como butirilglicinas, isovalerilglicinas e MAS;

- Quantificar as concentrações atingidas de EMA em diferentes estruturas cerebrais de ratos jovens submetidos à administração aguda de EMA;

- Quantificar os diferentes transcritos de RNAm (RNA-S e RNA-R) em córtex cerebral de ratos submetidos ao tratamento agudo de EMA;

- Comparar a expressão de RNAm em diferentes estruturas cerebrais;

- Comparar a atividade da AChE em diferentes estruturas cerebrais;

- Testar compostos que possam inibir o estresse oxidativo e reverter a atividade normal da AChE em cérebro de ratos submetidos ao tratamento agudo de EMA;

- Quantificar as diferentes isoformas tetraméricas (G4), diméricas (G2) e monoméricas (G1) de AChE em córtex cerebral de ratos submetidos ao tratamento agudo de EMA;

- Medir a atividade enzimática da ChAT em córtex cerebral de ratos submetidos ao tratamento agudo de EMA;

- Quantificar os níveis de BuChE afim de comparação com os níveis de AChE;

- Avaliar os níveis de fosforilação da PKA em córtex cerebral de ratos submetidos à administração aguda de EMA;

- Verificar se os níveis de fosforilação da PKA na presença de EMA ocorre de forma pH-dependente;

- Padronizar experimentos de cinética enzimática com excesso de ACh e com a AChE purificada, variando a concentração de EMA;

- Investigar a estabilidade da ligação de EMA encontrada nos experimentos de docagem molecular através de dinâmica molecular;

- Avaliar a flutuação de resíduos e/ou regiões reconhecidamente importantes que influenciam na modulação da atividade da AChE através de experimentos de dinâmica molecular;

- Comparar a variação do comprimento de ligações importantes do subsítio aniônico que poderiam indicar um aumento da afinidade da ACh pela AChE em experimentos de dinâmica molecular da ACh docada na rAChE na ausência (apo-AChE) e presença de EMA (halo-AChE), sendo elas: o nitrogênio da ACh com o oxigênio da Tyr337 (d_{N-O}^{337}), o anel do Trp86 (d_{N-anel}^{86}) e os oxigênios do Glu202 (d_{N-O1}^{202} e d_{N-O2}^{202}) em experimentos de dinâmica molecular da ACh docada na rAChE na ausência e presença de EMA;

- Comparar a variação do comprimento de ligações importantes da cavidade oxianion da AChE que poderiam indicar um aumento da afinidade da ACh pela AChE em experimentos de dinâmica molecular da ACh docada na rAChE na ausência (apo-AChE) e presença de EMA (halo-AChE), sendo elas: o carbono da carbolina da ACh e o oxigênio da Ser203 (d_{C-O}), do nitrogênio da Ala204 e oxigênio da carbonila da ACh (d_{N-O}^1), do nitrogênio da Gly121 e oxigênio da carbonila da ACh (d_{N-O}^2), do nitrogênio da Gly122 e oxigênio da carbonila da ACh (d_{N-O}^3);

- Propor, através de triagem virtual, possíveis ligantes que possam diminuir a atividade da AChE e testá-los em ensaios de docagem molecular e dinâmica molecular.

REFERÊNCIAS

- Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Manhães AC. Developmental aspects of the cholinergic system. *Behavioural Brain Research*. 2011; 202(2):367-78.
- Alles GA, Hawes RC. Cholinesterases in the blood of man. *Journal of Biological Chemistry*. 1940; 133(2):375-90.
- Adamec R, Head D, Soreq H, Blundell J. The role of the read through variant of acetylcholinesterase in anxiogenic effects of predator stress in mice. *Behavioural Brain Research*. 2008; 189(1):180-90.
- Adewusi EA, Moodley N, Steenkamp V. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *South African Journal of Botany*. 2011; 77(3):638-44.
- Aldridge WN, Reiner E. Acetylcholinesterase: two types of inhibition by an organophosphorus compound: one the formation of phosphorylated enzyme and the other analogous to inhibition by substrate. *Biochemistry Journal*. 1969; 115:147-62.
- Amaral AUA, Cecatto C, Busanello ENB, Ribeiro CAJ, Melo DR, Leipnitz G, Castilho RF, Wajner M. Ethylmalonic acid impairs brain mitochondrial succinate and malate transport. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2011; 105(1):84-90.
- Amendt BA, Greene C, Sweetman L, Cloherty J, Shih V, Moon A, Teel L, Rhead WJ. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Clinical Investigation*. 1987; 79(5):1303-9.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 2006; 22(2):195-201.
- Bachman ES, Berger-Sweeney J, Coyle JT, Hohmann CF. Developmental regulation of adult cortical morphology and behavior: an animal model for mental retardation. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 1994; 12(4):239-53.
- Barak D, Ordentlich A, Bromberg A, Kronman C, Marcus D, Lazar A,

Ariel N. Allosteric Modulation of Acetylcholinesterase Activity by Peripheral Ligands involves a conformational transition of the anionic subsite. *Biochemistry*. 1995; 34(47):15444-52.

Barth M, Ottolenghi C, Hubert L, Chrétien D, Serre V, Gobin S, Romano S, Vassault A, Sefiani A, Ricquier D, Boddaert N, Brivet M, Keyzer Y, Munnich A, Duran M, Rabier D, Valayannopoulos V, Lonlay P. Multiple sources of metabolic disturbance in ETHE1-related ethylmalonic encephalopathy. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2010; 33(Suppl 3):S443-S453.

Bartolucci C, Haller LA, Jordis U, Fels G, Lamba D. Probing Torpedo californica acetylcholinesterase catalytic gorge with two novel bis-functional galanthamine derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; 53(2):745-51.

Beeri R, Andres C, Lev-Lehman E, Timberg R, Huberman T, Shani M, Soreg H. Transgenic expression of human acetylcholinesterase induces progressive cognitive deterioration in mice. *Current Biology*. 1995; 5(9):1063-71.

Bennett MJ, Rinado P, Staruss AW. Inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2000; 37(1):1-44.

Bennion BJ, Lau EY, Fattebert J, Huang P, Schwegler E, Corning W, Lightstone FC. Modeling the binding of CWAs to AChE and BuChE. *Military Medical Science Letters*. 2013; 82(3):102-14. 2013.

Berg L, Andersson CD, Artursson E, Hörnberg A, Tunemalm A, Linusson A, Ekström F. Targeting acetylcholinesterase: identification of chemical leads by high throughput screening, structure determination and molecular modeling. *Plos One*. 2011; 6(11):e26039.

Bhala A, Willi SM, Rinaldo P, Bennett MJ, Schmidt-Sommerfeld E, Hale DE. Clinical and biochemical characterization of short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *The Journal of Pediatrics*. 1995; 126(6):910-15.

Bishop AOT, de Beer TAP, Joubert F. Protein homology modeling and its use in South Africa. *South Africa Journal of Science*. 2008; 104:2-6.

- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*. 1999; 294(5):1351-62.
- Bourne Y, Taylor P, Radić Z, Marchot P. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *The EMBO Journal*. 2003; 22(1):1-12.
- Braun V, Günther H, Neuss B, Tautz C. Hemolytic activity of *Serratia marcescens*. *Archives of Microbiology*. 1985; 141(4):371-6.
- Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL. *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*. 8^a ed. Elsevier; 2012.
- Brimijoin S. Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. *Progress in Neurobiology*. 1983; 21(4):291-322.
- Burlina AB, Dionisi-Vici C, Bennett MJ, Gibson KM, Servidei S, Bertini E, Hale DE, Schmidt-Sommerfeld E, Sabetta G, Zacchello F, et al. A new syndrome with ethylmalonic aciduria and normal fatty acid oxidation in fibroblasts. *Journal of Pediatrics*. 1994; 124(1):79-86.
- Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annual Review of Genomics Human Genetics*. 2002; 3:17-45.
- Chaves-Carballoe. Detection of inherited neurometabolic disorders. *Pediatric Clinics of North America*. 1992; 39(4):801-20.
- Coates PM, Hale DE, Finocchiaro G, Tanaka K, Winter SC. Genetic deficiency of short-chain acyl-CoA dehydrogenase in cultured fibroblast from a patient with muscle carnitine deficiency and severe skeletal muscle weakness. *Journal of Clinical Investigation*. 1988; 81(1):171-75.
- Cohen NC, Blaney JM, Humblet C, Gund P, Barry DC. Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1990; 33(3):883-94.

Corydon MJ, Gregersen N, Lehnert W, Ribes A, Rinaldo P, Kmoch S, Christensen E, Kristensen TJ, Andresen BS, Bross P, Winter V, Martinez G, Neve S, Jensen TG, Bolund L, Kolvraa S. Ethylmalonic aciduria is associated with an aminoacid variant of short chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *Pediatric Research*. 1996; 39(6):1059-66.

Corydon MJ, Vockley J, Rinaldo P, Rhead WJ, Kjeldsen M, Winter V, Riggs C, Babovic-Vuksanovic D, Smeitink J, de Jong J, Levy H, Sewell AC, Roe C, Matern D, Dasouki M, Gregersen N. Role of common gene variation in the molecular pathogenesis of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatric Research*. 2001; 49(1):18-23.

Da Silva RS, Richetti SK, da Silveira VG, Battastini AM, Bogo MR, Lara DR, Bonan CD Maternal caffeine intake affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. *International Journal of Dev Neuroscience*. 2008; 26:339–343.

Dawson DB, Waber L, Hale DE et al. Transient organic aciduria and lacticacidemia in a patient with short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Journal of Pediatrics*. 1995; 126(1):69-71.

Dori, A., Cohen, J., Silverman, W. F., Pollack, Y., and Soreq, H. Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development. *Cerebral Cortex*. 2005; 15(4):419–30.

Dos Santos ES, de Souza LCV, de Assis PN, de Almeida PF, Ramos-de-Souza. Souring control in fluid samples of oil industry using a multiple ligand simultaneous docking (MLSD) strategy. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2015; 33(6):1176-84.

Drousiotou A, DiMeo I, Minerì R, Georgiou T, Stylianidou G, Tiranti V. Ethylmalonic encephalopathy: applications of improved biochemical and molecular diagnostic approaches. *Clinical Genetics*. 2011; 79(4):385-90.

Dvir H, Jiang HL, Wong DM, Harel M, Chetrit M, He XC, Jin GY, Yu GL, Tang XC, Silman I, Bai DL, Sussman JL. X-ray structures of *Torpedo californica* acetylcholinesterase complexed with (+)-huperzine A and (-)-huperzine B: structural evidence for an active site rearrangement. *Biochemistry*. 2002; 41:10810-8.

Ellman GI, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961; 7(2):88-95.

Estrada-Mondaca S, Lougarre A, Fournier D. *Drosophila* acetylcholinesterase: effect of post-translational modifications on the production in the baculovirus system and substrate metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 1998; 38:84-90.

Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan M, Eramian D, Shen MY, Pieper U, Sali A. Comparative protein structure modeling using Modeller. 2007; *Curr Protocols in Protein Science*. Chapter 2:Unit 2.9.

Farchi N, Shoham S, Hochner B, Soreq H. Impaired hippocampal plasticity and errors in cognitive performance in mice with maladaptive AChE splice site selection. *European Journal of Neuroscience*. 2007; 25(1):87-98.

Feng X, Wang X, L Youping and Di X. Linarin Inhibits the Acetylcholinesterase Activity In-vitro and Ex-vivo. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2015; 14(3):949-954.

Ferreira GK, André KR, Schuck PF, Viegas CM, Tonin A, Coelho DM, Wyse ATS, Wannmacher CMD, Vargas CR, Wajner M. Effect of In vivo administration of ethylmalonic acid on energy metabolism in rat tissues. *Metabolic Brain Disease*. 2006; 21(1):29-39.

Ferreira, GK; Carvalho-Silva, M; Gonçalves, CL; Vieira, JS; Scaini, G; Ghedim, FV; Deroza, PF; Zugno, AI; Pereira, TCB; Oliveira, GMT; Kist, LW; Bogo, MR; Schuck, PF; Ferreira, GC; Streck, EL. L-Tyrosine administration increases acetylcholinesterase activity in rats. *Neurochemistry International*. 2012; 61:1370-4.

Fetrow JS. Omega loops: nonregular secondary structures significant in protein function and stability. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995; 9(9):708-17.

Filho OAS, Alencastro RB. Modelagem de proteínas por homologia. *Química Nova*. 2003; 26(2):253-9.

Forget J, Beliaeff B, Bocquené G. Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicomis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology*. 2003; 62(3):195-204.

Fuentes ME e Taylor P. Controlo f acetylcholinesterase gene expression during myogenesis. *Neuron*. 1993; 10:679-87.

Gaitonde D, Sarkar A, Kaisary S, Silva CD, Dias C, Rao DP, Ray D, Nagarajan R, De Sousa SN, Sarker S, Patill D. Acetylcholinesterase activities in marine snail (*Cronia contracta*) as a biomarker of neurotoxic contaminants along the Goa coast, West coast of India. *Ecotoxicology*. 2006; 15(4):353-8.

Garcia-Silva MT, Ribes A, Campos Y, Garavaglia B, Arenas J. Syndrome of encephalopathy, petechiae, and ethylmalonic aciduria. *Pediatric Neurology*. 1997; 17(2):165-70.

García-Ayllón MS, Cauli O, Silveyra MX, Rodrigo R, Candela A, Compan A, Jover R, Pérez-Mateo M, Martínez S, Felipe V. 2008; Brain cholinergic impairment in liver failure. *Brain*. 2008; 131(Pt 11): 2946-56.

Gilson MK, Straatsma TP, McCammon JA, Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL. Open “Back Door” in a Molecular Dynamics Simulation of Acetylcholinesterase. *Science*. 1994; 264(4):1276-8.

Goldsmith-Fischman S., Honig G. Structural genomics: Computational methods for structure analysis. *Protein Science*. 2003; 12(9):1813–1821

Gonçalves AS. Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo organofosforado tabun através de métodos híbridos clássicos quanto-mecânicos [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2009.

Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology*. 2004; 74(6):363-96.

Greenblatt HM, Kryger G, Lewis T, Silman I, Sussman JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å

- resolution. The Federation of European Biochemical Societies Letters. 1999; 463(3):321-6.
- Greenfield S. Acetylcholinesterase may have novel functions in the brain. Trends in Neuroscience. 1984; 7(10):364-368.
- Gregersen N, Andresen BS, Pedersen CB, Olsen RK, Corydon TJ, Bross P. Mitochondrial fatty acid oxidation defects-remaining challenges. Journal of Inherited Metabolic Disease. 2008; 31(5):643-57.
- Grifman M, Arbel A, Ginzberg D, Glick D, Elgavish S, Shaanan B, Soreq H. In vitro phosphorylation of acetylcholinesterase at non-consensus protein kinase A sites enhances the rate of acetylcholine hydrolysis. Molecular Brain Research. 1997; 51(1-2):179-87.
- Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. European Journal of Biochemistry. 1999; 264:672-86.
- Grosso S, Mostardini R, Farnetani MA, Molinelli M, Berardi R, Dionisi-Vici C, Rizzo C, Morgese G, Balestri P. Ethylmalonic encephalopathy: further clinical and neuroradiological characterization. Journal of Neurology. 2002; 249(10):1446-50.
- Grosso S, Balestri P, Mostardini R, Federico A, De Stefano N. Brain mitochondrial impairment in ethylmalonic encephalopathy. Journal of Neurology. 2004; 251(6):755-6.
- Hadi H, Mohammed AJ. Analysis of a molecular dynamics simulation of the acetylcholinesterase enzyme and its complex with (axillaridine-a) inhibitor. Journal of Al-Nahrain University. 2008; 11(2):83-9.
- Halperin I, Ma B, Wolfson H, Nussinov R. Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions. PROTEINS: Structure, Function and Genetics. 2002; 47(4):409-43.
- Hammond P, Rao R, Koenigsberger C, Brimijoin S. Regional variation in expression of acetylcholinesterase mRNA in adult rat brain analyzed by *in situ* hybridization. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 1994; 81:10933-7. levando a outras interpretações resultados diferentes

Hammond P, Brimijoin S. Acetylcholinesterase in Huntington's and Alzheimer's diseases: simultaneous enzyme assay and immunoassay of multiple brain regions. *Journal of Neurochemistry*. 1988; 50(4):1111-6.

Harel M, Sussman JL, Krejci E, Bon S, Chanal P, Massoulié J, Silman J. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. 1995; 89(22):10827-31.

Hasselmo ME. The Role of Acetylcholine in Learning and Memory. *Current Opinion in Neurobiology*. 2006; 16(6):710-5.

Henriques BJ, Lucas TG, Rodrigues JV, Frederiksen JH, Teixeira MS, Tiranti V, Bross P, Gomes CM. Ethylmalonic Encephalopathy ETHE1 R163W/R163Q Mutations Alter Protein Stability and Redox Properties of the Iron Centre. *Plos One*. 2014; 9(9):e107157.

Hicks D, John D, Makova NZ, Henderson Z, Nalivaeva NN, Turner AJ: membrane targeting, shedding and protein interactions of brain acetylcholinesterase. *Journal of Neurochemistry*. 2011; 116:742-6.

Hildebrandt TM, Grieshaber MK. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *Federation of European Biochemical Societies*. 2008; 275(13):3352-61.

Hohmann CF. A morphonetic role for acetylcholine in mouse cerebral neocortex. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2003; 27(4):351-63.

Houghton PJ, Ren Y, Melanie JH. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*. 2006; 23(2):181-99.

Huang S e Zou X. Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010; 11(8):3016-34.

Inestrosa NC, Alvarez A, Pérez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, Casanueva OI, Soto C, Garrido J. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*. 1996; 16(4):881-91.

Irwin JJ, Shoichet BK. ZINC – a free database of commercially

available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2005; 45(1):177-82.

Jethva R, Bennett MJ, Vockley J. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Molecular Genetics Metabolism*. 2008; 95(4):195-200.

Jameson RR, Seidler FJ, Slotkin TA. Nonenzymatic Functions of Acetylcholinesterase Splice Variants in the Developmental Neurotoxicity of Organophosphates: Chlorpyrifos, Chlorpyrifos Oxon, and Diazinon. *Environmental Health Perspectives*. 2007; 115(1):65-70.

Jamroz E, Paprocka J, Adamek D, Pytel J, Szczechowska K, Grabska N, Malec M, Gluszkiewicz E, Daab M, Wodolazski A. Clinical and neuropathological picture of ethylmalonic aciduria – diagnostic dilemma. *Folia Neuropathologica*. 2011; 49(1): 71-7.

Jiang H, Zhang X. Acetylcholinesterase and apoptose. A novel perspective of an old enzyme. *The Federation of European Biochemical Societies*. 2008; 275(4):612-7.

Johnson DE, Nedza FM, Spracklin DK, Ward KM, Schmidt AW, Iredale PA, Godek DM, Rollema H. The role of muscarinic receptor antagonism in antipsychotic-induced hippocampal acetylcholine release. *European Journal of Pharmacology*. 2005; 506(3):209-19.

Kabil O, Banerjee R. Characterization of patient mutations in human persulfide dioxygenase (ETHE1) involved in H₂S catabolism. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287(53):44561–7.

Karpel R, Sternfeld M, Ginzberg D, Guhl E, Graessmann A, Soreq H. Overexpression of alternative human acetylcholinesterase forms modulates process extensions in cultured glioma cells. *Journal of Neurochemistry*. 1996; 66(1):114-23.

Kato G, Tan E, Yung. Acetylcholinesterase: kinetic studies on the mechanism of atropine inhibition. *The Journal of biological chemistry*. 1972; 247(10):3186-9.

Khan MTH. Molecular interactions of cholinesterases inhibitors using *in silico* methods: current status and future prospects. *New Biotechnology*.

2009; 25(5):331-46.

Kraus J, Shastri K, Rosenberg M. Perioperative Management of a Patient With Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: A Case Report. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. 2008; 66(10):2164-5.

Kua J, Zhang Y, McCammon. Studying enzyme binding specificity in acetylcholinesterase using a combined molecular dynamics and multiple docking approach. *Journal of the American Chemical Society*. 2002; 124(28):8260-7.

Kua J, Zhang Y, Eslami AC, Butler JR, McCammon JA. Studying the roles of W86, E202, e Y337 in binding of acetylcholine to acetylcholinesterase using a combined molecular dynamics and multiple docking approach. *Protein Science*. 2003; 12(12):2675-84.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007; 23(21):2947-8.

Larsson P, Wallner B, Lindahl E, Elofsson A. Using multiple templates to improve quality of homology models in automated homology modeling. *Protein Science*. 2008; 17(6):990-1002.

Layer P, Willbold E. Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 1995; 29(3):1-94.

Legay C. Why so many forms of acetylcholinesterase? *Microscopy Research and Technique*. 2000; 49:56-72.

Leipnitz G, Schuck PF, Ribeiro CA, Dalcin KB, Assis DR, Barschak AG, Pulrolnik V, Wannmacher CM, Wyse AT, Wajner M. Ethylmalonic acid inhibits mitochondrial creatine kinase activity from cerebral cortex of young rats in vitro. *Neurochemical Research*. 2003; 28(5):771-7.

Lovell SC, Davis IW, Arendall WB 3rd, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, Richardson JS, Richardson DC. Structure validation by C α geometry: phi,psi and C β deviation. *Proteins: Structure, Function & Genetics*. 2002; 50(3):437-50.

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193(1):265-75.

Lushington GH, Guo J, Hurley. Acetylcholinesterase: Molecular Modeling with the whole toolkit. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2006; 6(1):57-73.

McGowan KA, Nyhan WL, Barshop BA, Naviaux RK, Yu A, Haas RH, Townsend JJ. The role of methionine in ethylmalonic encephalopathy with petechiae. *Archives of Neurology*. 2004; 61:570-4.

Magalhães CS. Algoritmos genéticos para o problema de docking proteína-ligante [Tese de Doutorado]. Petrópolis: Laboratório Nacional de Computação Científica; 2006.

Marzocco A, Torres BB. *Bioquímica básica*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.

Massoulié J, Pezzementi L, Bom S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*. 1993; 41(1):31-91.

Massoulié J, Anselmet A, Bon S, Krejci E, Legay C, Morel N, Simon S. Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization. *Journal of Physiology, Paris*. 1998; 92(3-4):183-90.

Massoulié J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*. 2002; 11:130-43.

Massoulié J, Bon S, Perrier N, Falasca S. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chemico-Biological Interactions*. 2005; 157:3-14.

Massoulié J, Bon S. The C-terminal T peptide of cholinesterases: structure, interactions, and influence on protein folding and secretion. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2006; 30(1-2):233-6.

Matfield M. The ethics of animal research. *Experimental Animals*. 1996; 45(3):209-15.

Mendel B, Rudney H. On the type of cholinesterase present in the brain tissue. *Science*. 1943; 98(2539):201-2.

Menequz A, Bisso GM, Michalek H. Age-related changes in acetylcholinesterase and its molecular forms in various brain áreas of rats. *Neurochemical Research*. 1992;17(8):785-90.

Merinero B1, Pérez-Cerdá C, Ruiz Sala P, Ferrer I, García MJ, Martínez Pardo M, Belanger-Quintana A, de la Mota JL, Martín-Hernández E, Vianey-Saban C, Bischoff C, Gregersen N, Ugarte M. Persistent increase of plasma butyryl/isobutyrylcarnitine concentrations as marker of SCAD defect and ethylmalonic encephalopathy. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2006; 29(5):685.

Meshorer E, Soreq H. Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neuroscience*. 2006; 29(4):216-24.

Millard CB, Kryger G, Ordentlich A, Greenblatt HM, Harel M, Raves ML, Segall Y, Barak D, Shafferman A, Silman I, Sussman JL. *Biochemistry*. 1999; 38(22):7032-9.

Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. 2009; 30(16):2785-91.

Mutero A, Fournier D. Post-translational modifications of *Drosophila* acetylcholinesterase. In vitro mutagenesis and expression in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267(3):1695-700.

Nalivaeva NN, Turner AJ. Post-translational modifications of proteins: acetylcholinesterase as a model system. *Proteomics*. 2001; 1(6):735-47.

Namba AM, Silva VB da, Silva CHTP. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*. 2008; 33(4):13-24.

Nazam N, Shaikh S, Lone MI, Sharma M, Ahmad W. Combined in silico and in vitro studies shed insights into the acute acetylcholinesterase response in rat and human brain. *Biotechnology*

and Applied Biochemistry. 2015; 62(3):407-5.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. [Internet]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/25282401>>. Acesso em: 01 Jun. 2015.

Nelson e Cox. Princípios de bioquímica. 6ª ed. Sarvier: São Paulo: 2014.

Nijholt I, Farchi N, Kye N, Sklan EH, Shoham S, Verbeure B, Owen D, Hochner B, Spiess J, Soreq H, Blank T. Stress-induced alternative splicing of acetylcholinesterase results in enhanced fear memory and long-term potentiation. *Molecular Psychiatry*. 2004; 9(2):174-83.

Nissenkorn A, Michelson M, Bem-Zeev B, Lerman-Sagie T. Inborn errors of metabolism: a cause of abnormal brain development. *Neurology*. 2001; 56(10):1265-72.

Nogara PA, Saraiva RA, Bueno DC, Lissner LJ, Corte CLD, Braga MM, Rosemberg DB, Rocha JBT. Virtual screening of acetylcholinesterase inhibitors using the lipinski's rule of Five and ZINC databank. *Hindawi Publishing Corporation. BioMed Research International*. 2015; 2015:1-8.

Noureddine H, Carvalho S, Schmitt C, Massoulié J, Bon S. Acetylcholinesterase associates differently with its anchoring proteins ColQ e PRiMA. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(30):20722-32.

Nowaczyk MJ, Blaser SI, Clarke JT. Central nervous system malformations in ethylmalonic encephalopathy. *American Journal of Medical Genetics*. 1998; 75(3):292-6.

Ohno K, Brengman J, Tsujino A, Engel AG. Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; 95(16):9654-9.

Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Ariel N, Segall Y, Velan B, Shafferman A. Functional Characteristics of the Oxyanion Hole in Human Acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;

273(31):19509-17.

Ozand PT, Rashed M, Millington DS, Sakati N, Hazzaa S, Rahbeeni Z, Al Odaib A, Youssef N, Mazrou A, Gascon GG, Brismar J. Ethylmalonic aciduria: an organic academia with CNS involvement and vasculopathy. *Brain and Development*. 1994; 16:12-22.

Palmer CA e Percy AK. Neuropathology of occipital horn syndrome. *Journal of Child Neurology*. 2001; 16(10):764-6.

Paraoanu LE, Layer PG. Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation. *Federation of European Biochemical Societies*. 2008; 275(4):618-24.

Patočka J, Cabal J, Kuča K, Jun D. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. *Journal of Applied Biomedicine*. 2005; 3(2):91-9.

PDB. Protein Data Bank. Disponível em: <<http://www.pdb.org>>. Acesso em: 03 jun. 2015.

Pleiss J, Mionetto N, Schmid RD. Probing the acyl binding site of acetylcholinesterase by protein engineering. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1999; 6(3):287-96.

Pagani E. In: Testes em animais são reduzidos com novos ensaios in vitro e simulações. Agência FAPESP (2015). Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/testes_em_animais_sao_reduzidos_com_novos_ensaios_in_vitro_e_simulacoes/20928/>. Acesso em 30 mai. 2015.

Pedersen CB, Kolvraa S, Kolvraa A, Stenbroen V, Kjeldsen M, Ensenauer R, Tein I, Matern D, Rinaldo P, Vianey-Saban C, Lehnert ARW, Christensen E, Corydon TJ, Andresen BS, Vang S, Bolund L, Vockley J, Bross P, Gregersen N. The ACADS gene variation spectrum in 114 patients with short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency is dominated by missense variations leading to protein misfolding at the cellular level. *Human Genetics*. 2008; 124(1):43-56.

Pedersen CB, Zolkipli Z, Vang S, Palmfeldt J, Kjeldsen M, Stenbroen V, Schmidt SP, Wanders RJA, Ruiter JPN, Wibrand F, Tein I, Gregersen N.

Antioxidant dysfunction: potential risk for neurotoxicity in ethylmalonic aciduria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2010; 33(3):211-22.

Pendota SC, Aderogba MA, Ndhala AR, Van Staden J. Antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Buddleja salviifolia* (L.) Lam. leaf extracts and isolated compounds. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013; 148(2):515-20.

Pettinati I, Brem J, McDonough MA, Schofield CJ. Crystal structure of human persulfide dioxygenase: structural basis of ethylmalonic encephalopathy. *Human Molecular Genetics*. 2015; 24(9):2458-69.

Phospho Database. A database of S/T/Y phosphorylation sites. Disponível em: <<http://phospho.elm.eu.org>>. Acesso em: 03 jun. 2015.

Pigeon N, Philippe MC, Cyr D, Lemieux B, Clarke JTR. Clinical Heterogeneity in Ethylmalonic Encephalopathy. *Journal of Child Neurology*. 2009; 24(8):991-6.

Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011; 155(3):219-30.

Quick MW, Lester RA. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *Journal of Neurobiology*. 2002; 53(4):457-78.

Rakonczay Z. Cholinesterase and its molecular forms in pathological states. *Progress in Neurobiology*. 1988; 31(4):311-30.

Ramos OH, Selistre-de-Araujo HS. Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metallopeptidases using bioinformatic tools. *Toxicon*. 2004; 44(5):529-38.

Reed MC, Lieb A, Nijhout HF. The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. *Prospects & Overviews*. 2010; 32:422-9.

Rezende AH de, Peluzio MCG, Sabarense CM. Experimentação animal: ética e legislação brasileira. *Revista de Nutrição*. 2008; 21(2):237-42.

Rinne JO, Myllyklä T, Lönnberg P, Marjamäki P. A post-mortem study of brain nicotinic receptors in Parkinson's and Alzheimer's disease. *Brain Research*. 1991; 547(1):167-70.

Ritter L. Efeitos da administração intraestriatal do ácido.etilmalônico sobre o metabolismo energético em cérebro de ratos jovens. [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2014.

Rodriguez R, Chinae G, Lopez N, Pons T, Vriend G. Homology modeling, model and software evaluation: three related resources. *Bioinformatics*. 1998; 14(6):523-8.

Rocco MD, Caruso U, Briem E, Rossi A, Allegri AEM, Buzzi D, Tiranti V. A case of ethylmalonic encephalopathy with atypical clinical and biochemical presentation. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2006; 89(4):395-7.

Roe CR, Ding J. Mitochondrial fatty acids oxidation disorders. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. 8^a ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.

Rosenberry TL. Catalysis by acetylcholinesterase: Evidence that the rate-limiting step for acylation with certain substrates precedes general acid-base catalysis. *Proceedings of the National Academy Sciences*. 1975; 72(10):3834-8.

Rosenberry TL, Johnson JL, Cusack B, Thomas JL, Emani S, Venkatasubban KS. Interaction between the peripheral site and the acylation site in acetylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions*. 2005; 157-158:181-9.

Rössle SCS. Desenvolvimento de um sistema computacional para modelagem comparativa em genômica estrutural: Análise de sequências do genoma da *Gluconacetobacter diazotrophicus* [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2004.

Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen; 1959.

Sadashiva CT, Naidoo Y, Naidoo JR, Kalicharan B, Naidoo G.

Antioxidant and acetylcholinesterase activities of three species of the family Lamiaceae. *Bangladesh Journal of Botany*. 2014; 43(3):331-5.

Sáez-Valero J, Sberna G, McLean CA, Small DH. Molecular isoform distribution and glycosylation of acetylcholinesterase are altered in brain and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Molecular Brain Research*. 2003; 117(2):240-4.

Sali A, Blundell TL. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*. 1993; 234(3):779-815.

Sanson B, Nachon F, Colletier J, Froment M, Toker L, Greenblatt HM, Sussman JL, Ashani Y, Masson P, Silman I, Weik M. Crystallographic snapshots of nonaged and aged conjugates of soman with acetylcholinesterase, and of a ternary complex of the aged conjugate with pralidoxime. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2009; 52:7593-603.

Sanson B, Colletier JP, Xu Y, Lang PT, Jiang H, Silman I, Sussman JL, Weik M. Backdoor opening mechanism in acetylcholinesterase based on X-ray crystallography and molecular dynamics simulations. *Protein Science*. 2011; 20(7):1114-8.

Sayle R e Milner-White J. RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends in Biochemical Sciences*. 1995; 20(9):374-6.

Scaini, G; Ronchi, N; Jeremias, IC; Deroza, PF; Zugno, AI; Pereira, TCB; Oliveira, GMT; Kist, LW; Bogo, MR; Schuck, PF; Ferreira, GC; Streck, EL. Evaluation of Acetylcholinesterase in an Animal Model of Maple Syrup Urine Disease. *Molecular Neurobiology*. 2012; 45(2):279-86.

Schuck PF, Leipnitz G, Ribeiro CA, Dalcin KB, Assis DR, Barschak AG, Pulrolnik V, Wannmacher CM, Wyse AT, Wajner M. Inhibition of creatine kinase activity in vitro by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. *Neurochemical Research*. 2002; 27(12):1633-9.

Schuck PF, Ferreira GC, Viegas CM, Tonin AM, Busanello NB, Pettenuzzo LF, Netto CA, Wajner M. Chronic early postnatal administration of ethylmalonic acid to rats causes behavioral deficit. *Behavioural Brain Research*. 2009; 197(2):364-70.

Schuck PF, Busanello ENB, Moura AP, Tonin AM, Grings M, Ritter L, Vargas CR, Ferreira GC, Wajner M. Promotion of Lipid and Protein Oxidative Damage in Rat Brain by Ethylmalonic Acid. *Neurochemical Research*. 2010; 35(2):298-305.

Schuck PF, De Assis DR, Viegas CM, Brandao Pereira TC, Machado JL, Furlanetto CB, Bogo MR, Streck EL, Ferreira GC. Ethylmalonic acid modulates Na⁺, K⁺-ATPase activity and mRNA levels in rat cerebral cortex. *Synapse*. 2013; 67(3):111-7.

Schuck PF, Milanez AP, Felisberto F, Galant LS, Machado JL, Furlanetto CB, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Streck EL, Ferreira GC. Brain and Muscle Redox Imbalance Elicited by Acute Ethylmalonic Acid Administration. *PLoS One*. 2015; 10(5):1-13.

Sewell AC, Herwig J, Böhles H, Rinaldo P, Bhala A, Hale DE. A new case of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency with isolated ethylmalonic aciduria. *European Journal of Pediatrics*. 1993; 152(1):922-4.

Shen T, Tai K, Henchman RH, Mccammon JA. Molecular Dynamics of Acetylcholinesterase. *Accounts of Chemical Research*. 2002; 35(6):332-40.

Shi J, Boyd AE, Radić Z, Taylor P. Reversibly bound and covalently attached ligands induce conformational changes in the loop, Cys69-Cys96, of mouse acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(45):42196-204.

Siegel A, Sapru HN. *Essential Neuroscience*. 1^a ed. Lippincott Williams & Wikins. 2006

Silman I, Futerman AH. Modes of attachment of acetylcholinesterase to surface membranes. *European Journal of Biochemistry*. 1987; 170(1-2):11-22.

Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chemico-Biological Interactions*. 2008; 175(1-3):3-10.

Silver A. *The biology of cholinesterases*. Amsterdam: Elsevier; 1974.

Smith CM, Marks AD, Lieberman MA. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. 2^a ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001; 2(4):294-302.

Souza CFM, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem neonatal de Distúrbios Metabólicos. *Ciências e Saúde Coletiva*. 2002; 7(1):129-32.

Souza CN de, Martins AM, D'almeida V, Silva LCS da. Triagem urinária para erros inatos do metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento. *Revista Paraense de Medicina*. 2007; 21(2):23-8.

Sternfeld M, Shoham S, Klein O, Flores-Flores C, Evron T, Idelson GH, Kitsberg D, Patrick JW, Soreq H. Excess "read-through" acetylcholinesterase attenuates but the "synaptic" variant intensifies neurodeterioration correlates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 2000; 97(15):8647-52.

Sussman JL, Harel M, Frowlow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. 1991; 253(5022):872-9.

Sussman JL, Harel M, Silman I. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs. *Chemico-Biological Interactions*. 1993; 87(1-3):187-97.

Suszkiw JB. Interaction of selected cholinergic effector molecules with acetylcholinesterase in physiological eel ringer's solution. *Molecular Pharmacology*. 1973; 9(4):561-70.

Tai K, Shen T, Börjesson U, Phillippopoulos M, McCammon JA. Analysis of a 10-ns molecular dynamics simulation of mouse acetylcholinesterase. *Biophysical Journal*. 2001; 81(2):715-24

Tai K, Shen T, Henchman RH, Bourne Y, Marchot P et al. Mechanism of acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: a 5-ns molecular dynamics simulation. *Journal of the American Chemical Society*. 2002; 124(21):6153-61.

Talesa VN. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2001; 122:1961-9.

Taylor P, Li Y, Camp S, Rachinsky TL, Ekström T, Getman D, Fuentes ME, Vellom DC e Radic Z. Structure and regulation of expression of the acetylcholinesterase gene. *Chemico-Biological Interactions*. 1993; 87:1999-207.

Taylor P. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG. Eds.; McGraw-Hill: New York; 1996.

Tein I, Elpeleg O, Ben-Zeev B, Korman SH, Lossos A, Lev DL T, Leshinsky-Silver E, Vockley J, Berry GT, Lamhonwah AM, Matern D, Roe CR, Gregersen N. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene mutation (c.319C>T) presents with clinical heterogeneity and is candidate founder mutation in individuals of Ashkenazi Jewish origin. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2008; 93(2):179-89.

Tein I, Haslam RHA, Rhead WJ et al. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cause of ophthalmoplegia and multicore myopathy. *Neurology*. 1999; 52(2): 366-72.

Terry AV, Jr and Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003; 306(3):821-7.

Testa B, Bojarski AJ. Molecules as complex adaptive systems: Constrained molecular properties and their biochemical significance. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000; 11(Suppl. 2):S3-S14.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 1994; 22(22):4673-80.

Tiranti V, D'Adamo P, Briem E, Ferrari G, Mineri R, Lamantea E, Mandel H, Balestri P, Garcia-Silva M, Vollmer B, Rinaldo P, Hahn SH, Leonard J, Rahman S, Dionisi-Vici C, Garavaglia B, Gasparini P,

Zeviani M. Ethylmalonic Encephalopathy Is Caused by Mutations in *ETHE1*, a Gene Encoding a Mitochondrial Matrix Protein. *American Journal of Human Genetics*. 2004; 74:239-52.

Tiranti V, Briem E, Lamantea E, Mineri R, Papaleo E, Degioia L, Forlani F, Rinaldo P, Abu-Libdeh B, Cindro-Heberle L, Owaidha M, Jack RM, Christensen E, Burlina A, Zeviani M. *ETHE1* mutations are specific to ethylmalonic encephalopathy. *J. Med. Genet*. 2006; 43(4) 340-6.

Tiranti V, Viscomi C, Hildebrandt T, Di Meo I, Mineri R, Tiveron C, Levitt MD, Prellè A, Fagiolari G, Rimoldi M, Zeviani M. Loss of *ETHE1*, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nature Medicine*. 2009; 15(2):200-5.

Tiranti V, Zeviani M. Altered sulfide H₂S metabolism in ethylmalonic encephalopathy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013; 5(1)a011437.

Toiber D, Soreq H. Cellular stress reactions as putative cholinergic links in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 2005; 30(6-7):909-19.

Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2010; 31(2):455-61.

Turnbull DM, Bartlett K, Stevens DL, Alberti KGMM, Gibson GJ, Johson MA, McCulloch AJ, Sherratt HSA. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency associated with a lipid storage myopathy and secondary carnitine deficiency. *The New England Journal of Medicine*. 1984; 311(19):1232-6.

Turpin B, Tobias JD. Perioperative management of a child with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatric Anesthesia*. 2005; 15:771-7.

Uluç Y, Poat I, Karakaya P, Ayanoglu, Semra AH. Importance of acrocyanosis in delayed walking. *Journal of Pediatric Neurosciences*. 2015; 10(1):80-1.

Van Maldegem BT, Duran M, Wanders RJ, Niezen-Koning KE, Hogeveen M, Ijlst L, Waterham HR, Wijburg FA. Clinical, biochemical, and genetic heterogeneity in short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *The Journal of the American Medical Association*. 2006; 296(8):943-52.

Van Maldegem BT, Wanders RJ, Wijburg FA. Clinical aspects of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2010. Oct;33(5):507-11.

Van Maldegem BT, Duran M, Wanders RJA, Waterham HR, Koning TJ de, Rubio E, Wijburg FA. Fasting and Fat-Loading Tests Provide Pathophysiological Insight into Short-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. *The Journal of Pediatrics*. 2010; 156(1):121-7.

Velan B, Barak D, Ariel N, Leitner M, Bino T, Ordentlich A, Shafferman A. Structural modifications of the omega loop in human acetylcholinesterase. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 1996; 395(1):22-8.

Vyas VK, Ukawala RD, Ghate M, Chintha C. Homology Modeling a Fast Tool for Drug Discovery: Current Perspectives. *Indian J Pharm Sci*. 2012;74:1-17 Yoon HR, Hahn SH, Ahn YM, et al. Therapeutic trial in the first three Asian cases of ethylmalonic encephalopathy: response to riboflavin. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2001; 24(8):870-3.

Waarde, A van; Ramakrishnan, NK; Rybczynska, AA; Elsinga, PH; Ishiwata, K; Nijholt IM; Luiten, PGM; Dierckx, RA. The cholinergic system, sigma-1 receptors and cognition. *Behavioural Brain Research*. 2011; 221(2):543-54.

Walsh DJ, Sills ES, Lambert DM, Gregersen N, Malone FD, Walsh AP. Novel ETHE1 mutation in a carrier couple having prior offspring affected with ethylmalonic encephalopathy: Genetic analysis, clinical management and reproductive outcome. *Molecular Medicine Reports*. 2010; 3(2):223-6.

Yahuaca P, Ek-Vitorin JF, Rush P, Delmar M, Taffet SM. Identification of a protein kinase activity that phosphorylates connexin43 in a pH-dependent manner. *Brazilian Journal of Medical and Biological*

Research. 2000; 33(4):399-406.

Yoon H-R, Hahn SH, Ahn YM, Jang SH, Shin YJ, Lee EH, Ryu KH, Eun BL, Rinaldo P, Yamaguchi S. Therapeutic trial in the first three Asian cases of ethylmalonic encephalopathy Response to riboflavin. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2001; 24:870-3.

Zafeiriou DI, Augoustides-Savvopoulou P, Haas D, Smet J, Triantafyllou P, Vargiami E, Tamiolaki M, Gombakis N, van Coster R, Sewell AC, Vianey-Saban C, Gregersen N. Ethylmalonic encephalopathy: clinical and biochemical observations. *Neuropediatrics*. 2007; 38(2):78-82.

Zannolli R, Buoni S, Tassini M, De Nicola A, Betti G, De Felice C, Orsi A, Varetti MC, Ferrara F, Messina M, Giannini C, Mohn A, Chiarelli F, Liberati M, Strambi M, Funghini S, Vivi A, Wevers RA, Hayek J. Silent increase of urinary ethylmalonic acid is na indicator of nonspecific brain dysfunction. *NMR in Biomedicine*. 2010; 23(4):353-8.

Zimmerman G, Njunting N, Ivens S, Tolner S, Behrens CJ, Gross M, Soreq H, Heinemann U, Friedman A. Acetylcholine-induced seizure-like activity and modified cholinergic gene expression in chronically epileptic rats. *European Journal of Neuroscience*. 2008; 27(4): 965-75.

Zirger JM, Beattie CE, McKay DB, Boyd RT. Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Gene Expression Patterns*. 2003; 3(6): 747-54.

ZINC Database. [Internet]. Disponível em: <<http://www.zinc.docking.org>>. Acesso em: 03 jun. 2015.

Zolkipli Z, Pedersen CB, Lamhonwah Anne-Marie, Gregersen N, Tein I. Vulnerability to Oxidative Stress In Vitro in Pathophysiology of Mitochondrial Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Response to Antioxidants. *Plos One*. 2011; 6(4):e17534.

Zugno AI, Pereira LO, Mattos C, Scherer EBS, Netto CA, Wyse ATS. Guanidinoacetate administration increases acetylcholinesterase activity in striatum of rats and impairs retention of na inhibitory avoidance task. *Metabolic Brain Disease*. 2008; 23:189-98.

Zytkovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, Strauss AW, Corneau AM, Eaton RB, Grady GF. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the new England newborn screening program. *Clinical Chemistry*. 2001; 47(11):1945-55.

Tiranti V, D'Adamo P, Briem E, Ferrari G, Mineri R, Lamantea E, Mandel H, Balestri P, Garcia-Silva MT, Vollmer B, Rinaldo P, Hahn SH, Leonard J, Rahman S, Dionisi-Vici C, Garavaglia B, Gasparini P, Zeviani M. Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in *ETHE1*, a gene encoding a mitochondrial matrix protein. *The American Journal of Human Genetics*. 2004; 74(2):239-52.

Tiranti V, Zeviani M. Altered Sulfide (H_2S) Metabolism in Ethylmalonic Encephalopathy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013; 5(1):a011437.

Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*. 2011; 40(5):1271-96.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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



Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo:

Protocolo: 018/2014-1

Professor Responsável: Patrícia Fernanda Schuck.

Equipe: Emilio Luiz Streck, Gustavo da Costa Ferreira, Alexandra Ioppi Zugno, Elen Gomes Pereira, Marina Lummertz Magenis, Felipe Dal Pizzol, Fabrícia Cardoso Petronilho, Maurício Reis Bogo, Luiza Wilges Kist, Bruna Klippel Ferreira, Soliany Grassi Maravai, Wanessa de Fáveri, Nádia Webber Dimmer, Monique Michels, Cláudio Teodoro de Souza, Drielly Silva Florentino, Lucinéia Gainski Danielski e Tamires Pavei Macan.

Título: "Investigação dos efeitos da administração aguda e crônica de ácido etilmalônico sobre parâmetros bioquímicos em ratos"

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 192 Ratos Wistar, sendo 96 de 5 dias pesando entre 7g a 10g e 96 de 30 dias pesando aproximadamente 120g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 018/2014-1

Principal Investigator: Patrícia Fernanda Schuck.

Researchers: Emilio Luiz Streck, Gustavo da Costa Ferreira, Alexandra Ioppi Zugno, Elen Gomes Pereira, Marina Lummertz Magenis, Felipe Dal Pizzol, Fabrícia Cardoso Petronilho, Maurício Reis Bogo, Luiza Wilges Kist, Bruna Klippel Ferreira, Soliany Grassi Maravai, Wanessa de Fáveri, Nádia Webber Dimmer, Monique Michels, Cláudio Teodoro de Souza, Drielly Silva Florentino, Lucinéia Gainski Danielski e Tamires Pavei Macan.

Project title: "Investigation of acute and chronic ethylmalonic acid administration on biochemical parameters in rats."

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 18 de fevereiro de 2014

Wilson Heizen Cardoso
Coordenador Adjunto da CEUA