

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

GISELLI SCAINI

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E
COMPORTAMENTAIS EM UM MODELO ANIMAL DA
DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO**

**CRICIÚMA
2014**

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

GISELLI SCAINI

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E
COMPORTAMENTAIS EM UM MODELO ANIMAL DA
DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO**

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

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz
Streck

**CRICIÚMA
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S278a Scaine, Giselli.

Avaliação de parâmetros neuroquímicos e comportamentais em um modelo animal da doença da urina do xarope do bordo / Giselli Scaini ; orientador: Emílio Luiz Streck. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.

163 p : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2014.

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

CDD. 22ª ed. 616.042



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)

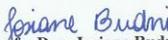
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

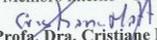
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Giselli Scaini** sob o título “**Avaliação dos efeitos neuroquímicos e comportamentais em um modelo animal da doença da urina do xarope do bordo**” 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.

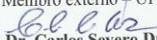
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese, com conceito A.

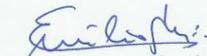
Criciúma, SC, 03 de julho de 2014.


Prof. Dra. Josiane Budni
Membro Relator - UNESC


Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Membro interno - UNESC


Prof. Dra. Cristiane Matté
Membro externo - UFRGS


Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho
Membro externo – UFRGS


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Orientador


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 Bioenergética, Laboratório de Neurociências e Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na 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, Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dedico este trabalho aos meus familiares, em especial aos meus pais, Elcio e Adioni, que estão presentes em todos os momentos da minha vida e por serem sempre os maiores incentivadores de todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

A conclusão dessa tese de doutorado não é resultado de um esforço individual, ela reúne significativas contribuições que recebi ao longo destes anos. Por isso, eu gostaria de expressar meus profundos agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de formas variáveis e em diferentes níveis ao longo do desenvolvimento dos trabalhos que resultaram na conclusão desse doutorado.

A Deus, que sempre olha por mim e que me concedeu tantas maravilhas. Por seu amor incondicional e principalmente, por ter me dado força, coragem e incentivo para que, nos momentos de fraqueza, eu me levantasse e continuasse a minha jornada.

Aos meus pais, Adione Cardoso Scaini e Elcio Scaini, pelas noites mal dormidas, pelas angústias e preocupações, por todo amor, carinho, apoio incondicional, incentivo, paciência e felicidade que me concederam. Obrigada pela vida e por terem feito de mim o que sou hoje. Por terem me dado a melhor educação e incentivo ao aperfeiçoamento constante e principalmente pelo brilho no olhar sempre que falam da escolha profissional que eu fiz, não há presente maior do que o orgulho de vocês. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Junior e Giovanna e ao meu sobrinho Eduardo, meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho. Obrigada pela confiança!

Agradecimento muito especial ao meu orientador. A conclusão desse doutorado não teria sido possível sem os conselhos e paciência do meu orientador e amigo, Dr. Emilio Luiz Streck. Expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicional que muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer sempre saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor. Obrigada pela confiança depositada, pelo exemplo de profissionalismo e comprometimento com o conhecimento científico, pelos ensinamentos, amizade, e, principalmente, por nunca ter medido esforços para que esse trabalho acontecesse. O seu apoio incondicional foi fundamental para que tudo desse certo. A você serei eternamente grata.

A todos os meus amigos, pelos momentos de descontração tão importantes para o meu equilíbrio, pelas conversas alheias aos problemas, pela preocupação e companheirismo, por compartilharem comigo momentos e vivências.

A Dhébora, um agradecimento especial pelo apoio e carinho diários, mesmo que longe, pelas palavras doces e pela transmissão de confiança e força, em todos os momentos, e principalmente pelo exemplo de persistência, determinação e coragem.

Aos colegas de laboratório Lara M. Gomes, Milena Carvalho Silva, Meline Moraes, Larissa Constantino, Monique Michels, Francieli Vuolo, amigas que estiveram ao meu lado durante esta fase, pelo companheirismo, força, apoio nos momentos difíceis e agradáveis momentos de convivência.

Aos laboratórios de Neurociências (UNESC), Laboratório de Biologia Genômica e Molecular (PUCRS) e ao Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (UFRGS) pelas colaborações realizadas nesse estudo.

Agradecimento muito especial as “minhas meninas” Natalia, Camila, Gabriela e Meline, pela amizade, pela confiança que depositaram em mim e principalmente pelo auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Expresso também a minha gratidão e solidariedade a todos os pacientes que, embora no anonimato, prestaram uma contribuição fundamental para o meu crescimento profissional e alimentaram a minha vontade de saber.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, agradeço pelo muito que aprendi com vocês nesses quatro anos.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela formação e pela possibilidade de realizar esse trabalho de pesquisa. Agradeço também a CAPES, pelo auxílio financeiro.

A toda a família dos Laboratórios de Bioenergética, Fisiopatologia Experimental, Erros Inatos do Metabolismo e Biotério pela grande amizade, convivência e troca de experiência. Obrigada por tudo.

“Por cada solução encontrada, uma diversidade de novas interrogações nasce. Assim evolui a Ciência, assim progride a vida cotidiana do sujeito humano. O que deixa de constituir problema, de inquietar, de preocupar, perde magicamente o fascínio e passa a ficar retido na valência dos temas dominados...”

Pirokas Ricardo

RESUMO

A doença da urina do xarope do bordo (DXB) é uma desordem metabólica hereditária caracterizada predominantemente por disfunção neurológica. No entanto, a fisiopatologia dos danos cerebrais ainda é pouco conhecida. O propósito com o presente trabalho foi avaliar os efeitos neuroquímicos e comportamentais da administração aguda e crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) em cérebro de ratos Wistar, e se o tratamento com antioxidantes (N-acetilcisteína e desferroxamina) pode ser eficaz como uma terapia adjuvante para o tratamento da DXB. Os resultados demonstraram que a administração aguda de AACR em ratos infantis e jovens ocasionou um aumento na atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo, estriado e córtex cerebral, sem alterar a expressão gênica dessa enzima no córtex cerebral e estriado, porém no hipocampo houve uma redução dos níveis de mRNA. Após a administração crônica resultados semelhantes foram encontrados, e o tratamento com antioxidantes foi capaz de prevenir tais alterações. Entretanto, uma diminuição significativa nos níveis de mRNA foi observada no estriado, enquanto que no córtex cerebral observou-se um aumento dos níveis de mRNA nos grupos DXB e DXB suplementado com antioxidantes. Os níveis do fator de crescimento neural (NGF) mostraram-se reduzidos no hipocampo após administração aguda e crônica de AACR, e o tratamento com antioxidante preveniu tal efeito. A análise da expressão gênica dessa proteína demonstrou uma diminuição nos níveis de mRNA após a administração aguda em ratos infantis, enquanto que o tratamento com antioxidantes aumentou a expressão dessa proteína. Os resultados demonstraram que a exposição aguda aos AACR em ratos infantis induz um aumento nos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo total (BDNF-total) e pro-BDNF no hipocampo e estriado, seguido por uma diminuição nos níveis proteicos do ativador de plasminogênio tecidual (tPA). Nos ratos jovens, observou-se um aumento dos níveis de pro-BDNF e BDNF-total, e uma redução dos níveis de tPA apenas no estriado. Por outro lado, a exposição prolongada aos AACR aumentou os níveis de BDNF-total, sem alterar os níveis de pro-BDNF no hipocampo e córtex cerebral. Adicionalmente, observou-se que a suplementação com antioxidantes foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de BDNF-total através de uma *down*-regulação da expressão gênica do *bdnf*. Foi também avaliado o efeito dos AACR sobre o comportamento cognitivo e depressivo, onde

ficou demonstrado que a administração aguda e crônica de AACR causa déficit cognitivo e a exposição prolongada aos AACR levou a um comportamento anedônico, bem como um aumento no peso da glândula adrenal e no tempo de imobilidade. Demonstrou-se também que o tratamento com antioxidantes ou imipramina foi capaz de prevenir as alterações comportamentais observadas nesse estudo. Esses resultados sugerem que os AACR causam um aumento na atividade da AChE e um desequilíbrio nos níveis de neurotrofinas, culminando em alterações cognitivas importantes, bem como o comportamento depressivo. Além disso, a suplementação com antioxidantes apresentou efeitos benéficos em todos os parâmetros analisados, sugerindo que o estresse oxidativo deve ser considerado um importante mecanismo fisiopatológico subjacente ao dano cerebral observado na DXB.

Palavras-chave: Doença da urina do xarope do bordo; Aminoácidos de cadeia ramificada; Acetilcolinesterase; Neurotrofinas; Déficit cognitivo; Sintomas depressivos.

ABSTRACT

Maple syrup urine disease (MSUD) is an inherited metabolic disease characterized predominantly by neurological dysfunction. However, the pathophysiology of brain damage remains poorly understood. Thus, the aim of this study was to evaluate neurochemical and behavioral effects of acute and chronic administration of branched chain amino acids (BCAA) in the Wistar rat brain, and the whether antioxidant (N-acetylcysteine and deferoxamine) treatment can be effective with an adjuvant therapy in the treatment of MSUD. The results demonstrated that acute administration of BCAA to infants and young rats caused an increase in acetylcholinesterase (AChE) activity in hippocampus, striatum and cerebral cortex, without concomitant changes the gene expression of this enzyme in the cerebral cortex and striatum. In the hippocampus was showed a decreased *ache* gene expression. Similar results were obtained after chronic administration, and antioxidant treatment was able to prevent this change. Although significantly decreased *ache* mRNA levels were observed in the striatum, and increased mRNA levels were detected in the cerebral cortex in the MSUD and MSUD supplemented with antioxidants groups. The levels of nerve growth factor (NGF) were reduced in the hippocampus following acute and chronic BCAA administration, and antioxidant treatment prevented this effect. Expression analysis of the *ngf* gene demonstrated a decrease in the levels of *ngf* mRNA after acute BCAA administration in infants rats, whereas that antioxidant treatment increased gene expression. Furthermore, the results demonstrated that acute exposure of infants rats to BCAA increased the levels of pro-brain-derived neurotrophic factor (pro-BDNF) and total-BDNF in the hippocampus and striatum, followed by a decrease in the protein levels of tissue plasminogen activator (tPA). In young rats, increased levels of pro-BDNF and total-BDNF, as well as decreased tPA levels, were observed only in the striatum. However, prolonged exposure to BCAA increased the levels of total-BDNF without altering the protein content of pro-BDNF in the hippocampus and cerebral cortex. Additionally, it was observed that supplementation with antioxidants prevented an increase in total-BDNF levels through a down-regulation of *bdnf* gene expression. The effect of BCAA administration on cognitive and depressive behavior was also evaluated. The results showed that acute and chronic BCAA administration caused cognitive impairment and

prolonged exposure to BCAA led to an anhedonia-like behavior, as well as to increased adrenal gland weight and immobility time. Additionally, supplementation with antioxidants and treatment with imipramine were able to prevent the behavioral alterations observed in this study. These results indicated that BCAA cause an increase in AChE activity and a disrupting normal neurotrophin levels, leading to critical cognitive alterations and depressive-like symptoms. Additionally, supplementation with antioxidants showed beneficial effects on all of the parameters analyzed, suggesting that oxidative stress should be considered as an important pathophysiological mechanism of subjacent tissue damage in patients with MSUD.

Keywords: Maple syrup urine disease; Branched chain amino acids; Acetylcholinesterase; Neurotrophins; Cognitive impairment; Depressive-like symptoms.

Lista de Figuras

- Figura 1:** Rota catabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada.....48
- Figura 2:** Esquema representativo das neurotrofinas e de seus receptores específicos.....61
- Figura 3:** Representação esquemática de uma sinapse colinérgica65
- Figura 4:** Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade84
- Figura 5:** Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 30 dias de idade85
- Figura 6:** Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada e antioxidantes (ATX) sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante seu desenvolvimento.....86
- Figura 7:** Expressão de mRNA do gene da acetilcolinesterase (*ache*) após a administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 10 (A) e 30 (B) dias de idade87
- Figura 8:** Expressão de mRNA do gene da acetilcolinesterase (*ache*) após a administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada e antioxidantes (ATX) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante seu desenvolvimento88
- Figura 9:** Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis proteicos do fator de crescimento neural (NGF) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade89
- Figura 10:** Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis proteicos do fator de crescimento neural

(NGF) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 30 dias de idade 90

Figura 11: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada e antioxidantes (ATX) sobre os níveis proteicos do fator de crescimento neural (NGF) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante seu desenvolvimento..... 91

Figura 12: Expressão de mRNA do gene do fator de crescimento neural (*ngf*) após a administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) em animais de 10 dias de idade (A), 30 dias de idade (B) e a administração crônica de AACR e antioxidantes (C) no hipocampo de ratos durante seu desenvolvimento..... 92

Figura 13: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis proteicos do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade..... 93

Figura 14: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis proteicos do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 30 dias de idade..... 94

Figura 15: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis proteicos do pro-BDNF no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 10 (A) e 30 (B) dias de idade. 95

Figura 16: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis proteicos de tPA no cérebro de ratos com 10 dias de idade (A) e 30 dias de idade (B)..... 96

Figura 17: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis proteicos de S100A10 em cérebro de ratos com 10 dias de idade (A) e 30 dias de idade (B). 97

Figura 18: Expressão de mRNA do gene do *S100A10* (A) e *tPA* (B) após a administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) no hipocampo e estriado de ratos com 10 dias de idade. 98

Figura 19: Expressão de mRNA do gene do <i>S100A10</i> (A) e <i>tPA</i> (B) após a administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) no estriado de ratos com 30 dias de idade.	99
Figura 20: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes (ATX) sobre os níveis proteicos do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante o seu desenvolvimento.	100
Figura 21: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes (ATX) sobre os níveis proteicos de pro-BDNF no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante o seu desenvolvimento.	101
Figura 22: Expressão de mRNA do gene do <i>bdnf</i> após a administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes (ATX) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante o seu desenvolvimento.	102
Figura 23: Efeito da administração aguda aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre a memória de curto (1,5 h após o treino) e longo prazo (24 h após o treino) durante a tarefa de esQUIVA inibitória.	104
Figura 24: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) na aquisição (A) e retenção (B) de memória durante o teste de esQUIVA inibitória de múltiplos treinos.	105
Figura 25: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes sobre a memória de longo prazo (24 h após o treino) durante a tarefa de esQUIVA inibitória.....	106
Figura 26: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes na aquisição (A) e retenção (B) de memória durante o teste de esQUIVA inibitória de múltiplos treinos. ...	107
Figura 27: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre a memória não aversiva na tarefa de habituação ao campo aberto.	109

Figura 28: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes sobre a memória não aversiva na tarefa de habituação ao campo aberto.	109
Figura 29: Efeito da administração aguda aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) (A) e da administração de crônica de AACR e antioxidantes (B) sobre a memória não aversiva na tarefa reconhecimento de objetos.	111
Figura 30: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), antioxidantes e imipramina sobre o consumo de sacarose, durante o teste anedonia.	112
Figura 31: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), antioxidantes e imipramina sobre o peso da glândula adrenal.	113
Figura 32: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), antioxidantes e imipramina sobre o tempo de imobilidade durante a tarefa de nado forçado.	114
Figura 33: Figura representativa dos efeitos dos aminoácidos sobre parâmetros neuroquímicos em cérebro de ratos durante o seu desenvolvimento	124

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Classificação dos fenótipos da DXB baseada nas manifestações clínicas e na atividade da enzima CDCCR 51
- Tabela 2.** Sequências dos iniciadores para as experiências de RT-qPCR incluídos no estudo..... 77
- Tabela 3.** Sequências dos iniciadores para as experiências de RT-PCR incluídos no estudo..... 78
- Tabela 4.** Comprometimento comportamental após a administração aguda e crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), usando o protocolo SHIRPA. 103
- Tabela 5.** Efeitos da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), antioxidantes (ATX) e imipramina (IMI) sobre o peso corporal no dia 0 (A) e dia 22 (B)..... 113

Lista de Abreviaturas

- AACR – Aminoácidos de cadeia ramificada
AChE – Acetilcolinesterase (do inglês *acetylcholinesterase*)
AcSch – Iodeto de acetilcolina (do inglês *acetylthiocholine iodide*)
Akt - proteína quinase B (do inglês *protein kinase B*)
APAF-1 – Fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1 (do inglês *apoptotic peptidase activating factor 1*)
ATX – Antioxidante
BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)
BHE – Barreira hematoencefálica
cAMP – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (do inglês *3,5-cyclic adenosine monophosphate*)
CDCCR – Complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada
CEUA – Comissão de ética no uso de animais
CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CREB – Proteína de ligação dos elementos responsivos ao cAMP (do inglês *cAMP responsive element binding protein*)
DFX – Desferroxamina
DO – Densidade óptica
DOI – Densidade óptica integrada
DTNB – Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (do inglês *5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*)
DXB – Doença da urina do xarope do bordo
EIM – Erros inatos do metabolismo
ELISA – Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*)
GABA – Ácido gama-aminobutírico (do inglês *gamma-aminobutyric acid*)
GDNF – Fator neurotrófico derivado da glia (do inglês *glial cell line-derived neurotrophic factor*)
GFAP – Proteína ácida fibrilar glial (do inglês *glial fibrillary acidic protein*)
GPx – Glutaciona peroxidase
GSH – Glutaciona reduzida

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high-performance liquid chromatography*)

IMI – Imipramina

JNK – c-Jun N-terminal quinase (do inglês *Jun N-terminal kinase*)

LTM – Memória de longa duração (do inglês *long-term memory*)

LTP – Potenciação a longo prazo (do inglês *long-term potentiation*)

MAPK – Quinase ativada por mitógeno (do inglês *mitogen-activated protein kinase*)

mBDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo maduro (do inglês *mature brain-derived neurotrophic factor*)

mRNA – RNA mensageiro (do inglês *messenger RNA*)

NAC – N-acetilcisteína

NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido reduzida (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide reduced*)

NGF – Fator de crescimento neural (do inglês *nerve growth factor*)

NMDA – N-metil D-aspartato

NO – Óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)

NT3 – Neurotrofina 3 (do inglês *neurotrophin-3*)

NT4 – Neurotrofina 4 (do inglês *neurotrophin-4*)

p75NTR – Receptor de neurotrofina p75 (do inglês *p75 neurotrophin receptor*)

PAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1 (do inglês *plasminogen activator inhibitor-1*)

PBS – Tampão fosfato-salina (do inglês *phosphate buffered saline*)

PI-3-Kinase – Fosfatidilinositol-3-quinase (do inglês *phosphoinositide 3-kinase*)

PKA – Proteína quinase dependente de cAMP (do inglês *cAMP Dependent Protein Kinase*)

PKC – Proteína quinase C (do inglês *protein kinase C*)

PLC- γ – Fosfolipase C-C- γ (do inglês *phospholipase C - γ*)

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa (do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*)

SDS-PAGE – Dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (do inglês *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide*)

SH – Grupo tiol

SHIRPA – do inglês *SmithKline / Harwell / ImperialCollege / RoyalHospital / Phenotype Assessment*

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

SPSS – Pacote estatístico para as ciências sociais (do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*)

siRNA – RNA de interferência (do inglês *small interfering RNA*)

STM – Memória de curta duração (do inglês *short-term memory*)

SUS – Sistema Único de Saúde

tPA – Ativador do plasminogênio tecidual (do inglês *tissue plasminogen activator*)

Trk – Receptor tirosina quinase (do inglês *tyrosine kinase receptor*)

TTBS – Tampão tween-tris-salina

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	46
1. Erros Inatos do Metabolismo	46
2. Doença da Urina do Xarope do Bordo	47
2.1 Histórico	47
2.2 Etiologia	47
2.3 Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada.....	49
2.3.1 Complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada	49
2.4 Aspectos Genéticos.....	50
2.5 Manifestações Clínicas	51
2.6 Diagnóstico e Tratamento	53
2.7 Achados Neuropatológicos e Comportamentais	55
2.8 Fisiopatologia do Dano Neurológico	56
3 Fatores Neurotróficos	59
4 Acetilcolinesterase.....	63
5 Terapia Antioxidante.....	66
6 Justificativa.....	68
II. OBJETIVOS	69
7.1 Objetivo Geral	69
7.2 Objetivos Específicos	69

III. METODOLOGIA	71
8.1 Desenho Experimental	71
8.1.1 Modelo Quimicamente Induzido de DXB	71
8.1.2 Administração do <i>Pool</i> de aminoácidos de cadeia ramificada	72
8.1.3 Administração Aguda	72
8.1.4 Administração Crônica	73
8.2 Avaliações Neuroquímicas	73
8.2.1 Preparação dos Tecidos.....	73
8.2.2 Níveis Proteicos de BDNF e NGF	74
8.2.3 Immunoblotting	74
8.2.4 Atividade da Acetilcolinesterase.....	75
8.2.5 Expressão gênica analisada por PCR quantitativo em tempo real	76
8.2.6 Expressão gênica analisada por PCR semi-quantitativo	77
8.3 Testes Comportamentais.....	79
8.3.1 SHIRPA	79
8.3.2 Esquiva Inibitória.....	80
8.3.3 Esquiva Inibitória de Treinos Contínuos	80
8.3.4 Habituação ao Campo Aberto (<i>Open Field</i>)	81
8.3.5 Memória de reconhecimento de objetos	81
8.3.6 Teste de Anedonia	82
8.3.7 Nado Forçado.....	82

8.4 Peso Corporal e da Glândula Adrenal	83
8.5 Análise Estatística	83
IV. RESULTADOS	84
V. DISCUSSÃO	115
VI. CONCLUSÃO	128
VII. REFERÊNCIAS	129
ANEXOS	162

I. INTRODUÇÃO

1 Erros Inatos do Metabolismo

Em 1908, Sir Archibald E. Garrod usou o termo Erros Inatos do Metabolismo (EIM) para designar doenças como a alcaptonúria, em que os indivíduos afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. Garrod observou uma maior frequência desta doença em indivíduos de uma mesma família e uma maior incidência de consanguinidade entre os pais dos pacientes. Assim, baseando-se nas leis de Mendel e no fato de que os pais dos indivíduos afetados não apresentavam a doença, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio. Através da observação de que o ácido homogentísico presente em excesso na urina dos pacientes era um metabólito normal da degradação proteica, ele relacionou este acúmulo a um bloqueio na rota do catabolismo da tirosina (Garrod, 1909).

Com o surgimento de novos distúrbios relacionados a alterações genéticas e que envolviam o acúmulo de outras substâncias nos líquidos biológicos dos pacientes, postulou-se que estas doenças resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, enzimática ou não, pertencente ao metabolismo (Scriver et al., 2001). Presumiu-se, então, que em consequência deste bloqueio metabólico pode ocorrer o acúmulo de precursores da reação catalisada pela enzima envolvida, com a formação de rotas metabólicas alternativas e a deficiência de produtos essenciais ao organismo (Bickel, 1987).

Os EIM são individualmente raros, porém são frequentes quando analisados em conjunto, atingindo um em cada mil nascidos vivos (Jimenez-Sanchez et al., 2001). Essas doenças correspondem a cerca de 10% de todas as doenças genéticas e, atualmente, já foram descritos aproximadamente 500 distúrbios envolvendo defeitos na síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Jimenez-Sanchez et al., 2001). A ausência ou a deficiência grave da atividade enzimática leva a um bloqueio metabólico com acúmulo de substratos e seus derivados. Dependendo da importância da rota afetada, este bloqueio repercute de forma clínica variável, geralmente provocando sintomatologia grave, que na maioria das vezes afeta o sistema nervoso central (SNC) (Scriver et al., 2001).

2 Doença da Urina do Xarope do Bordo

2.1 Histórico

Em 1954, John Menkes e colaboradores descreveram quatro casos de uma doença cerebral degenerativa, caracterizada por edema cerebral, convulsões, espasticidade e sofrimento respiratório, com início na primeira semana de vida e morte dentro de três meses. A característica mais proeminente foi o forte odor de açúcar queimado na urina, semelhante ao do xarope do bordo. Fato esse que deu origem ao nome, Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) (Menkes et al., 1954). Em 1957, Westall e colaboradores observaram outro caso semelhante e encontraram concentrações elevadas dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR). Cinco anos após descrever a doença, em 1959, Menkes relatou o alto nível do ácido α -cetoisocapróico na urina de crianças com DXB. Na década de 60 a deficiência do complexo enzimático responsável pela descarboxilação dos α -cetoácidos de cadeia ramificada foi identificada como causa bioquímica da DXB, através de estudos enzimáticos em leucócitos e fibroblastos de pacientes afetados (Dancis et al., 1960). O primeiro tratamento proposto foi em 1964 por Snyderman e colaboradores, os quais sugeriram uma dieta que consiste na restrição dos AACR.

2.2 Etiologia

A DXB é um distúrbio de herança autossômica recessiva (Danner e Elsas, 1989; Nobukuni et al., 1991) causado pela deficiência na atividade do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR), com uma incidência mundial estimada em 1:185.000 nascidos vivos (Chuang e Shih, 2001). Este bloqueio resulta no acúmulo dos AACR, leucina, isoleucina e valina e de seus respectivos α -cetoácidos de cadeia ramificada, ácido α -cetoisocapróico, ácido α -ceto- β -metilvalérico e ácido α -cetoisovalérico, bem como os seus hidroxilácidos correspondentes, ácido α -hidroxiisocapróico, ácido α -hidroxiisovalérico e ácido 2-hidroxi-3-metilvalérico (Figura 1) (Meister, 1965; Chuang e Shih, 2001).

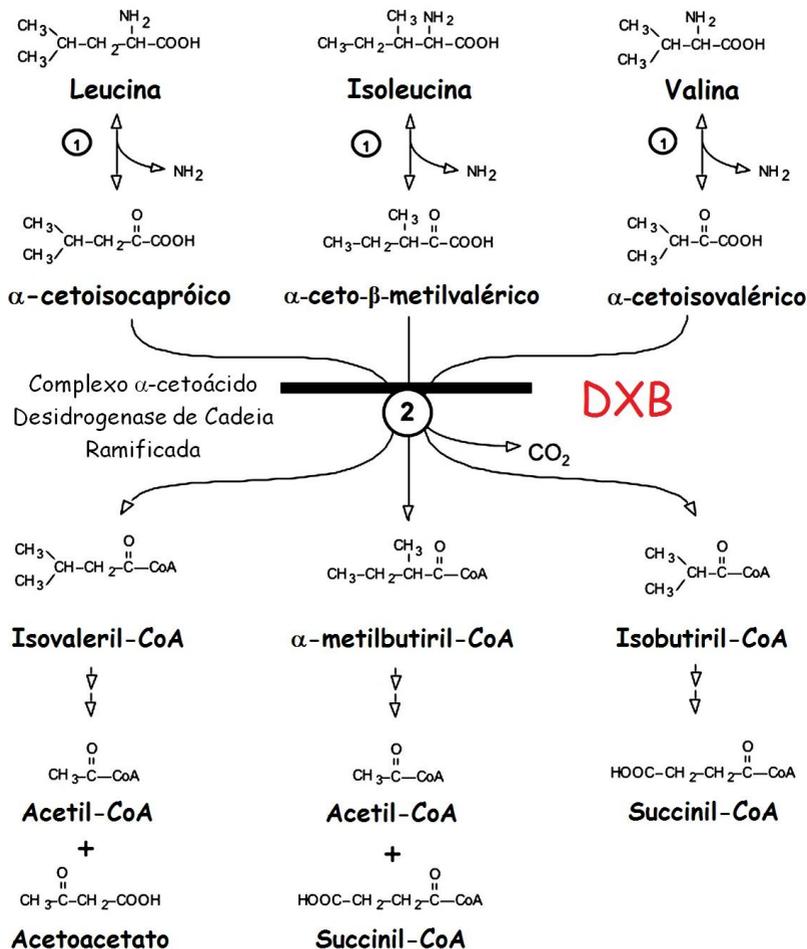


Figura 1: Rota catabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina. As duas primeiras reações comuns são catalisadas pelas seguintes enzimas: transaminação reversível pela aminotransferase dos AACR (1) e a descarboxilação oxidativa dos cetoácidos de cadeia ramificada e esterificação da coenzima A pelo complexo α -cetoácido desidrogenase (2). Em destaque, demonstrando o bloqueio que ocorre na Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB), devido à deficiência do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (Adaptado de Chuang e Shih, 2001).

2.3 Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada

A leucina, isoleucina e valina são aminoácidos essenciais constituídos por quatro ou mais átomos de carbono com um grupamento metila que ramifica a cadeia de carbonos na posição 3 ou 4. Estes aminoácidos possuem uma rota catabólica em comum, participando como fonte alternativa de energia, constituída por quatro etapas distintas. Após a ingestão, os AACR são metabolizados pelo músculo esquelético como fonte alternativa de energia e também oxidados nos rins, coração, tecido adiposo e cérebro, sendo que o principal destino metabólico dos AACR é a incorporação em proteínas corporais (Schadewaldt e Wendel, 1997).

A via de catabolismo dos AACR tem início com o transporte destes aminoácidos para dentro da célula através do sistema de transporte L, localizado na membrana plasmática. No interior das células, os AACR, sofrem três passos iniciais comuns na sua via metabólica. Primeiramente ocorre uma transaminação reversível catalisada pela aminotransferase de cadeia ramificada, a qual existe em duas isoformas, sendo uma citosólica e a outra mitocondrial, produzindo os α -cetoácidos de cadeia ramificada, ácido α -cetoisocapróico a partir de leucina, ácido α -ceto- β -metilvalérico a partir de isoleucina e ácido α -cetoisovalérico a partir de valina. Os α -cetoácidos de cadeia ramificada são então translocados para dentro da mitocôndria por um translocador específico, onde sofrem descarboxilação oxidativa irreversível, catalisada pelo CDCCR, produzindo os respectivos acil-CoAs ramificados que são metabolizados por vias específicas. A leucina apresenta como produtos finais a acetil-CoA e o acetoacetato, a valina é convertida exclusivamente a succinil-CoA e a isoleucina produz acetil-CoA e succinil-CoA. Os AACR são, portanto, tanto cetogênicos, quanto glicogênicos, servindo como precursores para a síntese de ácidos graxos e do colesterol e também servindo como substrato para a produção de energia via succinil-CoA e acetoacetato (Chuang e Shih, 2001).

2.3.1 Complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada

O CDCCR é um complexo multienzimático localizado na membrana mitocondrial interna das células de mamíferos (Yeaman, 1986; Chuang e Shih, 2001), envolvido da descarboxilação dos AACR

(leucina, valina e isoleucina) (Parella et al., 1994; Chuang e Shih, 2001). A atividade deste complexo regula o fluxo dos AACR usados para a obtenção de energia, e é o passo irreversível da via catabólica. O complexo CDCCR é um membro do grupo de complexos de desidrogenases de α -cetoácidos bastante conservados, possuindo três componentes catalíticos: uma α -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada heterotetramérica ($\alpha_2\beta_2$), ou E1; uma dihidrolipoil trasacilase (24 subunidades idênticas), ou E2; e uma di-hidrolipoamida desidrogenase homodimérica, ou E3. Os componentes E1 e E2 são específicos para CDCCR, enquanto a proteína E3 é também componente dos complexos α -cetoglutarato e piruvato desidrogenase (Reed e Hackert, 1990). Além disso, o complexo CCDDR de mamíferos apresenta duas enzimas regulatórias; uma quinase e uma fosfatase que regulam a atividade do complexo através dos ciclos de fosforilação (inativação)/desfosforilação (ativação) de dois resíduos de serina da subunidade E1 α (Eisenstein et al., 1991; Peinemann e Danner, 1994).

O componente E1 catalisa uma descarboxilação dos α -cetoácidos mediada pela tiamina pirofosfatase, reduzindo a molécula de lipoil covalentemente ligada a E2. A molécula do lipoil reduzida e o domínio lipoil servem como um braço móvel para transferir o grupo acil do componente E1 para a CoA, aumentando a quantidade de acil-CoA. Finalmente, o componente E3, que é fortemente ligado ao FAD, reoxida o resíduo de di-hidrolipoil do componente E2 tendo o NAD⁺ como último acceptor de elétrons (Reed e Hackert, 1990; Treacy et al., 1992; Peinemann e Danner, 1994; Chuang e Shih, 2001). O resultado final da reação da desidrogenase dos AACR é a produção de acil-CoA de cadeia ramificada, dióxido de carbono (CO₂) e NADH na proporção de 1:1:1 (Danner et al., 1979).

2.4 Aspectos genéticos

O CDCCR humano é codificado por seis locos genéticos (E1 α , E1 β , E2, E3, CDCCR quinase e CDCCR fosfatase). Com base na subunidade afetada do CDCCR humano, a DXB é classificada em quatro grupos moleculares (Chuang e Shih, 2001; Chuang et al., 2008), estes incluem tipo I α para as mutações no gene *BCKDHA* (subunidade E1 α); tipo I β para as mutações encontradas no gene *BCKDHB* (subunidade E1 β), tipo II para mutações no gene *DBT* (subunidade E2) e tipo III para mutações no gene *DLD* (subunidade E3) (Fisher et al.,

1991; Nellis e Danner, 2001; Rodríguez-Pombo et al., 2006; Quantal et al., 2008). Atualmente, mais de 166 mutações em três subunidades catalíticas que causam a DXB já foram descritas: 50 mutações do tipo Ia, 53 do tipo Ib, 49 do tipo II e 14 no tipo III (Chuang et al., 2008).

2.5 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da DXB são variáveis e dependem da atividade enzimática residual, a qual será responsável por diferentes fenótipos clínicos, sendo eles classificados em forma clássica, intermediária, intermitente, responsiva à tiamina e deficiência de lipoamida desidrogenase E3 (Tabela 1) (Dancis, 1972; Chuang e Shih, 2001).

Tabela 1. Classificação dos fenótipos da DXB baseada nas manifestações clínicas e na atividade da enzima CDCCR.

Fenótipo clínico	Manifestações clínicas	Atividade enzimática
Clássica	Letargia, recusa alimentar, alterações neurológicas progressivas, cetose, hipoglicemia, convulsões e coma	0-2%
Intermediário	Atraso no desenvolvimento e/ou convulsões e cetoacidose	0-30%
Intermitente	Episódios de ataxia / cetoacidose precipitado por infecções	5-20%
Responsivo à tiamina	Similar à forma intermediária	2-40%
Deficiência de E3	Sem sintomas neonatais, hipotonia, acidose láctica, atraso no desenvolvimento	0-25%

Fonte: Adaptado de Chuang e Shih, 2001.

A forma neonatal clássica é a mais comum e a mais grave da doença, representa aproximadamente 80% dos casos de DXB e os recém-nascidos afetados apresentam apenas 0-2% da atividade normal do CDCCR, podendo resultar em uma concentração de leucina superior a 2000 $\mu\text{mol/L}$. O período assintomático pode variar de um dia a duas semanas, dependendo do grau da deficiência do CDCCR e da quantidade de proteína ingerida. As manifestações clínicas iniciais são sucção débil, letargia, perda de peso e odor adocicado que lembra o odor do xarope do bordo presente na urina ou no cerúmen, iniciando geralmente nos primeiros dias de vida. Se não tratados, o quadro clínico pode evoluir para edema cerebral, opistótono, convulsões, hipotonia, irritabilidade, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e disfunção neurológica em suas diferentes formas de expressão. Além disso, pode ser observada a presença de edema generalizado e hipomielinização/desmielinização no SNC desses pacientes, principalmente durante as crises de descompensação metabólica (Chuang e Shih, 2001; Schonberger et al., 2004).

Na forma intermediária, os pacientes geralmente não manifestam sintomas no período neonatal, mas podem ter o odor de xarope do bordo presente na urina e no cerúmen e níveis elevados dos aminoácidos. Além disso, podem apresentar distúrbios alimentares e de crescimento, e atraso do desenvolvimento durante a infância, ou apresentar um quadro de retardo mental progressivo e inespecífico (Chuang e Shih, 2001). Tais pacientes apresentam um diagnóstico mais tardio, entre cinco meses e sete anos de idade, e 0-30% da atividade normal do CDCCR. No entanto, os pacientes são vulneráveis às mesmas sequelas agudas ou crônicas dos pacientes com a forma clássica, incluindo a descompensação metabólica que pode levar ao óbito.

Na forma intermitente da doença, os pacientes apresentam 5-20% da atividade normal do CDCCR e os sintomas surgem mais tarde. Da mesma maneira que a forma intermediária, nesta forma o diagnóstico é tardio, uma vez que os níveis aumentados de AACR estão presentes apenas nas crises agudas, ocorrendo quando o paciente apresenta atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e/ou crises metabólicas agudas, normalmente precipitadas por um quadro infeccioso ou devido a sobrecarga proteica na dieta (Chuang e Shih, 2001; Wendel e Baulny, 2006).

A forma responsiva à tiamina é similar à forma intermediária, os pacientes apresentam 2-40% da atividade normal do CDCCR, e consequentemente não apresentam sintomas no período neonatal, mas

na vida adulta podem apresentar um curso semelhante à forma intermediária. O diferencial se dá pelo fato de que os pacientes possuem melhora do quadro clínico e dos exames laboratoriais quando submetidos ao teste terapêutico com tiamina (Chuang et al., 2004).

Na forma por deficiência da subunidade E3, os sintomas podem surgir no período neonatal ou mais tarde, associados à acidose láctica grave (Chuang e Shih, 2001). A subunidade E3 do CDCCR também é componente dos complexos α -cetoglutarato e piruvato desidrogenase. Portanto, este tipo de DXB apresenta fenótipos clínico e bioquímico distintos, caracterizados por elevações plasmáticas de lactato, piruvato e alanina (Chuang e Shih, 2001; Strauss et al., 2006a).

2.6 Diagnóstico e Tratamento

A DXB pode ser identificada em um teste de triagem neonatal (Teste do Pezinho), fornecendo um resultado semi-quantitativo quando realizada por cromatografia de aminoácidos, ou quantitativo quando realizado por espectrometria de massa em Tandem (Tandem MS/MS). No entanto, no Brasil, o Teste do Pezinho fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) não contempla a DXB, sendo este fornecido apenas por laboratórios privados (Souza et al., 2002).

O diagnóstico da DXB é fundamentalmente laboratorial e geralmente é realizado em três situações: paciente com teste de triagem positivo para DXB, pacientes com sintomas sugestivos de DXB ou pacientes com história familiar positiva para DXB (Chuang e Shih, 2001; Strauss et al., 2006a).

A identificação de concentrações plasmáticas e urinárias elevadas de leucina, isoleucina e valina é feita por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), autoanalisador de aminoácidos ou por espectrometria de massa em Tandem. No entanto, o perfil normal destes aminoácidos não pode excluir o diagnóstico da forma intermitente que geralmente é diagnosticada durante a descompensação aguda. Os cetoácidos de cadeia ramificada α -ceto-isocapróico, α -ceto-isovalérico e α -ceto-3-metilvalérico podem ser detectados pela análise de ácidos orgânicos na urina através da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-MS) (Chuang e Shih, 2001; Chuang et al., 2006). Além disso, outras análises podem ser realizadas, como a avaliação da atividade enzimática CDCCR em linfócitos, fibroblastos da pele ou biópsia de fígado, no entanto estes exames não são realizados rotineiramente (Schadewalt et al., 2001; Strauss et al., 2006a).

As concentrações plasmáticas normais dos AACR, depois de 2 a 3 horas de ingestão de proteína, são: leucina entre 80-200 $\mu\text{mol/L}$ (1,0-2,6 mg/dl), isoleucina 40-90 $\mu\text{mol/L}$ (0,5-1,2 mg/dl) e valina 200-425 $\mu\text{mol/L}$ (2,3-5,0 mg/dl) (Wendel e Baulny, 2006). Entretanto, em pacientes com DXB não tratados, a leucina, principal metabólito acumulado na doença, pode atingir níveis plasmáticos de até 5 mM, enquanto a isoleucina e a valina atingem 1 mM (Zielke et al., 1996).

Essencialmente, o tratamento da DXB visa restaurar a homeostase do metabolismo intermediário e evitar a descompensação metabólica através da manutenção da síntese de proteína normal e prevenção de catabolismo proteico, da prevenção de desequilíbrios ou deficiências de aminoácidos e intermediários metabólicos, da atenuação da disfunção celular, da restauração da homeostase energética e da promoção de anabolismo.

Do ponto de vista clínico, existem dois tipos de tratamento: o tratamento da fase aguda (durante crises de descompensação metabólica) e o tratamento da fase de manutenção. Na fase aguda o tratamento é baseado em três pontos: rápida redução das concentrações dos níveis de AACR, suporte nutricional e indução do anabolismo através do aporte de proteínas hidrolisadas isentas de AACR. Caso necessário podem ser utilizadas outras estratégias, tais como diálise peritonial, hemodiálise, hemofiltração (Calvo et al., 2000; Strauss et al., 2006a). Na fase de manutenção preconiza-se como tratamento uma dieta pobre em proteínas, com baixo conteúdo de AACR e suplementada com uma fórmula semissintética que consiste em um complemento alimentar isento de AACR que contém uma mistura de outros aminoácidos, carboidratos, vitaminas minerais e oligoelementos (Strauss et al., 2006a). Recentemente, as fórmulas para pacientes com DXB foram enriquecidas com aminoácidos essenciais (por exemplo, triptofano, tirosina, fenilalanina, metionina e treonina) que competem com os AACR pelo transportador de aminoácidos neutros no cérebro, visando diminuir o aporte de AACR para cérebro, uma vez que estes competem pelo mesmo transportador (Strauss et al., 2010). Esse tratamento visa diminuir o acúmulo de metabólitos tóxicos, principalmente do aminoácido leucina e seu respectivo α -cetoácido, minimizando seus efeitos deletérios ao SNC. Desta forma, o objetivo do tratamento é manter os níveis plasmáticos de leucina o mais próximo possível dos valores de referência, que se encontram entre 77 e 153 $\mu\text{mol/L}$ (Lepage et al., 1997) ou, preferencialmente, entre 100 e 300 μmol que são limites aceitáveis no sentido de evitar danos (Morton et al., 2002). Contudo, a

disfunção neurológica pode ser observada em muitos pacientes, uma vez que o desenvolvimento mental está relacionado à idade de início da terapia (que deve ser o mais precoce possível), à duração dos períodos de descompensação metabólica e, ainda, ao estrito cumprimento da dieta em longo prazo (Chuang e Shih, 2001; Morton et al., 2002; Strauss et al., 2010).

Outra opção terapêutica proposta recentemente é o transplante hepático, no entanto a experiência relacionada a esta prática é muito limitada. A possibilidade de passar de uma dieta restrita para uma dieta livre é contrastada com os problemas cirúrgicos, bem como os riscos de imunossupressão (Strauss et al., 2006b; Mazariegos et al., 2012).

2.7 Achados neuropatológicos e comportamentais

Na maioria dos pacientes com DXB observa-se encefalopatia com edema cerebral generalizado podendo haver também a formação de edema intenso localizado envolvendo o tronco cerebral dorsal, os pedúnculos cerebrais e a cápsula interna (Riviello et al., 1991; Treacy et al., 1992). Estudos relatam também a ocorrência de hipodensidade difusa no globo pálido e tálamo afetando a substância branca destas regiões, o que é um indicativo de hipomielinização (Treacy et al., 1992). A fase aguda do edema também é seguida por alargamento do sulco sobre os lobos frontais e das fissuras inter-hemisférica e silviana, indicando atrofia cerebral (Rudiger et al., 1972). Paralelamente à deficiência de mielina, observa-se redução de oligodendrócitos (Kamei et al., 1992). Estudos demonstram alterações expressivas no cerebelo com panecrose da camada de células granulares com prevenção das células de Purkinje. Nos núcleos da base e substância negra observou-se perda neuronal considerável (Kiil e Rokkones, 1964; Chuang e Shih, 2001). Recentemente, achados radiológicos apontam sinais aumentados em neuroimagens (T2) compatíveis com modificações no conteúdo aquoso na substância branca característico da desmielinização. Klee e colaboradores (2013) demonstraram sinais de anormalidades na substância branca e anisotropia fracionada reduzida em adolescentes e jovens adultos com controle dietético, indicando uma redução na quantidade de feixes de fibras em oito regiões distintas cerebrais (matéria branca dos hemisférios cerebrais, membro dorsal da cápsula interna, tronco cerebral e cerebelo). As áreas mais afetadas são mesencéfalo, tronco cerebral, tálamo e o globo pálido (Schonberger et al., 2004). No entanto, há relatos que também descrevem o

envolvimento seletivo dos núcleos de nervos cranianos, cerebelo, núcleos vermelhos, núcleos dentados, fórnix, esplênio, corpo caloso, córtex cerebral, gânglios basais e o trato piramidal da medula espinhal (Chuang e Shih, 2001; Jan et al., 2003; Zuccoli et al., 2010).

Alterações comportamentais também são atribuídas ao acúmulo de AACR e seus respectivos α -cetoácidos. Walsh e Scott (2010) demonstraram alterações no perfil neurocognitivo de uma paciente com diagnóstico de DXB, onde foi observado nessa paciente um déficit no raciocínio não-verbal e visual-espacial, além disso, foram observadas alterações adicionais, como déficit de atenção e no controle motor fino e prejuízo das funções executivas. Mello e colaboradores (1999), utilizando um modelo crônico de injeções de leucina, observaram déficit comportamental de longa duração em ratos submetidos a duas tarefas diferentes de aprendizado (habituação ao campo aberto e esQUIVA ativa de duas vias), sugerindo que a leucina e seu α -cetoácido causam alterações em processos associados com a aprendizagem. Coitinho e colaboradores (2001) demonstraram que animais submetidos à administração intraestriatal de α -cetoácidos de cadeia ramificada apresentam comportamento convulsivante. Foi também demonstrado que a administração intrahipocampal de α -cetoácidos de cadeia ramificada provoca déficit cognitivo em tarefas aversivas e não aversivas (Vasques et al., 2005). Nesse contexto, foi recentemente demonstrado que uma única administração intrahipocampal de leucina em ratos adultos prejudica a consolidação da memória, e causa comprometimento na formação da potencialização de longa duração (LTP) (Glaser et al., 2010).

Além das alterações neurocognitivas, estudos têm demonstrado que pacientes com DXB na idade adulta apresentam um elevada taxa de distúrbios neuropsiquiátricos, como o transtorno de déficit de atenção, depressão e ansiedade (le Roux et al., 2006; Strauss et al., 2006a, Walterfang et al., 2013). Muelly e colaboradores (2013) demonstraram que as deficiências neuroquímicas previamente demonstradas em pacientes com DXB e em modelos animais podem persistir no estado crônico, embora em menor grau, e cumulativamente, contribuir para a morbidade neuropsiquiátrica.

2.8 Fisiopatologia do dano neurológico

Embora estejam elucidados os vários fenótipos clínicos da DXB, a fisiopatologia dos sintomas neurológicos e dos danos cerebrais

dos pacientes com esta doença ainda é pouco conhecida. Tashian, em 1961, demonstrou que o α -cetoisocapróico, α -cetoisovalérico e a leucina inibem competitivamente a atividade da enzima glutamato descarboxilase em homogeneizados de cérebro de ratos. Os hidroxíácidos, α -hidroxiisocapróico e α -hidroxiisovalérico, também apresentam tal efeito, porém em menor grau. Além disso, foi demonstrado que na presença de um excesso de α -cetoisocapróico, o conteúdo de glutamato em cultura de astrócitos diminui cerca de 50%, aumentando sua velocidade de oxidação. O mecanismo proposto foi a transferência do grupo amino do glutamato para o α -cetoisocapróico levando a formação de leucina e α -cetoglutarato que é oxidado no ciclo de Krebs (Yudkoff et al., 1993; Huang et al., 1996; Zielke et al., 1997). Além de aumentar a velocidade de oxidação de glutamato, níveis elevados de α -cetoisocapróico também aumentam a oxidação da glutamina (Zielke et al., 1996) e inibem a síntese da glutamina em cultura de astrócitos (Yudkoff et al., 1994). Estudos apontam para uma diminuição da captação de glutamato por vesículas sinápticas no cérebro de ratos jovens. Nestes modelos foi demonstrado que os α -cetoácidos de cadeia ramificada e AACR inibem a captação de glutamato em concentrações similares a de pacientes em descompensação metabólica, sendo sugerido inclusive um mecanismo de inibição competitiva entre estes metabólitos (Reis et al., 2000; Tavares et al., 2000). Foi também demonstrada uma perda marcante no número de receptores pós-sinápticos GABA_A em um modelo animal de DXB em bovinos (Dodd et al., 1992).

Segundo Gibson e Blass (1976), o α -cetoisocapróico é o mais tóxico dos cetoácidos. Ele inibe o consumo de oxigênio no cérebro de cobaias e provoca deficiência na formação de mielina no cerebelo de ratos. Alguns estudos demonstraram que a elevação sérica de leucina e α -cetoisocapróico no espaço extracelular altera a concentração no SNC dos aminoácidos transportados pelo transportador dos aminoácidos neutros de cadeia longa (sistema L) que incluem a metionina, valina, isoleucina, triptofano, tirosina, fenilalanina e glutamina (Araújo et al., 2001), afetando assim a biossíntese de alguns neurotransmissores cerebrais como as catecolaminas e a serotonina (Huang et al., 1996; Zielke et al., 1997; Wajner e Vargas, 1999; Wajner et al., 2000; Araújo et al., 2001; Zinnanti et al., 2009). Neste contexto, Yuwiler e Geller (1965) demonstraram que o excesso de leucina na dieta provoca redução de serotonina cerebral.

Jouvet e colaboradores descreveram efeitos deletérios dos α -cetoácidos de cadeia ramificada e dos AACR sobre a viabilidade celular de fibroblastos cultivados da pele de um paciente com DXB. Pela proposição dos autores, a apoptose foi ativada pela presença de níveis elevados de α -cetoácidos de cadeia ramificada e AACR semelhantes aos encontrados nos pacientes (Jouvet et al., 2000a; Jouvet et al., 2000b). Funchal e colaboradores (2004a) demonstraram, em cultura de astrócitos, que os α -cetoácidos de cadeia ramificada levam a morte celular em concentrações comparáveis às observadas em indivíduos afetados e que estão no estado de descompensação metabólica. Demonstraram ainda que os α -cetoácidos de cadeia ramificada alteram a fosforilação de proteínas do citoesqueleto celular, levando a reorganização da actina, da GFAP (proteína ácida fibrilar glial) e do citoesqueleto (Funchal et al., 2002; Pessoa-Pureur et al., 2002; Funchal et al., 2004b), bem como observaram que as células gliais tratadas com estes metabólitos apresentam morfologia distinta das células controles, distinguindo-se da característica poligonal e apresentando uma distribuição fusiforme (Funchal et al., 2004a).

Além disso, estudos tem demonstrado que os metabólitos acumulados na DXB podem comprometer a homeostase mitocondrial. Gibson e Blass (1976) demonstraram que α -cetoácidos inibem a oxidação da glicose e a síntese de acetilcolina, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos em fatias de cérebro de ratos, inibem a enzima ácido graxo sintetase, a oxidação do piruvato, o transporte mitocondrial de piruvato, a atividade do complexo piruvato desidrogenase e a atividade da enzima α -cetogluturato desidrogenase em cérebro de ratos. Os aminoácidos valina e isoleucina, por sua vez, inibem alostericamente a enzima piruvato quinase. Panten e colaboradores (1972) propuseram que a leucina seria a responsável pela hipoglicemia apresentada pelos pacientes com DXB, já que uma das propriedades da leucina é estimular a secreção de insulina.

Estudos *in vitro* apontam para um efeito inibitório dos α -cetoácidos de cadeia ramificada sobre a produção de CO_2 e a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória (Sgaravatti et al., 2003). Nesse mesmo modelo, foi demonstrado que os AACR, mas não os α -cetoácidos de cadeia ramificada, reduzem a atividade da creatina quinase em homogeneizados de cérebro (Pilla et al., 2003). Ribeiro e colaboradores (2008) demonstraram que os AACR produziram um efeito inibitório *in vitro* sobre a produção de CO_2 , bem como sobre a

cadeia respiratória, inibindo os complexos II-III, III e IV. Outros resultados *in vitro* indicaram que α -cetoisocapróico atua como desacoplador da fosforilação oxidativa e como um inibidor metabólico, possivelmente através do seu efeito inibitório sobre a atividade da α -cetogluturato desidrogenase, enquanto a leucina atua como um inibidor metabólico (Amaral et al., 2010).

Evidências crescentes demonstram que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia da DXB. Barschak e colaboradores (2006) demonstraram que pacientes com DXB apresentam um aumento nos níveis de peroxidação lipídica, enquanto que as concentrações de triptofano e metionina estão significativamente reduzidas. Recentemente foi demonstrado que pacientes com DXB, com uma dieta restrita de AACR apresentam um aumento significativo de no teor de malondialdeído e de carbonilas no plasma, quando comparado com pacientes controles. Além disso, os pacientes submetidos à suplementação de L-carnitina apresentaram uma acentuada redução no teor de malondialdeído em relação aos controles, reduzindo a peroxidação lipídica (Mescka et al., 2013). Estudos em animais demonstraram que os AACR (isoleucina, leucina e valina) e seus respectivos α -cetoácidos estimulam a peroxidação lipídica em cérebro de ratos jovens (Fontella et al., 2002). Além disso, foi demonstrado que estes compostos, principalmente a leucina e o ácido α -cetoisocapróico, reduzem a capacidade do cérebro em modular o dano associado ao aumento na produção de radicais livres e que a peroxidação lipídica estimulada pela leucina pode ser atenuada por antioxidantes como vitaminas C e E, glutatona reduzida (GSH) e superóxido dismutase (Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005a; Bridi et al., 2005b). Recentemente, Mescka e colaboradores (2011) demonstraram que animais submetidos a um modelo quimicamente induzido de DXB apresentaram um aumento nos níveis de peroxidação lipídica, dano a proteínas e diminuição da atividade da catalase e glutatona peroxidase (GPx), alterações que foram evitadas pela administração de L-carnitina.

3 Fatores Neurotróficos

A família das neurotrofinas é composta por fatores regulatórios que medeiam à diferenciação e a sobrevivência de neurônios e modulam a transmissão e plasticidade sináptica (Bibel e Barde, 2000). Fatores neurotróficos endógenos foram descritos tradicionalmente como sendo

capazes de aumentar a sobrevivência celular por prover o suporte trófico necessário para os neurônios; no entanto, o seu conjunto de ações também inclui a inibição da morte celular programada (Shaltiel et al., 2007) e o envolvimento com os processos cognitivos (Rybakowski et al., 2006). Assim, devido a esses fatores serem essenciais para funcionamento e sobrevivência neuronal, supõe-se que a viabilidade neuronal pode ser afetada pela redução persistente dessas neurotrofinas no SNC (Du et al., 2003).

As neurotrofinas são primeiramente sintetizadas como pró-neurotrofinas no retículo endoplasmático rugoso e clivadas no complexo de Golgi pela furina ou nos grânulos secretores pelas pró-proteínas convertases, adquirindo então sua forma madura de neurotrofinas. Em geral, elas são armazenadas no complexo de Golgi e então transportadas para o terminal axônico pré-sináptico ou dendritos pós-sinápticos para secreção local, que pode ocorrer espontaneamente (permissiva, constitutiva) ou em resposta a um estímulo (instrutiva, regulada) (Seidah et al., 1996; Lim et al., 2003).

A família de fatores de crescimento neural consiste do fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4 (NT-4). As formas maduras das neurotrofinas se ligam aos seus receptores específicos de tirosina-quinase (Trk), promovendo a sua dimerização e ativação. O NGF liga-se em alta afinidade ao Trk-A, o BDNF e o NT-4 ligam-se ao Trk-B e o NT-3 liga-se ao Trk-C (Lim et al., 2003; Schechter et al., 2005). Já as pró-neurotrofinas apresentam afinidade ao receptor $p75^{NTR}$, ativando cascatas apoptóticas (Lu et al., 2005) (Figura 2). Além disso, o receptor $p75^{NTR}$ também pode ser visto como modulador, podendo alterar a especificidade da ligação dos receptores Trk, embora eles não tenham capacidade de ligação entre si (Benedetti et al., 1993; Bibbel et al., 1999).

Através das neurotrofinas, as cascatas de Ras, Rap-1, MAPK (cinase ativada por mitógeno), PI-3-kinase (fosfatidilinositol-3-cinase) e PLC- γ (fosfolipase C-C- γ) são ativadas. Estas vias de sinalização estão envolvidas não apenas nos mecanismos patológicos, mas também na modulação da plasticidade fisiológica, como por exemplo, a melhora nos processos de memória em roedores devido a ativação da MAPK pelo NGF (Walz et al., 2000).

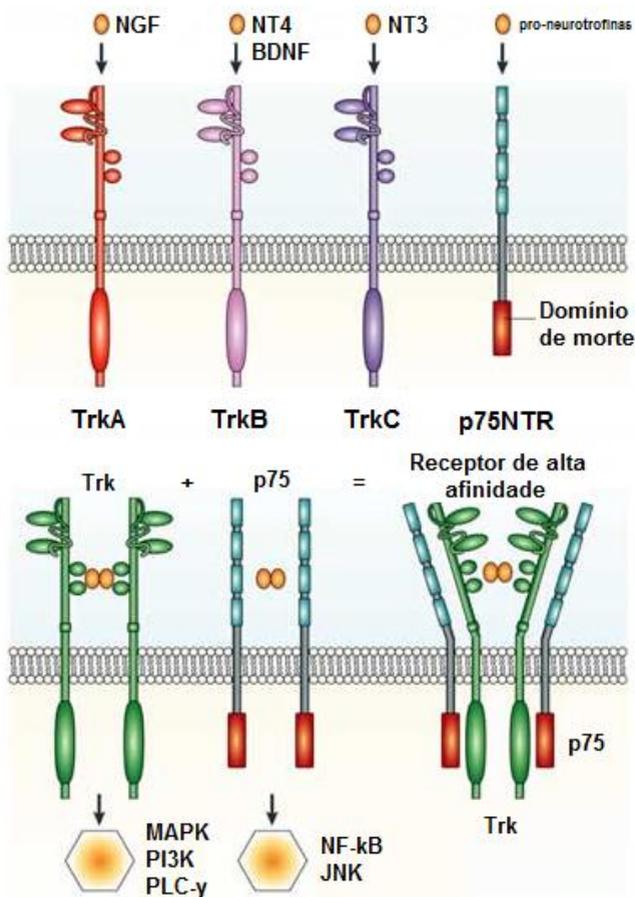


Figura 2: Esquema representativo das neurotrofinas e de seus receptores específicos. As neurotrofinas ligam-se seletivamente a receptores específicos de Trk promovendo a sua dimerização e ativação de várias vias de transdução de sinal. O NGF liga-se em alta afinidade ao Trk-A, o BDNF e o NT-4 ligam-se ao Trk-B e o NT-3 liga-se ao Trk-C, ao passo que todas as pro-neurotrofinas se ligam ao receptor p75^{NTR} ativando cascatas de morte celular. Interações entre Trk e receptores p75 podem alterar a especificidade da ligação dos receptores Trk, aumento a sua afinidade. Trk = receptor tirosina quinase; NGF = Fator de crescimento neural; BDNF = fator neurotrófico derivado do encéfalo; NT-3 = neurotrofina 3; NT4 = Neurotrofina 4 (Adaptado Chao, 2003).

No início da década de 50, Rita Levi-Montalcini descobriu e caracterizou o NGF, como um fator difusível, promotor de sobrevivência e crescimentos de neuritos provenientes de neurônios simpáticos e sensitivos (Hamburger e Levi-Montalcini, 1949; Levi-Montalcini e Hamburger, 1951). Essa neurotrofina desempenha um papel essencial no desenvolvimento, diferenciação, manutenção e sobrevivência de neurônios simpáticos e sensitivos derivados da crista neural (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968; Thoenen e Barde, 1980; Halegoua et al., 1991). Além disso, o NGF está implicado em processos de plasticidade, não sendo identificada atividade para sobrevivência neuronal a não ser para neurônios colinérgicos (Rush et al., 1997; Mendell, 2001). A expressão e afinidade de ligação aos receptores, bem como a duração e intensidade dos eventos celulares desencadeados pela sua ativação conferem especificidade da atuação do NGF sobre células efetadoras ou neurônios (Lee et al., 2001; Patapoutian e Reichardt, 2001; Chao, 2003). O NGF também pode estar envolvido com a apoptose de neurônios simpáticos e sensitivos (Scully e Otten, 1995). Em um estudo recente, por exemplo, foi mostrado que o NGF desempenhou um papel protetor sobre a morte celular das células ganglionares da retina (Lambiase et al., 2009). Também foi demonstrado que no SNC saudável as neurotrofinas regulam a plasticidade neuronal, provocando mudanças adaptativas na morfologia neuronal adulta (McAllister, 2000; Conner et al., 2009; Ohira e Hayashi, 2009), modulando as propriedades funcionais através de mecanismos pré-sinápticos e pós-sinápticos, e iniciando respostas sinápticas rápidas (Kafitz et al., 1999; Elmariah et al., 2005).

Quase trinta anos após a identificação do NGF, foi isolado em 1982 por Barde e colaboradores, em neurônios de porcos, um homólogo do NGF, denominado BDNF (Barde et al., 1982), sendo considerado a principal neurotrofina do cérebro e descrito como a neurotrofina mais abundante no SNC, produzido principalmente pela glia e pelos núcleos neuronais, apresentando grande expressão no hipocampo, neocórtex, amígdala e cerebelo (Shimizu et al., 2003). Essa neurotrofina parece induzir efeitos neurotróficos e neuroprotetores de longo prazo (Murer et al., 2001). O BDNF também tem um papel na plasticidade sináptica e na liberação de neurotransmissores, facilitando a liberação de glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina e serotonina (Tyler et al., 2002; Yoshii e Constantine-Paton, 2010). Já foi demonstrado que o estresse crônico diminui os níveis de BDNF no SNC de ratos, e a sua

expressão é aumentada em diferentes regiões cerebrais após tratamento crônico com fármacos antidepressivos e estabilizadores de humor (Hashimoto e Shimizu, 2004; Frey et al., 2006; Carreno e Frazer, 2014; Réus et al., 2014). Tarefas de aprendizado estão associadas com um aumento dos níveis de mRNA de BDNF em ratos (Yamada e Nabeshima, 2003) e há indícios que o BDNF tem um papel importante na LTP (Minichiello, 2009). Além disso, a associação positiva entre os níveis séricos de BDNF e um teste de fluência verbal em humanos foi demonstrada, sugerindo, mais uma vez, a importância do BDNF em processos neurocognitivos (Dias et al., 2009).

Alterações na expressão ou no funcionamento dessas moléculas podem levar não somente a uma disfunção no desenvolvimento neural, mas também a déficits de migração, a desconexões, a alteração na plasticidade cerebral e a anormalidades estruturais. Tais considerações conduzem à hipótese de que os fatores neurotróficos estejam envolvidos na fisiopatologia da DXB, já que os pacientes apresentam degeneração aguda e/ou crônica de estruturas cerebrais (Chuang e Shih, 2001; Schonberger et al., 2004). Além disso, Nitta e colaboradores (2004) relataram que a leucina-isoleucina (Leu-Ile), um dipeptido hidrofóbico, induz a síntese de BDNF no estriado e em cultura de neurônios mesencefálicos. Por outro lado, o BDNF regula a expressão de mRNA da aminotransferase de AACR citosólica (enzima que catalisa a transaminação de AACR com α -cetogluturato, o que resulta na produção α -cetoácidos de cadeia ramificada no cérebro (Castellano et al., 2006).

4 Acetilcolinesterase

A acetilcolina foi o primeiro neurotransmissor a ser identificado nas sinapses cerebrais (Van Der Zee e Luiten, 1999). Esta molécula é amplamente distribuída no SNC e desempenha diversas funções, onde está relacionada a aspectos comportamentais, processos de aprendizagem e memória, além de atuar na organização pelo córtex cerebral no movimento voluntário (Pepeu, 1972). A acetilcolina é sintetizada no neurônio pré-sináptico pela enzima colina-acetiltransferase a partir do Acetil-CoA e da colina (Soreq e Seidman, 2001), e a etapa final da sua síntese ocorre no citoplasma onde a acetilcolina é transportada para o interior de vesículas pré-sinápticas (Soreq e Seidman, 2001). Uma vez liberada na sinapse, a acetilcolina é degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) em

acetato e colina, sendo esta última recaptada pelo neurônio pré-sináptico (Sarter e Parikh, 2005).

A AChE é uma serina hidrolase, pertencente a família α/β hidrolase. O seu domínio catalítico é composto por uma tríade serina-histidina-glutamato, que está localizada no fundo de uma estrutura estreita que vai da superfície da proteína até o seu centro (Shafferman et al., 1992; Zimmerman e Soreq, 2006). A AChE pode variar no aspecto de sua estrutura em diferentes tecidos (Silman e Sussman, 2005), sendo assim, existem as formas globulares (G1, G2 e G4) que estão presente principalmente no SNC, e as formas assimétricas (A4, A8 e A12) que são encontradas principalmente no sistema nervoso periférico (SNP) e músculo (Rakonczay et al., 2005).

A AChE é uma enzima que metaboliza, de forma específica, a acetilcolina. A rápida destruição da acetilcolina desativa o neurotransmissor após a sua ligação ao receptor, de modo a impedir seu acúmulo nas sinapses e evitar a produção de estímulos contínuos por interações repetitivas. Como resultado, a despolarização produzida pela ligação da acetilcolina ao seu receptor é finalizada com o objetivo de restabelecer a estabilidade da membrana pós-sináptica e a sua permeabilidade por mecanismos de repolarização (Soreq e Seidman, 2001) (Figura 3), estando assim associada ao desenvolvimento cerebral, aprendizagem, memória e dano neuronal (Ballard et al., 2005; Metz e Tracey, 2005; Zimmerman e Soreq, 2006).

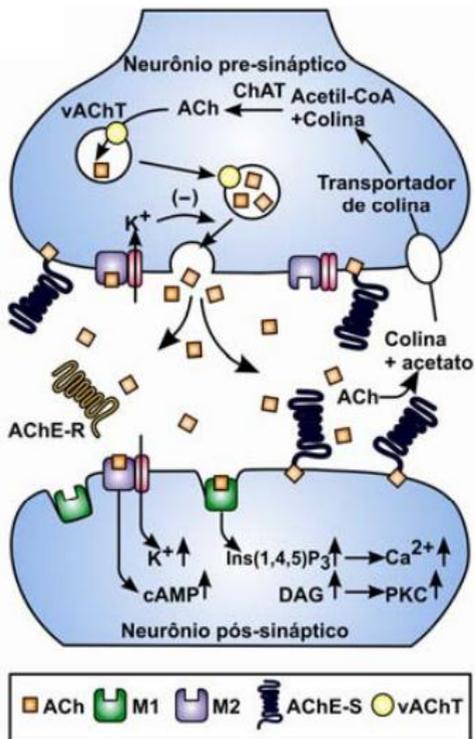


Figura 3: Representação esquemática de uma sinapse colinérgica. A acetilcolina (ACh) é empacotada em vesículas sinápticas através de um transportador de ACh vesicular (vAChT). Os potenciais de ação desencadeiam a liberação de ACh para a fenda sináptica, onde ela se liga a receptores muscarínicos e nicotínicos. Após a despolarização a ACh é hidrolisada na fenda sináptica pela acetilcolinesterase (AChE) em acetato e colina, sendo esta última recaptada pelo neurônio pré-sináptico através do transportador de colina (Adaptado Soreq e Seiman, 2001).

Estudos têm descrito que os prejuízos de memória, aprendizagem e comportamento observados em pacientes com demência são causados, pelo menos em parte, por mudanças na função do sistema colinérgico (Blokland, 1995; Fodale et al., 2006). Além de seu papel clássico na transmissão colinérgica, a AChE tem um potente efeito na adesão celular (Jonhson e Moore, 1999), no crescimento dos neuritos (Day e Greenfiel, 2002), na regulação estrutural da diferenciação pós-sináptica, na osteogênese e também foi proposto a atividade

hematopoiética pela presença desta enzima em células progenitoras do sangue (Soreq e Seidman, 2001). A AChE também foi localizada e identificada nos linfócitos onde provavelmente representa um papel importante na regulação de funções imunes (Kawashima e Fujii, 2000). Assim, uma alteração desta enzima pode ter consequências devastadoras no cérebro e em outros órgãos (Mesulan et al., 2002).

5 Terapia Antioxidante

A N-Acetilcisteína (NAC) é um composto tiólico, rapidamente absorvida quando administrada oralmente. Entretanto, o extensivo metabolismo de primeira passagem realizado pelas células do intestino delgado e do fígado resulta na incorporação da NAC em cadeias peptídicas proteicas e na formação de uma variedade de metabólitos da NAC, assim apenas uma pequena porcentagem de moléculas de NAC intactas chega ao plasma e aos tecidos subsequentes (Dodd et al., 2008). O grupo tiol (SH) é responsável por grande parte da atividade metabólica da NAC, enquanto o grupo “amino acetil-substituído” torna a molécula mais estável contra a oxidação.

Na prática clínica, a NAC é amplamente utilizada devido as suas características mucolíticas e detoxificantes no envenenamento com paracetamol (Prescott et al., 1979; De Flora, 2001; Zafarullah et al., 2003; Atkuri et al., 2007). Seu uso como mucolítico é justificado pela capacidade de romper pontes dissulfeto presentes nas cadeias mucoproteicas e, assim, diminuir a viscosidade das secreções. Na intoxicação com paracetamol, a NAC age como fonte de cisteínas necessárias à síntese da GSH (Atkuri et al., 2007). Entretanto, a ação farmacológica mais estudada da NAC reside na sua capacidade de elevar rapidamente os níveis de GSH (Cetinkaya et al., 2005; Sadowska et al., 2007).

A GSH é um tripeptídeo formado por ácido glutâmico, glicina e cisteína e desempenha um importante papel na manutenção do balanço redox intracelular (Haddad et al., 2000; Haddad e Harb, 2005). Sua síntese a partir da cisteína proveniente do NAC envolve três passos enzimáticos ocorridos no citosol. O primeiro é catalisado pela enzima glutamato-cisteína ligase e consiste na condensação do glutamato com a L-cisteína. O segundo, é o passo limitante desta rota, e converte o resíduo de glutamato a γ -glutamil em uma reação catalisada pela γ -glutamil-cisteína. O terceiro passo é catalisado pela glutamil sintase e converte o γ -glutamil-cisteína no tripeptídeo γ -glutamil-cisteína-glicina,

também conhecido como GSH (Haddad e Harb, 2005). Endogenamente a GSH é utilizada pela enzima GPx para a conversão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água, bem como, para redução de hidroperóxidos lipídicos em seus alcoóis correspondentes (Hayes e McLellan, 1999).

A maioria dos efeitos benéficos da NAC é sugerida como sendo um resultado de sua habilidade tanto de reduzir cistina extracelular em cisteína, quanto de ser uma fonte de grupos tióis. Como fonte de grupos tióis, a NAC estimula a síntese de glutatona, aumenta a atividade da glutatona-S-transferase, e atua nos radicais oxidantes reativos (De Vries e De Flora, 1993). A NAC, além de ser um poderoso precursor de GSH, também apresenta atividade antioxidante *per se*, por ser capaz de sequestrar radicais hidroxil e superóxido (Aruoma et al., 1989; Benrahmoune et al., 2000). Como consequência destas propriedades, ela pode restaurar o *status* redox, modificado em algumas patologias e, assim, modular a sinalização intracelular (Zafarullah et al., 2003; Sadowska et al., 2007).

A utilização da NAC como agente antioxidante ou quelante, entretanto, requer certos cuidados. Ritter e colaboradores (2004) descreveram que o uso da NAC pode ter algumas limitações e apresentar efeitos pró-oxidantes, devido à facilidade com que interage com o ferro. De fato, alguns estudos demonstraram que a terapia com NAC, em animais expostos ao cloreto de mercúrio ($HgCl_2$), pode causar danos renais, provavelmente devido à formação de complexos entre a NAC e o $HgCl_2$ (Brandão et al., 2006). Neste contexto, estudos tem sugerido que a associação de NAC com desferroxamina (DFX), um quelante de ferro, tem demonstrado uma melhora na capacidade antioxidante da NAC (Ritter et al., 2004), por prevenir ou reverter os efeitos da produção de radicais livres, impedindo a geração de radical hidroxila através da reação de Fenton (Vulcano et al., 2000). Embora o uso crônico possivelmente pudesse aumentar a produção das espécies reativas de oxigênio pela reação de Fenton, o uso de DFX por um curto período de tempo pode ser benéfico ao produzir um efeito sinérgico com o NAC (Ritter et al., 2004; Barichello et al., 2007; Di Pietro et al., 2008; Cassol et al., 2010).

6 Justificativa

Pacientes com DXB mostram extensos danos no cérebro, apresentando um grau variável de retardo mental e outros sintomas neurológicos. Acredita-se que os possíveis mecanismos pelos quais os AACR levam ao dano neurológico possa envolver a deficiência no metabolismo energético, estresse oxidativo, disfunção de neurotransmissores e ativação de vias de morte celular, ou, possivelmente, um somatório desses fatores. Entretanto, até o momento não se tem uma explicação completamente satisfatória para explicar a fisiopatologia do dano cerebral e das alterações comportamentais apresentadas pelos pacientes com DXB. Neste contexto, o propósito com o presente trabalho foi aprofundar o conhecimento de mecanismos fisiopatológicos do dano neurológico apresentado pelos pacientes com DXB, através do modelo animal quimicamente induzido, especialmente em relação a parâmetros neuroquímicos importantes para a função cerebral e que estão relacionados aos mecanismos de memória, bem como avaliar o perfil cognitivo e o desenvolvimento de um comportamento do tipo depressivo em ratos durante o seu desenvolvimento (7-30 dias de vida, um período de grande proliferação celular e sinaptogênese em diversas estruturas cerebrais). Além disso, considerando os relatos de estudos anteriores indicando o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia dos danos neurológicos apresentados pelos pacientes com DXB, também foi investigada a influência do tratamento com antioxidantes (NAC e DFX) sobre as alterações causadas pelos AACR, a fim de avaliar se a administração de antioxidantes seria capaz de proteger o cérebro contra os efeitos deletérios dos AACR.

II. OBJETIVOS

7 Objetivos

7.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos neuroquímicos e comportamentais da administração aguda e crônica de um *pool* de AACR (leucina, isoleucina e valina) em cérebro de ratos durante o seu desenvolvimento, e a implicação do tratamento antioxidante (NAC e DFX) e imipramina como uma terapia adjuvante para o tratamento da DXB.

7.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos neuroquímicos da administração aguda e crônica de um pool de AACR no hipocampo, estriado e córtex de ratos durante o seu desenvolvimento e a implicação de NAC e DFX como uma terapia adjuvante para o tratamento da DXB, através dos seguintes parâmetros:

- Níveis de mRNA do gene *ache* e a atividade da AChE
- Níveis de mRNA do gene *ngf* e os níveis proteicos de NGF
- Níveis de mRNA do gene *bdnf*, *tPA* e *S100A10* e os níveis proteicos de pro-BDNF, BDNF total, tPA e S100A10

Avaliar os efeitos da administração aguda e crônica de um pool de AACR sobre o comportamento cognitivo em ratos durante o seu desenvolvimento e a implicação de NAC e DFX como uma terapia adjuvante para o tratamento da DXB, através dos seguintes testes:

- Habituação ao campo aberto
- Esquiva inibitória
- Esquiva inibitória de múltiplos treinos
- Reconhecimento de objetos
- SHIRPA

Avaliar o comportamento depressivo após a administração crônica de um pool de AACR em ratos durante o seu desenvolvimento e a implicação de antioxidante (NAC e DFX) e imipramina como uma terapia adjuvante para o tratamento da DXB, através dos seguintes parâmetros:

- Anedonia
- Nado forçado
- Peso da glândula adrenal
- Peso corporal

III. METODOLOGIA

8 Desenho experimental

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), lei Arouca nº 11.794/2008. Este projeto foi executado após aprovação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob o protocolo número 60/2010.

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, infantes (7 e 10 dias de idade) e jovens (30 dias de idade) obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais de 7 e 10 dias de idade foram deixados com suas mães até o dia final do experimento, e os ratos de 30 dias de idade foram desmamados aos 21 dias de vida. Após o desmame, os ratos foram colocados em caixas em grupos de cinco, com ciclo claro - escuro de 12 horas (07:00 às 19:00) (Claro 7:00h) e comida e água *ad libitum*, com ambiente mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$.

8.1 Modelo Quimicamente Induzido de DXB

Para o presente estudo foi utilizado um modelo quimicamente induzido proposto por Bridi e colaboradores (2006) através da administração subcutânea de uma associação de AACR, conteúdo leucina (190 mmol/L), isoleucina (59 mmol/L) e valina (69 mmol/L). A administração dos AACR induz um aumento significativo dos AACR (leucina, isoleucina e valina) em ratos de 10 e 30 dias, em valores semelhantes aos observados nos pacientes com DXB, bem como uma diminuição concomitante nas concentrações plasmáticas de metionina, fenilalanina, tirosina, histidina, alanina, lisina, ornitina e triptofano.

8.1.1 Administração do *pool* de aminoácidos de cadeia ramificada

Para o desenvolvimento do estudo, os experimentos foram divididos em três protocolos experimentais, conforme descrito abaixo.

Protocolo 1: Administração aguda em ratos infantis (10 dias)

Grupo 1 – Controle (administração salina)

Grupo 2 – DXB (administração AACR)

Protocolo 2: Administração aguda em ratos jovens (30 dias)

Grupo 1 – Controle (administração salina)

Grupo 2 – DXB (administração AACR)

Protocolo 3: Administração crônica (7° ao 27° dia de vida)

Grupo 1 – Controle (administração salina)

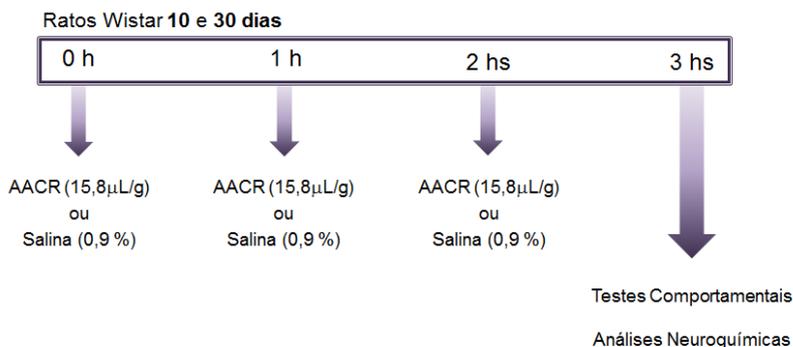
Grupo 2 – DXB (administração AACR)

Grupo 3 – DXB suplementado com NAC + DFX

Grupo 4 – DXB suplementado com Imipramina

8.1.2 Administração aguda

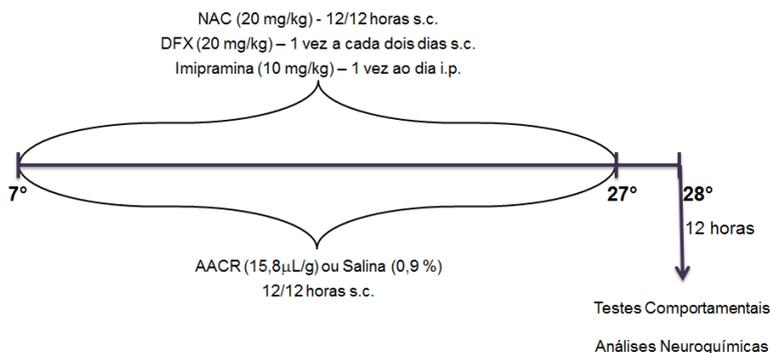
Ratos infantis (10 dias) e jovens (30 dias) receberam três administrações de um *pool* de AACR (15,8 $\mu\text{L/g}$ de peso corporal), com intervalo de 1 hora entre as administrações, por via subcutânea (grupo teste). Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo protocolo, porém receberam solução salina 0,9% (Bridi et al., 2006) (Esquema 1).



Esquema 1: Protocolo agudo em animais de 10 e 30 dias de idade.

8.1.3 Administração crônica

Ratos infantis (7 dias) receberam duas administrações diárias de um *pool* de AACR (15,8 μ L/g de peso corporal), com intervalo de 12 horas entre as administrações, por via subcutânea, durante 21 dias (grupo teste). Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo protocolo, porém receberam solução salina 0,9%. Após a primeira administração do *pool* de aminoácidos os animais foram suplementados com administração subcutânea de NAC (20 mg/kg) duas vezes ao dia, com intervalos de 12 horas, e a administração subcutânea de DFX (20 mg/kg) uma vez a cada dois dias (Di Pietro et al., 2008). Para o experimento onde foi avaliado o comportamento depressivo, um quarto grupo foi adicionado, sendo ele, DXB + Imipramina (10 mg/kg – i.p.) uma vez ao dia (Tuon et al., 2007) (Esquema 2).



Esquema 2: Protocolo crônico, os animais foram submetidos ao protocolo experimental do 7° ao 27° dia de vida.

8.2 Avaliações neuroquímicas

8.2.1 Preparação do tecido

Uma hora após a última administração (administração aguda) e doze horas após a última administração (administração crônica) os ratos foram eutanasiados por decapitação, o cérebro removido e o hipocampo, estriado e córtex cerebral foram isolados.

8.2.2 Níveis proteicos de BDNF e NGF

Os níveis proteicos de BDNF e NGF nos tecidos cerebrais [homogeneizados em tampão fosfato-salino (PBS, LaborClin, PR, Brasil), com um coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)] foram determinados através de kits comerciais de ELISA (ensaio de imunoabsorção ligado à enzima) com anticorpos monoclonais específicos para BDNF e NGF (Millipore, EUA e Canadá). Resumidamente, placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram incubadas durante 12 horas com as amostras diluídas (1:2 em diluente de amostra) e uma curva padrão (variando 7,8 a 500 pg/mL de BDNF e 15,6 a 1000 pg/mL de NGF). As placas foram então lavadas quatro vezes com o tampão de lavagem. Após a lavagem, o anticorpo monoclonal de rato anti-BDNF ou anti-NGF (diluído a 1:1000 em diluente da amostra) foi adicionado a cada poço e incubado durante 2 horas à temperatura ambiente. Ao término deste período, mais uma série de lavagens foi aplicada, posteriormente, um anticorpo de coelho conjugado com peroxidase (diluído a 1:1000) foi adicionado a cada poço e incubou-se à temperatura ambiente durante 2 horas. Após, foi adicionado uma solução de estreptavidina (enzima-substrato) e uma solução de parada. A quantidade de BDNF e NGF foi determinada através da medição da absorbância a 450 nm. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica (DO) e a concentração de BDNF e NGF. A proteína total foi avaliada pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

8.2.3 Immunoblotting

As dosagens do pro-BDNF, tPA e S100A10 foram realizadas por Immunoblotting. Inicialmente o córtex cerebral, hipocampo e estriado foram homogeneizados mecanicamente em tampão de amostra (Tris 200 mM, EDTA 40 mM, SDS 4%, pH 6,8) e imediatamente fervidas durante 5 min. Em seguida, a solução de diluição da amostra (1:4 vol / vol, 40% de glicerol, Tris 50 mM e azul de bromofenol) e β -mercaptoetanol foram adicionados a cada amostra para uma concentração final de 5%. As concentrações de proteínas foram analisadas pelo método de Lowry (1951), e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína. Para a eletroforese em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema

descontínuo usando gel 10-15% foram utilizadas 30 µg de proteínas. As proteínas separadas foram, em seguida, transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando tampão contendo Tris 20 mmol/L, glicina 150 mmol/L, metanol 20% (v/v) (pH 8,2) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. A carga de proteína e a eficiência da transferência foram verificadas com coloração Ponceau S. Após, os sítios de proteínas inespecíficos foram bloqueados com tampão Tween-Tris-Salina (TTBS: Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,9% e Tween-20 0,1%) contendo 5% de leite desnatado. Posteriormente, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com o anticorpo primário anti-pro-BDNF (Abcam - ab72440), anti-tPA (Santa Cruz - sc5241) e anti-S100A10 (Santa Cruz - sc50450). Após a incubação, o anticorpo primário foi removido e as membranas lavadas 4 vezes com TTBS durante 15 minutos. Após a lavagem, os anticorpos secundários IgG conjugados com peroxidase (anti-rabbit e anti-goat - diluição 1:10000) foram aplicados à membrana e uma incubação por 2 horas à temperatura ambiente foi realizada, após esse período as membranas foram lavadas novamente. Finalmente, as bandas imunorreativas foram detectadas utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Pierce) através de fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS – Bio-Rad). Após a exposição, a membrana foi submetida ao processo de “*stripping*” e foi incubada com um anticorpo anti-β-actina. Após a lavagem, o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-mouse - diluição 1:10000) foi aplicado à membrana e uma incubação por 2 horas à temperatura ambiente foi realizada, posteriormente as membranas foram lavadas novamente. Finalmente, as bandas imunorreativas foram detectadas através de fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS – Bio-Rad) utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Pierce). A densitometria das bandas foi avaliada utilizando-se o Software Image Lab. SeeBlue® Plus2 Prestained Standard (Invitrogen) foi utilizado como um marcador de peso molecular para certificar-se de que as bandas corretas de pro-BDNF, tPA, S100A10 e β-actina foram analisadas.

8.2.4 Atividade da Acetilcolinesterase

A atividade desta enzima foi realizada de acordo com o método descrito por Ellman e colaboradores (1961). A mistura de reação (volume final 2 mL) continha tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 1 mM,

posteriormente a enzima (40-50 µg de proteína) foi pré-incubada durante 3 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 0,8 mM de iodeto de acetiltiocolina (AcSCh). Todas as amostras foram testadas em duplicata ou triplicata, e a atividade enzimática foi expressa em micromoles AcSCh por hora por miligrama de proteína. A proteína total foi avaliada pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

8.2.5 Expressão gênica analisada por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A análise da expressão gênica foi realizada somente quando uma alteração nos níveis proteicos do NGF, tPA e S100A10 foi observada. O estriado, hipocampo e córtex cerebral foram dissecados em condições estéreis, e o RNA foi extraído utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e quantificação do RNA foram realizadas por espectrofotometria através da relação dos valores de absorbância a 260 e 280 nm. Todas as amostras foram ajustadas para uma concentração de 160 ng/µL e o cDNA de cada amostra foi sintetizado utilizando o kit “*ImProm-II™ Reverse Transcription System*” (Promega) a partir de 1 µg de RNA total, seguindo as instruções do fabricante. qPCR foi realizada utilizando SYBR® Green I (Invitrogen) para detectar a síntese de cDNA de cadeia dupla. As reações foram realizadas num volume de 25 µL, utilizando 12,5 µL de cDNA diluído (1:50 para *Gapd*, *Hprt1*, *Rlp13A*, *S100A10* e *tPA* e 1:5 para *ngf*), contendo uma concentração final de betaína 5M (Sigma - Aldrich), SYBR® Green I (Invitrogen) 0,2 X, dNTP 100 µM, PCR Buffer 1 X, MgCl₂ 3 mM, Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) 0.25 U e 200 nM de cada iniciador direto e reverso (Tabela 2). As condições dos ciclos de PCR foram as seguintes: uma etapa inicial de ativação da polimerase durante 5 min a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação, 35 segundos a 60°C para recozimento e 15 segundos a 72°C para alongamento. Ao final do protocolo de ciclos uma análise de fusão da curva foi realizada, e a fluorescência foi medida 60 a 99°C. Níveis de expressão relativa foram determinados com 7500 Fast Real-Time System Sequence Detection Software v.2.0.5 (Applied Biosystems). A eficiência por amostra foi calculada usando o Software LinRegPCR 11.0 (<http://LinRegPCR.nl>). A estabilidade dos genes referências, *HPRT1* e *Rlp13A* (M - R) e o número ótimo de genes de

referência de acordo com de acordo com o par de variação sábio (V) foram analisados pelo software GeNorm 3.5 Software (<http://medgen.ugent.be/genorm/>). Os níveis de expressão de RNA relativos foram determinados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 2. Sequências dos iniciadores para as experiências de RT-qPCR incluídos no estudo

Enzimas	Sequência de Primers (5'-3')	GenBank number
<i>Gapd</i> *	F – TCACCACCATGGAGAAGGC R – GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA	
<i>Hprt1</i> *	F – GCAGACTTTGCTTTCCTTGG R – CGAGAGGTCCTTTTCACCAG	NM_012583
<i>Rpl13A</i> *	F – ACAAGAAAAAGCGGATGGTG R – TTCCGGTAATGGATCTTTGC	
<i>NGF</i> **	F – TAAGAGTACCCACAAAGTTT R – CCTGCTTTCTGACCAGTCTT	NM_001277055
<i>S100A10</i> ***	F – ATGCTTACATTTACAGGTTTGCAGG R – GTGATAGAAAGCTCTGGAAGCCCCAC	BC091565.1
<i>tPA</i> ***	F – TCTCCTTTCTTCTCTGACCGGCTG R – CTGAGTCACCCTGGCACGCGTC	NM_013151.2

* De acordo com Bonefeld et al., 2008

** De acordo com Yan et al., 2004

*** Desenhado pelos autores.

8.2.6 Expressão gênica analisada por PCR semi-quantitativo (RT-PCR)

A análise da expressão do gene da *ache* e do *bdnf* foi realizada por reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa. O estriado, hipocampo e córtex cerebral foram dissecados em condições estéreis, e o RNA foi extraído utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e quantificação do RNA foram realizadas por espectrofotometria através da relação dos valores de absorbância a 260 e 280 nm. Todas as amostras foram ajustadas para

uma concentração de 160 ng/ μ L e o cDNA de cada amostra foi sintetizado utilizando o kit “*ImProm-II™ Reverse Transcription System*” (Promega). As reações de PCR para os genes da *ache*, *bdnf* e β -*actina* foram realizados com 0.1 μ M de primers (Tabela 3), dNTP 0.2 μ M, MgCl₂ 2 mM e U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) 0.1 em um volume total de 25 μ L para *ache* e *bdnf*, e 20 μ L para β -*actina*. Foram usadas as seguintes condições para as reações de PCR: 1 min a 94 °C, 1 min para temperatura de recozimento (54°C para β -*actina*, 55°C para *ache* e 60°C para *bdnf*) e 1 min a 72°C durante 35 ciclos. A pós-extensão a 72°C foi realizada durante 10 min. Para cada conjunto de reações de PCR, um controle negativo foi incluído. Os produtos de PCR (*ache*: 785bp, *bdnf*: 393 bp, β -*actina*: 210 bp) foram analisados em gel de agarose a 1,5%, contendo GelRed® (Biotium) e visualizados sob luz ultravioleta. Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) foi utilizado como marcador molecular e a normalização foi realizada utilizando a β -*actina* como o gene constitutivo.

Tabela 3. Sequências dos iniciadores para as experiências de RT-PCR incluídos no estudo

Enzimas	Sequência de Primers (5'-3')	GenBank number
<i>ache</i> **	F – GACTGCCTTTATCTTAATGTG R – CGGCTGATGAGAGATTCATTG	
<i>bdnf</i> **	F – CCAGAAGGTTCCGGCCCAACGAAG R – TCCAGTGCC TTTTGTCTATGCCCTG	
β - <i>actina</i> *	F – TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG R – TACTCCTGCTTCCTGATCCACAT	

* De acordo com da Silva et al., 2008

** Desenhado pelos autores.

8.3 Testes comportamentais

Uma hora após a última administração nos animais de 30 dias de idade (administração aguda) e doze horas após a última administração (administração crônica) os ratos foram submetidos aos testes comportamentais.

8.3.1 SHIRPA

O SHIRPA (*Smith Kline / Harwell / Imperial College / Royal Hospital / Phenotype Assessment*) foi concebido como uma bateria de múltiplos testes usados para estudos longitudinais com diretrizes e materiais padronizados (Rogers et al., 1997). O quadro primário de SHIRPA consiste em uma série de observações, reflexos e funções básicas sensório-motoras que fornece um perfil funcional e comportamental pela observação avaliativa do desempenho individual. O protocolo de SHIRPA foi usado para avaliar mudanças comportamentais durante o curso da DXB nos animais. Para o propósito de análise, os parâmetros individuais avaliados pelo SHIRPA foram agrupados em cinco categorias funcionais (estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autonômica, tônus e força muscular, reflexo e função sensorial) de acordo com Lackner e colaboradores (2006), determinando uma contagem global e cinco domínios de contagem. O reflexo e domínio sensorial envolvem o posicionamento visual, reflexo auricular, reflexo corneal, pressão no dedo da pata, e reflexo de endireitamento. O estado neuripsiquiátrico envolve atividade espontânea, excitação de transferência, escape ao toque, passividade posicional, medo, irritabilidade, mordida e vocalização. O comportamento motor envolve atividade locomotora, posição corporal, tremores, maneira de andar, elevação pélvica, elevação da cauda, ondulação do tronco, manobra do arame, agarramento dos membros, e geotaxia negativa. Função autonômica envolve ritmo respiratório, fechamento da pálpebra, irritação cutânea, cor da pele, ritmo cardíaco, lacrimejamento e salivação. Envolve tônus muscular e força, tônus corporal, tônus dos órgãos, e tônus abdominal.

8.3.2 Esquiva Inibitória

O aparelho de esquiva inibitória consiste em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de aço inoxidável (1 mm diâmetro), com espaços entre as barras de 1 cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e, 2,5 cm de comprimento foi colocada junto a parede esquerda do aparelho. Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e com um dispositivo automatizado mediu-se o tempo que o animal levou para descer com as quatro patas da plataforma. Esse tempo é denominado latência (Quevedo et al., 1997, Quevedo et al., 1999). Imediatamente após descer da plataforma, o animal recebeu um choque de 0,6 mA durante 1 segundo. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e mediu-se o tempo que ele levou para descer (latência), porém não foi administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Os intervalos entre o treino e o teste foram de 1,5 horas para medir memória de curta duração (Izquierdo et al., 1997, Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003), e 24 horas para memória de longa duração (Izquierdo et al., 1997; Quevedo et al., 1997; Izquierdo et al., 1998; Quevedo et al., 1999).

8.3.3 Esquiva Inibitória de Treinos Contínuos (CMIA)

Nesse teste usou-se também a esquiva inibitória, no qual suas características já foram descritas anteriormente. Na sessão treino o animal foi colocado na plataforma e imediatamente depois de pisar nas barras de metal, recebeu um choque 0.3-mA, durante 2.0 segundos sendo que este procedimento continuou até que o animal permanecesse na plataforma por 50 segundos. Após o animal permanecer na plataforma por 50 segundos, os mesmos foram devolvidos à sua caixa moradia (Barichello et al., 2005).

No mesmo dia 1 hora e 30 minutos após o treino, o animal foi recolocado na plataforma e o tempo de permanência do animal sobre a plataforma foi contabilizado (tempo limite sobre a plataforma 180 segundos). O mesmo procedimento foi realizado 24 horas após o procedimento anterior.

8.3.4 Habituação ao Campo Aberto (*Open Field*)

Foi realizado em uma caixa de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. Vinte quatro horas após o treino, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento do treino (sessão teste). O número de “*crossings*” (frequência com que os ratos cruzaram uma das linhas com as quatro patas) e de “*rearings*” (frequência com que os ratos ficam sobre as patas traseiras) realizado em ambas as sessões foi contado (Brown et al., 1999). A diminuição do número de “*crossings*” e “*rearings*” entre as duas sessões foi tomado como uma medida da retenção de habituação (Vianna et al., 2000).

8.3.5 Memória de reconhecimento de objetos

Para a realização deste teste, usou-se o *Open Field*, cuja descrição já foi relatada anteriormente (Rosa et al., 2003; Schroder et al., 2003). Todos os animais foram submetidos a uma sessão de habituação em que se permitiu explorar livremente o campo aberto durante 5 minutos, sem a adição de nenhum objeto na caixa. O número de cruzamentos das linhas pretas e levantamentos realizados durante esta sessão foram avaliados como atividade exploratória e locomotora, respectivamente. No segundo dia o animal foi recolocado no aparelho com a presença de dois objetos idênticos (objetos A e B) posicionados em dois cantos adjacentes, 10 cm das paredes, e contou-se o tempo que o animal explorou cada objeto (A e B). No mesmo dia, 1 hora 30 minutos após avaliou-se a memória de curta duração, o animal explorou novamente o ambiente na presença do primeiro objeto familiar (objeto A) e um novo objeto (objeto C), contou-se novamente o tempo total que o animal explorou cada objeto. No dia seguinte (24 horas após) avaliou-se a memória de longa duração onde o mesmo procedimento foi realizado, trocando o objeto C pelo objeto D (diferente do objeto A) e contou-se o tempo de exploração de cada objeto (Rosa et al., 2003; Schroder et al., 2003). Um índice de reconhecimento foi calculado para

cada animal como a razão $TB/(TA+TB)$ (TA = tempo gasto explorando o objeto A; TB = tempo gasto explorando o objeto novo B).

8.3.6 Teste de anedonia

O consumo de alimento doce foi mensurado em todos os grupos para avaliar anedonia durante os 7 dias (Pós-Nascimento (PN) 21-28). Para a realização deste teste, usa-se o *Open Field*, cuja descrição já foi relatada anteriormente. Dez *Froot Loop(s)* (Kellogg's® - cereal de trigo, milho e açúcar) foram colocados em uma das extremidades da caixa. Os animais foram submetidos a cinco ensaios de 3 minutos, uma vez por dia, durante 5 dias, para se familiarizar com os alimentos (PN 21-26). Depois de habituados, os animais foram expostos a duas sessões de teste de 3 minutos cada, em que o número de *Froot Loops*® ingerido foi medido (PN 27-28). Os resultados foram observados quando o animal comeu 1, 1/2 ou 1/4 de *Froot Loops*®. Estas duas avaliações foram feitas com os animais submetidos ao jejum (durante um período de 22h antes do teste comportamental). No entanto, durante as sessões de teste (PN 27-28) os animais não estavam em jejum. Estas avaliações foram feitas desde que a privação de alimento, o qual é usado em muitos testes comportamentais como um estímulo motivador, pode também ser um estressor agudo (Katz et al., 1981). A privação de comida eleva os níveis séricos de cortisol e reduz a atividade dopaminérgica após alimentação (Pothos, 1995).

8.3.7 Nado forçado

Este teste foi realizado de acordo com os relatórios prévios descritos por Porsolt e colaboradores (1977) e utilizado como modelo para avaliar o comportamento depressivo. Resumidamente, o teste envolve duas exposições a um tanque cilíndrico de água em que os ratos não podem tocar o fundo e do qual não podem escapar. O reservatório é feito de Plexiglas transparente, com 80 cm de altura e 30 cm de diâmetro, e é preenchido com água (22-23 °C) a uma profundidade de 40 cm. Para a primeira exposição, os ratos foram colocados na água durante 15 minutos (sessão treino). Após 24 horas, os ratos foram colocados novamente na água para uma sessão de 5 minutos (sessão teste). O tempo de imobilidade foi analisado na sessão de teste.

8.4 Peso corporal e da glândula adrenal

O peso corporal foi medido antes da administração do *pool* de aminoácidos (dia 0) e 22 dias após a primeira administração do *pool* de aminoácidos (22 dias). No 22º dia, após o consumo do alimento doce, os ratos foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) i.p. As glândulas adrenais foram removidas através de laparotomia e pesadas em balança analítica (Katz et al., 1981; Nestler et al., 2002; Gamaro et al., 2003; Krishnan e Nestler, 2008). O peso da glândula adrenal foi utilizado neste estudo como um parâmetro de ativação indireta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Katz et al., 1981).

8.5 Análise estatística

Para as análises neuroquímicas os resultados foram apresentados como a média \pm desvio padrão. Os testes para determinar a normalidade e igualdade de variância foram realizados para verificar se os dados estavam qualificados para a realização de testes estatísticos paramétricos. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) com variâncias iguais entre as amostras (teste de igualdade de variâncias, $p > 0,05$). Por isso, foi utilizado o teste t de Student para a comparação de duas médias. Para comparação de três ou mais médias foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de Post Hoc Tukey e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Quando as variáveis que não seguiram uma distribuição normal e sua variância não preencheu o pressuposto da homocedasticidade, os dados foram expressos como mediana e intervalos interquartil e foram analisados por um teste não paramétrico (Mann–Whitney U), seguido pelo teste de Wilcoxon e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas em um computador compatível com IBM usando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (Armonk, New York, USA).

IV. RESULTADOS

Efeitos da administração aguda e crônica de AACR sobre a atividade e os níveis de mRNA da acetilcolinesterase (AChE)

Primeiro, analisou-se os efeitos da administração aguda e crônica dos AACR sobre a atividade da AChE no córtex cerebral, hipocampo e estriado em ratos de 10 e 30 dias de idade. Observou-se que a administração aguda AACR aumentou a atividade da AChE no córtex cerebral, hipocampo e estriado, quando comparados com o grupo de controle, nos animais de 10 e 30 dias de idade (Figura 4 e 5).

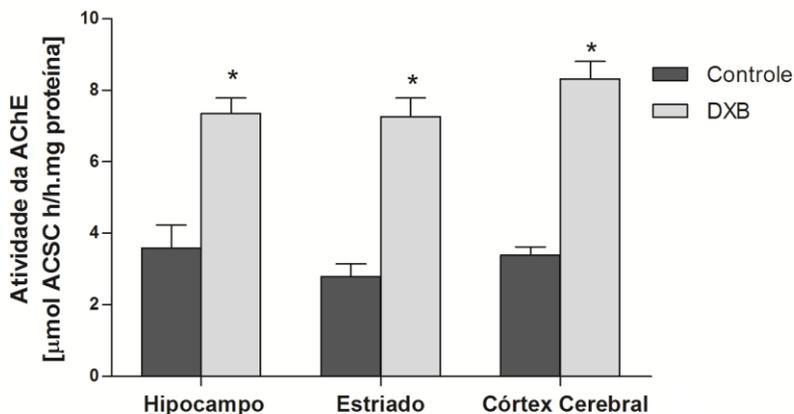


Figura 4: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

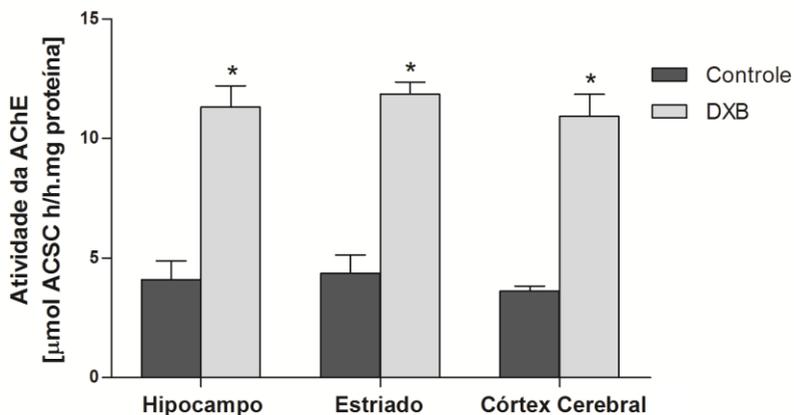


Figura 5: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 30 dias de idade. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

O mesmo perfil foi observado após a administração crônica de AACR, observando-se um aumento da atividade da AChE em todas as estruturas analisadas. Além disso, observou-se que a suplementação com antioxidantes (NAC + DFX) foi capaz de prevenir o aumento da atividade da AChE em todas as estruturas (Figura 6).

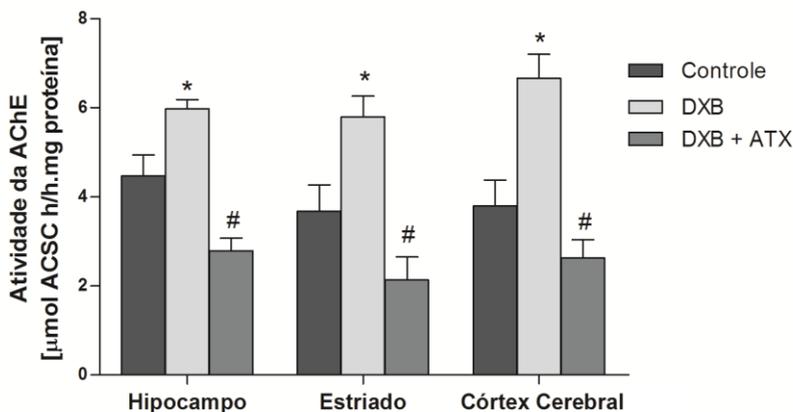


Figura 6: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes (ATX) sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante seu desenvolvimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. # comparado ao grupo DXB. (teste de Tukey).

Sabe-se que a regulação da atividade da AChE pode ser uma consequência de controle de transcrição e/ou modificações pós-traducionais. Por esse motivo, os efeitos da administração aguda e crônica de AACR sobre em níveis de mRNA do gene *ache* foram avaliados no cérebro. A figura 7 demonstra que os níveis de mRNA do gene da *ache* não foram alterados no estriado e no córtex cerebral após a administração aguda em ratos de 10 e 30 dias de idade (Figura 7A e 7B, respectivamente). Entretanto, no hipocampo observou-se um diminuição significativa nos níveis de mRNA, quando comparado ao grupo controle, tanto nos animais de 10 dias de idade, quanto nos de 30 dias de idade (Figura 7A e 7B, respectivamente).

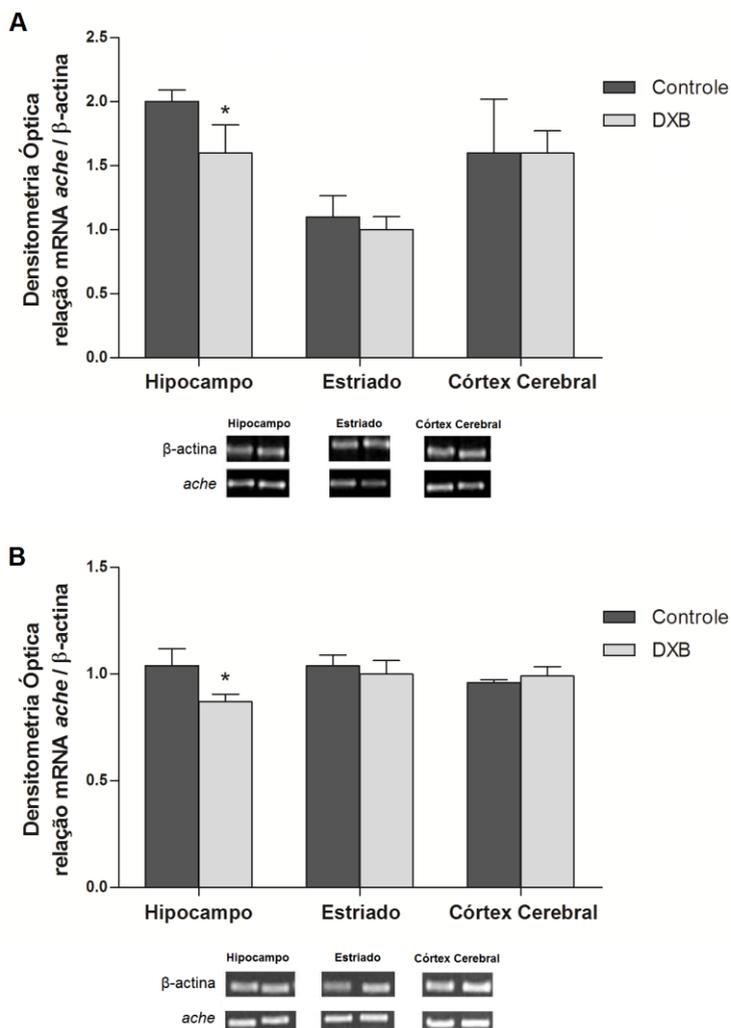


Figura 7: Expressão de mRNA do gene da acetilcolinesterase (*ache*) após a administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 10 (A) e 30 (B) dias de idade. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. (teste t de Student).

Por outro lado, após a administração crônica observou-se uma diminuição significativa nos níveis de mRNA do gene da *ache* apenas

no estriado, enquanto que no córtex cerebral observou-se um aumento dos níveis de mRNA nos grupos DXB e DXB suplementado com antioxidantes (Figura 8).

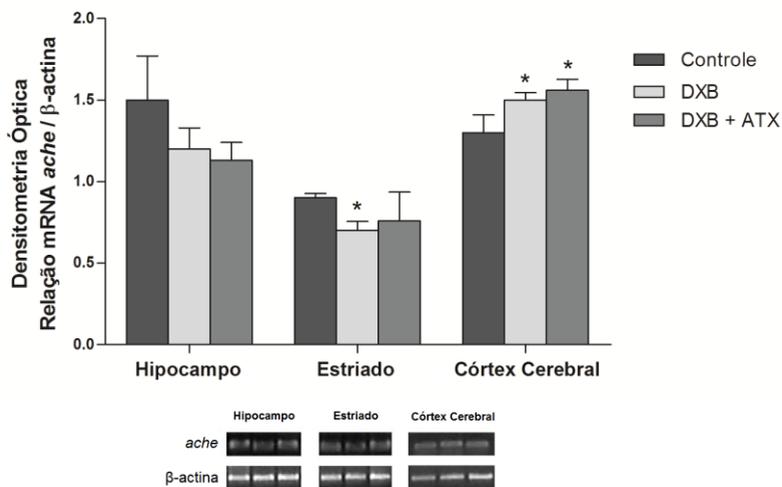


Figura 8: Expressão de mRNA do gene da acetilcolinesterase (*ache*) após a administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes (ATX) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante seu desenvolvimento. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste de Tukey).

Efeitos da administração aguda e crônica de AACR sobre os níveis de mRNA do gene *ngf* e os níveis proteicos de NGF

No presente trabalho também foi investigado o efeito da administração aguda de AACR sobre os níveis de mRNA e proteicos do NGF em cérebro de ratos durante o seu desenvolvimento. As análises realizadas pelo método de ELISA demonstraram que os níveis da proteína NGF no hipocampo foram reduzidos após a administração aguda de AACR em ratos de 10 e 30 dias de idade. No entanto nenhuma diferença foi observada nos níveis de NGF no estriado ou córtex cerebral, quando comparado com ao grupo controle (Figuras 9 e 10).

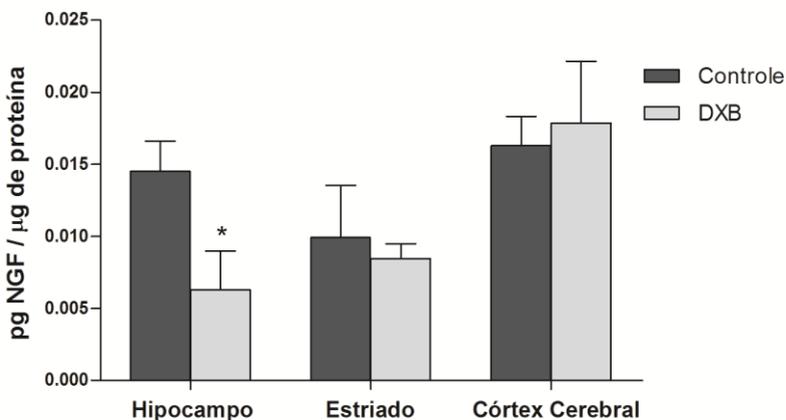


Figura 9: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis proteicos do fator de crescimento neural (NGF) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

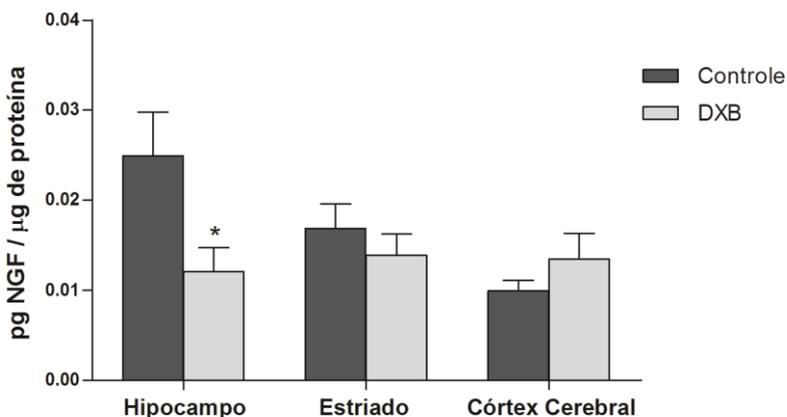


Figura 10: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis proteicos do fator de crescimento neural (NGF) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 30 dias de idade. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

Os efeitos da administração crônica de AACR sobre os níveis da proteína NGF no hipocampo, estriado e córtex cerebral também foram avaliados. Os níveis de NGF no hipocampo foram significativamente reduzidos, quando comparados ao grupo controle. Enquanto que os níveis de NGF não foram afetados no estriado e córtex cerebral. Além disso, observou-se que a suplementação com antioxidante foi capaz de prevenir a diminuição dos níveis proteicos de NGF no hipocampo, mantendo os níveis próximos aos valores do grupo controle (Figura 11).

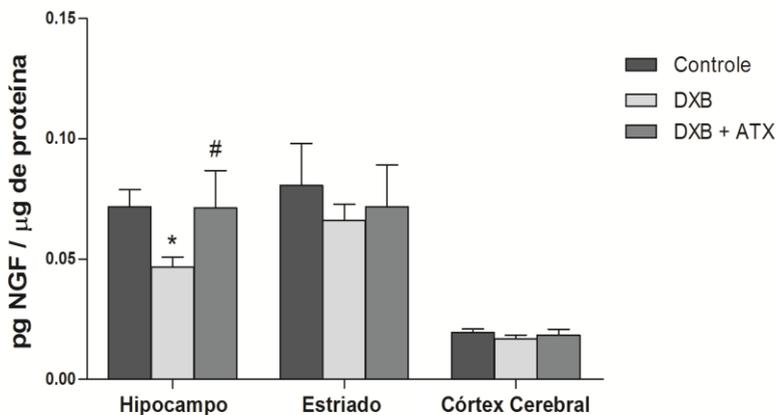


Figura 11: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes (ATX) sobre os níveis proteicos do fator de crescimento neural (NGF) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante seu desenvolvimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ comparado ao grupo DXB (teste de Tukey).

O próximo passo do estudo foi avaliar os níveis de mRNA do gene *ngf* no hipocampo após a administração aguda e crônica de AACR. Os resultados demonstraram que a administração aguda de AACR em ratos de 10 dias de idade ocasionou uma diminuição significativa no hipocampo, quando comparado com o grupo controle, sugerindo que neste caso, a diminuição observada nos níveis proteicos de NGF pode estar diretamente relacionada à expressão reduzida de NGF (Figura 12A). Por outro lado, os níveis de mRNA do gene *ngf* não foram alterados após a administração aguda em animais com 30 dias de idade (Figura 12B). Além disso, a administração crônica de AACR resultou em uma tendência a redução dos níveis de mRNA do gene do *ngf* no hipocampo, embora não significativa. Enquanto que nos animais submetidos à administração de AACR e antioxidantes foi observado um aumento nos níveis de mRNA, sugerindo que o aumento dos níveis proteicos de NGF observado pode ser diretamente relacionado a maior expressão do gene *ngf* (Figura 12C).

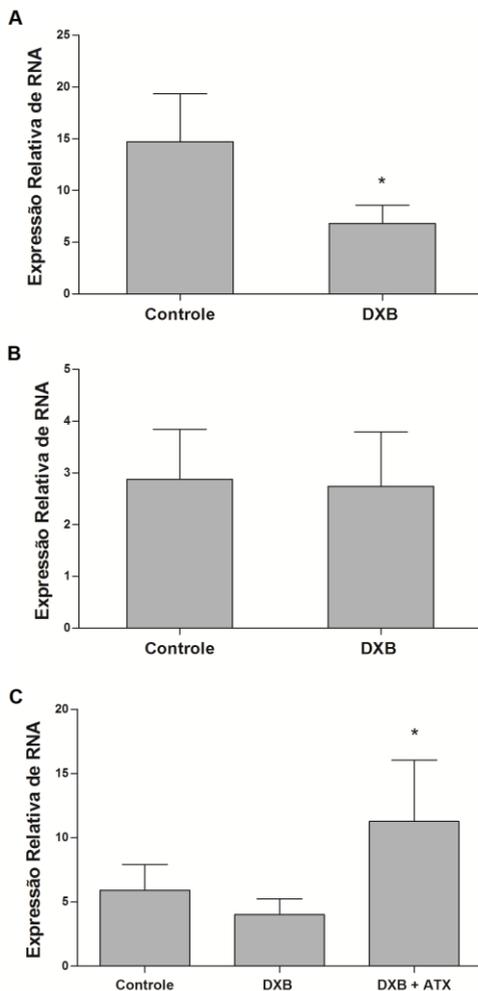


Figura 12: Expressão de mRNA do gene do fator de crescimento neural (*ngf*) após a administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) em animais de 10 dias de idade (A), 30 dias de idade (B) e a administração crônica de AACR e antioxidantes (C) no hipocampo de ratos durante seu desenvolvimento. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. (teste t de Student; teste de Tukey).

Efeitos da administração aguda de AACR sobre os níveis de mRNA do gene *tPA* e *S100A10* e os níveis proteicos de pro-BDNF, BDNF, tPA e S100A10

Inicialmente, foram analisados os efeitos da administração aguda AACR sobre os níveis proteicos de BDNF total em ratos de 10 e 30 dias de idade. A administração aguda de AACR em animais de 10 dias de idade aumentou os níveis proteicos de BDNF total no hipocampo e estriado, quando comparado ao grupo controle. Enquanto que os níveis proteicos de BDNF total não foram afetados no córtex cerebral (Figura 13).

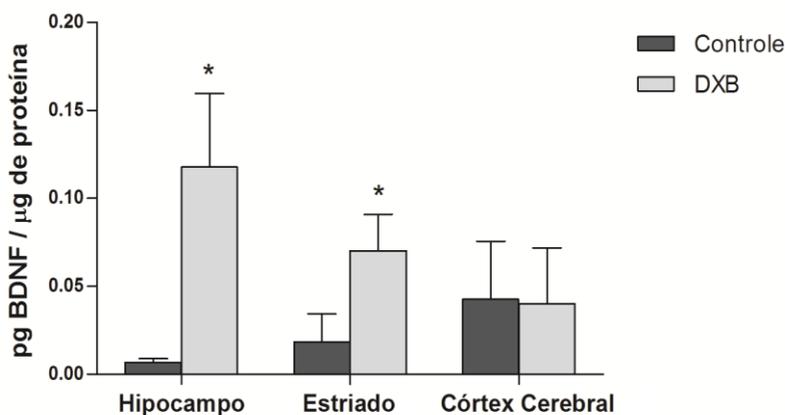


Figura 13: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis proteicos do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

Por outro lado, a administração aguda em ratos de 30 dias aumentou os níveis proteicos de BDNF total apenas no estriado, quando comparado ao grupo controle (Figuras 14).

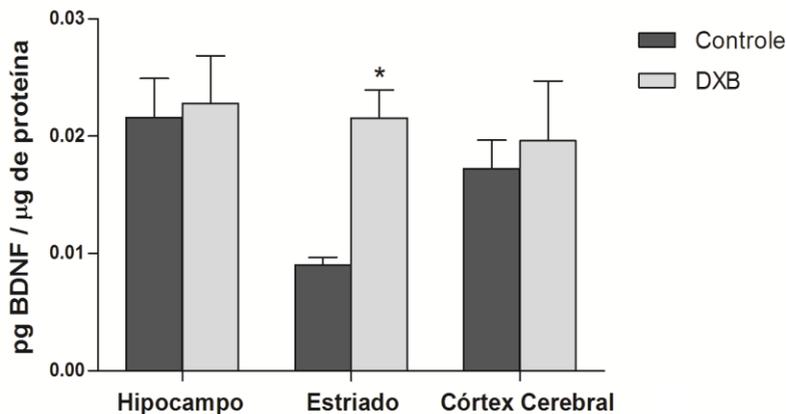


Figura 14: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis proteicos do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 30 dias de idade. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

No entanto, o teste de ELISA não permite distinguir entre pro-BDNF e BDNF maduro (mBDNF), uma vez que eles são igualmente reconhecidos pelo anticorpo utilizado no teste de ELISA. Devido aos potenciais efeitos contrastantes do pro-BDNF e do mBDNF, o próximo passo deste estudo buscou avaliar os níveis do pro-BDNF no cérebro. Os resultados demonstram que os níveis proteicos de pro-BDNF foram aumentados no hipocampo e estriado após a administração aguda de AACR em ratos de 10 dias de idade (Figura 15A). Enquanto que em ratos de 30 dias de idade foi observado um aumento nos níveis proteicos de pro-BDNF apenas no estriado (Figura 15B).

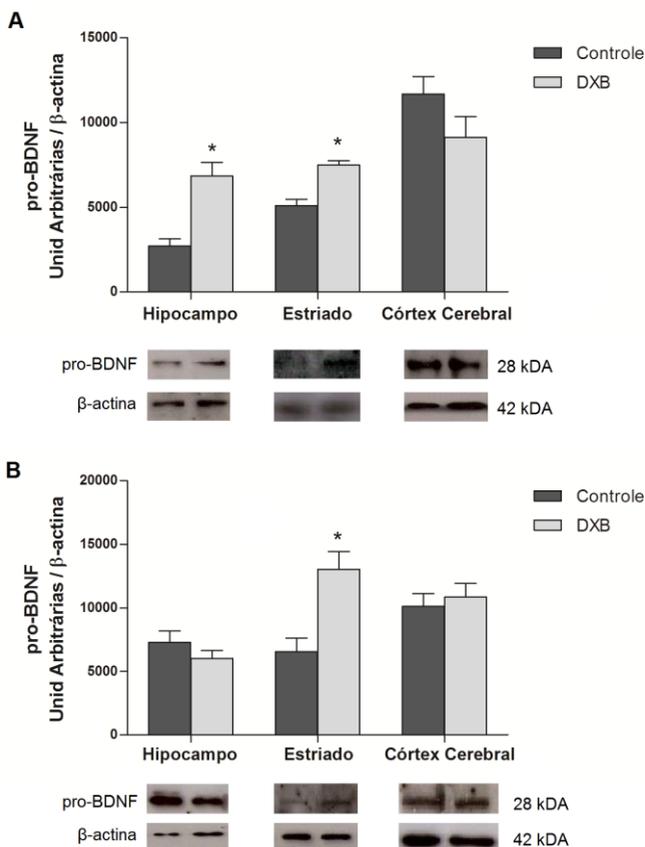


Figura 15: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis proteicos do pro-BDNF no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 10 (A) e 30 (B) dias de idade. A Figura mostra bandas representativas de imunoblotting dos grupos. A razão entre a densidade óptica integrada (DOI) da proteína de interesse da β -actina foi utilizada para a análise estatística. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo de controle (teste t de Student).

O próximo passo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração aguda de AACR sobre os níveis das proteínas relacionadas à clivagem do BDNF, a S100A10 e o tPA. Os resultados demonstraram que a administração aguda de AACR em animais de 10

dias de idade diminui os níveis proteicos de tPA no hipocampo e estriado, quando comparado ao grupo controle (Figura 16A). Além disso, os níveis de tPA foram significativamente diminuídos no estriado de ratos de 30 dias de idade após a administração aguda de AACR, quando comparado ao grupo controle (Figura 16B).

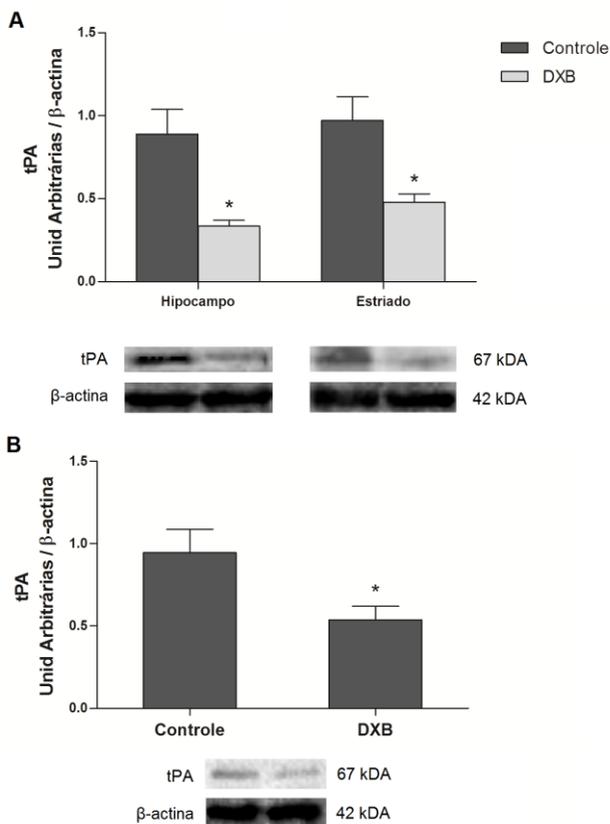


Figura 16: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis proteicos de tPA no cérebro de ratos com 10 dias de idade (A) e 30 dias de idade (B). A Figura mostra bandas representativas de immunoblotting dos grupos. A razão entre a densidade óptica integrada (DOI) da proteína de interesse da β -actina foi utilizada para a análise estatística. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo de controle (teste t de Student).

Com relação aos níveis proteicos de S100A10, observou-se que a administração aguda de AACR não alterou os níveis proteicos dessa proteína no hipocampo e estriado de ratos de 10 dias de idade, bem como não alterou os níveis de S100A10 no estriado em ratos de 30 dias de idade (Figura 17A e 17B).

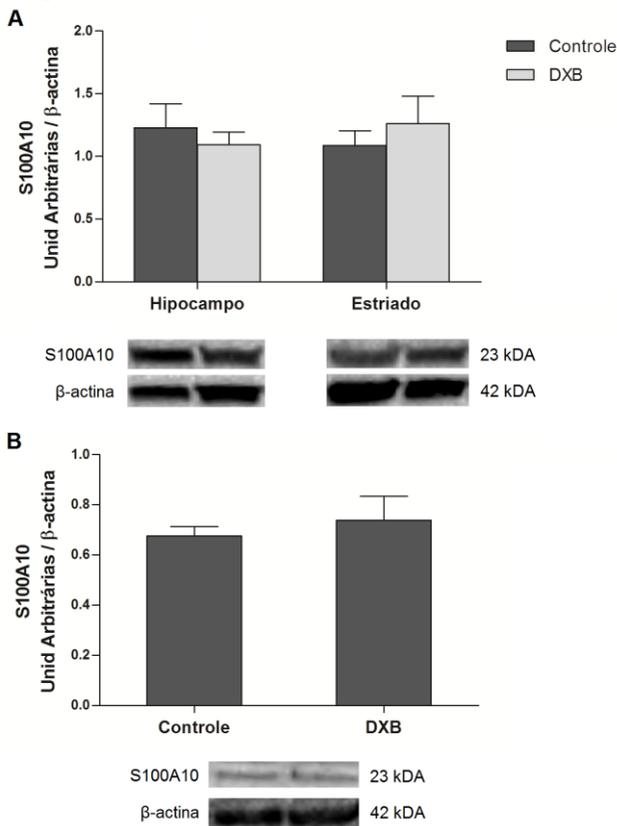


Figura 17: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis proteicos de S100A10 em cérebro de ratos com 10 dias de idade (A) e 30 dias de idade (B). A Figura mostra bandas representativas de imunoblotting dos grupos. A razão entre a densidade óptica integrada (DOI) da proteína de interesse da β -actina foi utilizada para a análise estatística. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de 5-6 animais por grupo (teste t de Student).

Por fim, foram analisados os níveis de mRNA dos genes de *tPA* e *S100A10*. A análise em tempo real de RT-PCR não revelou diferenças significativas nos níveis de mRNA de *S100A10* e *tPA* no hipocampo e estriado de ratos com 10 dias de idade, em comparação com o grupo de controle (Figura 18A e 18B, respectivamente).

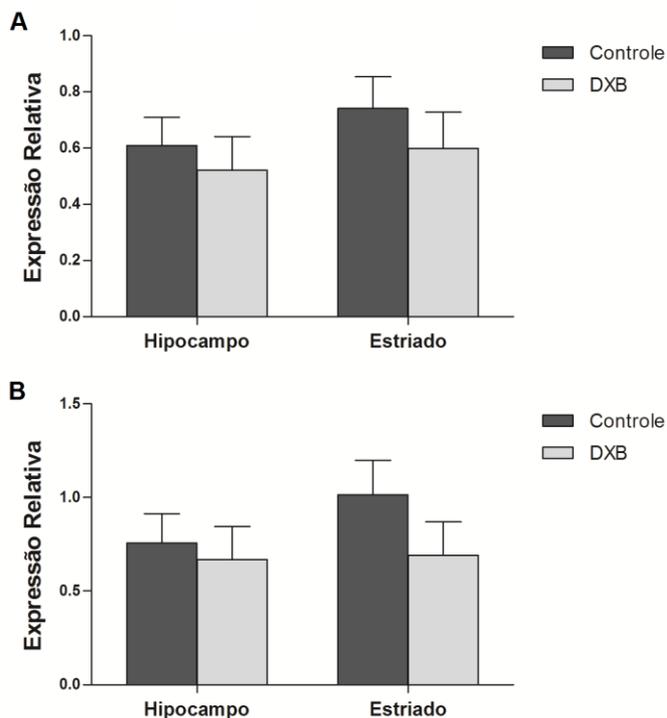


Figura 18: Expressão de mRNA do gene do S100A10 (A) e tPA (B) após a administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) no hipocampo e estriado de ratos com 10 dias de idade. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de 5-6 animais por grupo (teste t de Student).

Além disso, os níveis de mRNA dos genes *S100A10* e *tPA* não foram afetados no estriado após a administração aguda em ratos de 30 dias de idade, em comparação com o grupo controle (Figura 19A e 19B, respectivamente).

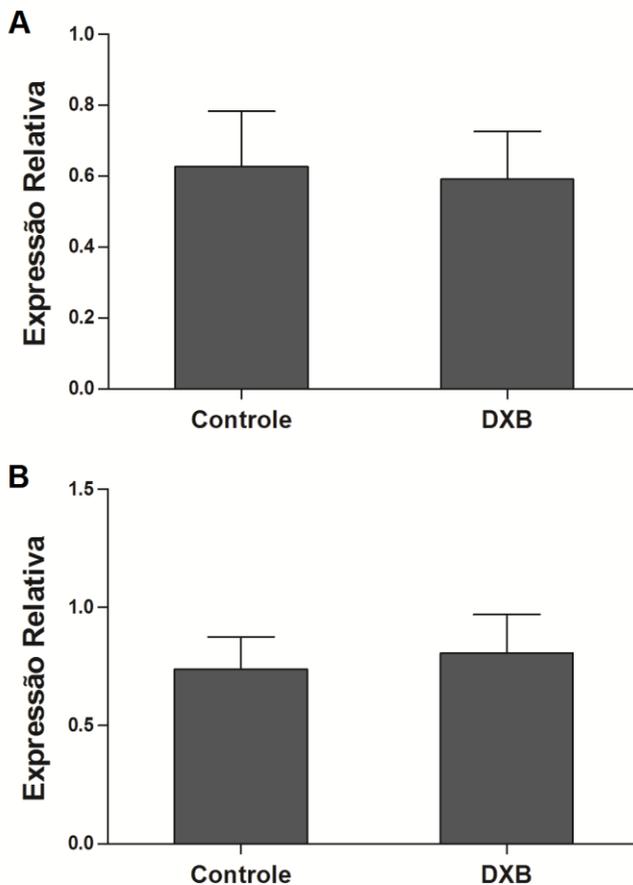


Figura 19: Expressão de mRNA do gene do *S100A10* (A) e *tPA* (B) após a administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) no estriado de ratos com 30 dias de idade. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de 5-6 animais por grupo (teste t de Student).

Efeitos da administração crônica de AACR sobre os níveis de mRNA do gene *bdnf* e os níveis proteicos de pro-BDNF e BDNF

Em seguida, foram analisados os efeitos da administração crônica de AACR sobre os níveis proteicos do BDNF e de seu precursor pro-BDNF no hipocampo, estriado e córtex cerebral. Os níveis proteicos de BDNF no hipocampo e córtex cerebral, no grupo DXB foram significativamente mais elevados quando comparados com o grupo de controle. No entanto, os níveis proteicos de BDNF não foram afetados no estriado. Além disso, observou-se que a administração concomitante de NAC mais DFX preveniu o aumento nos níveis proteicos de BDNF ocasionado pelo AACR (Figura 20).

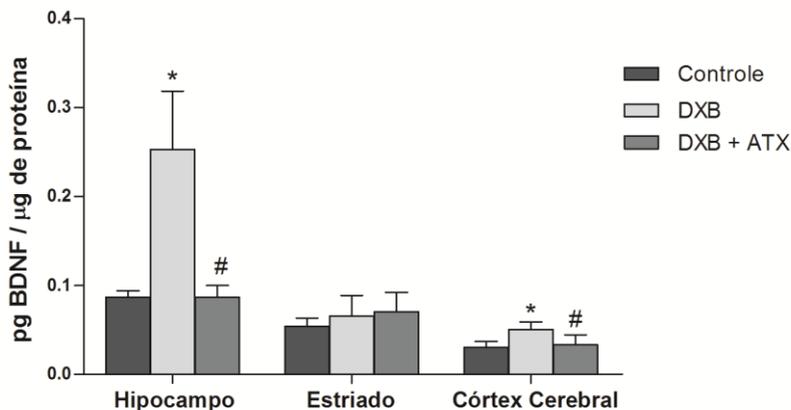


Figura 20: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes (ATX) sobre os níveis proteicos do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante o seu desenvolvimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ comparado ao grupo DXB (teste de Tukey).

Além disso, demonstrou-se que a administração crônica AACR mostrou uma tendência para uma ligeira redução (10-30%) nos níveis proteicos de pro-BDNF no hipocampo e córtex cerebral, no entanto não

atingiu significância. Além disso, no grupo DXB suplementado com antioxidantes os níveis proteicos de pro-BDNF se aproximam aos valores do grupo controle (Figura 21).

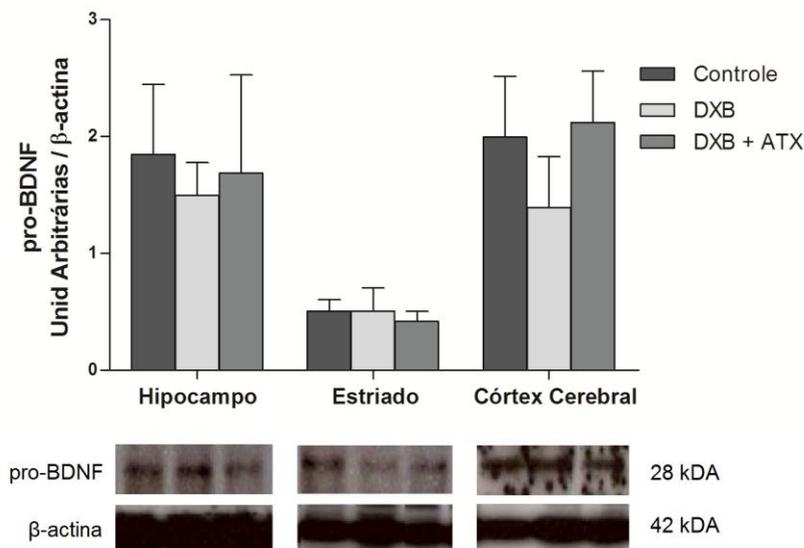


Figura 21: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes (ATX) sobre os níveis proteicos de pro-BDNF no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante o seu desenvolvimento. A Figura mostra bandas representativas de imunoblotting dos grupos. A razão entre a densidade óptica integrada (DOI) da proteína de interesse da β -actina foi utilizada para a análise estatística. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de 5-6 animais por grupo (teste de Tukey).

Os níveis de mRNA do gene *bdnf* também foram avaliados. Observou-se que após a administração crônica de AACR no hipocampo, estriado e córtex cerebral os níveis de mRNA do gene *bdnf* não foram alterados, quando comparado ao grupo controle. No entanto, a expressão de mRNA do gene *bdnf* foi regulada negativamente no hipocampo dos animais do grupo DXB suplementado com antioxidantes (Figura 22).

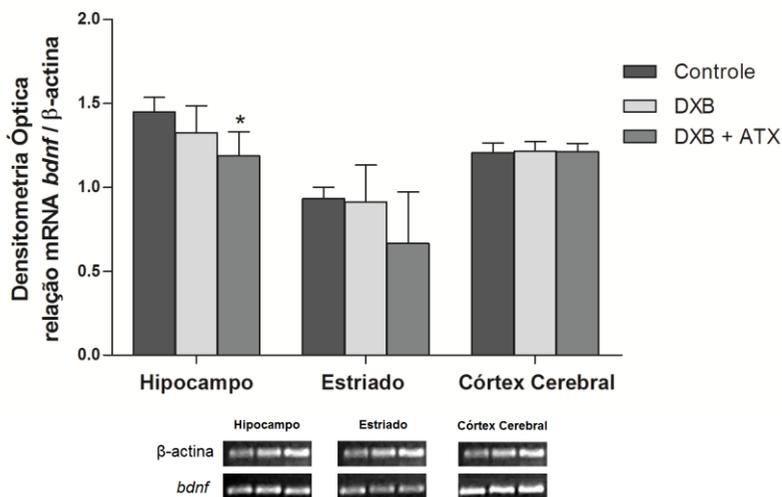


Figura 22: Expressão de mRNA do gene do *bdnf* após a administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes (ATX) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante o seu desenvolvimento. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste de Tukey).

Efeitos da administração aguda e crônica de AACR sobre a memória aversiva

Inicialmente, o presente estudo teve como objetivo investigar se a administração aguda e crônica de AACR causa prejuízo comportamental. A tabela 4 demonstra que não houve alteração significativa no desempenho dos animais após a administração aguda e crônica de AACR em cinco categorias funcionais distintas: reflexo e função sensorial, estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autônoma, tônus muscular e força.

Tabela 4. Comprometimento comportamental após a administração aguda e crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), usando o protocolo SHIRPA. Os dados estão expressos como média \pm SEM, n = 12 animais por grupo.

Testes Grupos	Administração Aguda		Administração Crônica		
	Controle	DXB	Controle	DXB	DXB + ATX
Reflexo e função sensorial	12,9 (0,1)	12,8 (0,2)	10,6 (0,65)	10,25 (0,83)	10,55 (0,37)
Estado neuropsiquiátrico	8,2 (0,48)	8,4 (0,16)	4,6 (0,41)	6,12 (0,61)	5,33 (0,47)
Comportamento motor	11,50 (0,22)	11,8 (0,13)	10,25 (0,31)	10,87 (0,44)	10,88 (0,20)
Função autônoma	4,7 (0,15)	5 (0)	4,5 (0,32)	4,87 (0,39)	4,44 (0,24)
Tônus muscular e força	6 (0)	6 (0)	6,37 (0,46)	7,12 (0,61)	6,77 (0,32)

Em seguida, foi investigado se a administração aguda e crônica de AACR induziria mudanças na memória aversiva. A figura 23 mostra que não houve diferença significativa no tempo de latência entre os grupos durante o treinamento. No entanto, observou-se uma diferença estatisticamente significativa na memória aversiva de curto e longo prazo, quando comparado com o grupo controle. Além disso, observou-se que nos animais submetidos à administração dos AACR não houve diferença significativa na memória de curta duração, quando comparado com o treino, sugerindo um déficit na memória aversiva.

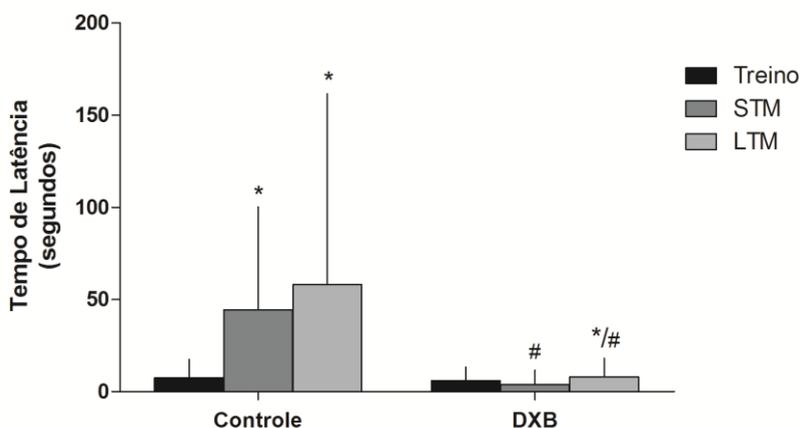


Figura 23: Efeito da administração aguda aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre a memória de curto (1,5 h após o treino) e longo prazo (24 h após o treino) durante a tarefa de esquivas inibitória. STM: Memória de curta duração. LTM: Memória de longa duração. Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil, $n = 12$ animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o treino. # $p < 0,05$ em comparação com o grupo de controle (teste de Wilcoxon).

Posteriormente, observou-se que os animais submetidos à administração aguda AACR apresentam um aumento significativo no número de treinos requeridos para atingir o critério de aquisição (50 segundos sobre a plataforma), quando comparado com o grupo de controle (Figura 24). Os resultados desta tarefa sugerem que o grupo DXB necessita de aproximadamente duas vezes mais estímulos para atingir o critério de aquisição em comparação com o grupo controle,

indicando dificuldade de aprendizagem. No teste de retenção de memória, não houve diferença entre os grupos (Figura 24).

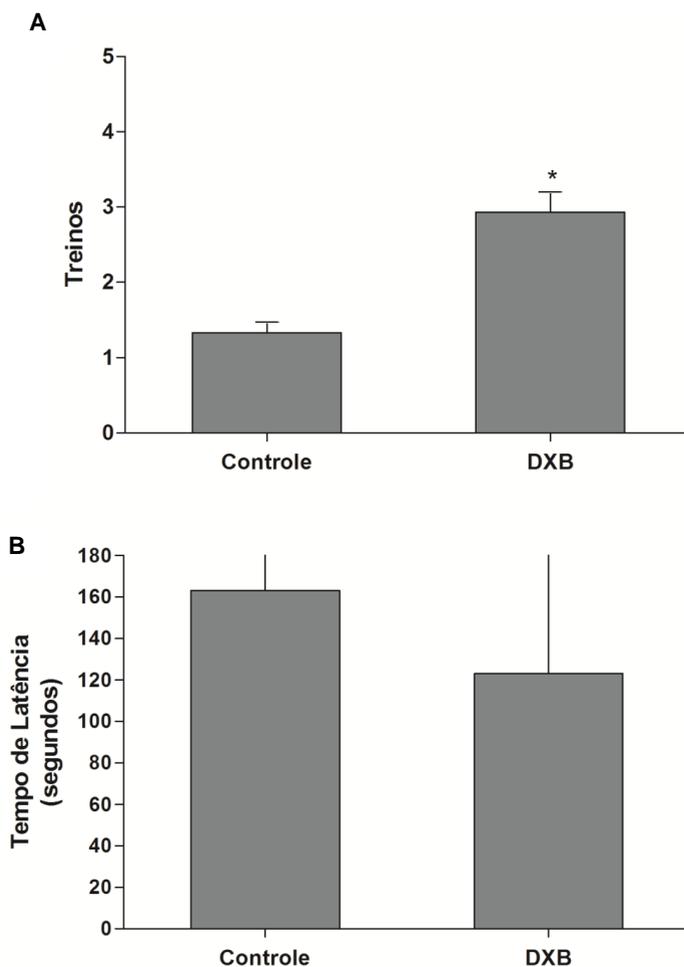


Figura 24: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) na aquisição (A) e retenção (B) de memória durante o teste de esQUIVA inibitória de múltiplos treinos. Os dados do gráfico A são apresentados com média \pm desvio padrão (teste t de Student). Os dados do gráfico B são apresentados como mediana e intervalo interquartil, $n = 12$ animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo de controle (teste de Wilcoxon).

Finalmente, investigou-se o efeito da administração crônica de AACR e a influência da suplementação de antioxidantes sobre as mudanças na aquisição e retenção de memória provocada pela administração de AACR. Nossos resultados demonstraram que durante a sessão treino não houve diferença significativa entre os grupos. Na sessão de teste, observou-se um redução significativa no tempo de latência, quando comparado com o grupo controle, e esta alteração foi prevenida pela suplementação com antioxidantes (Figura 25).

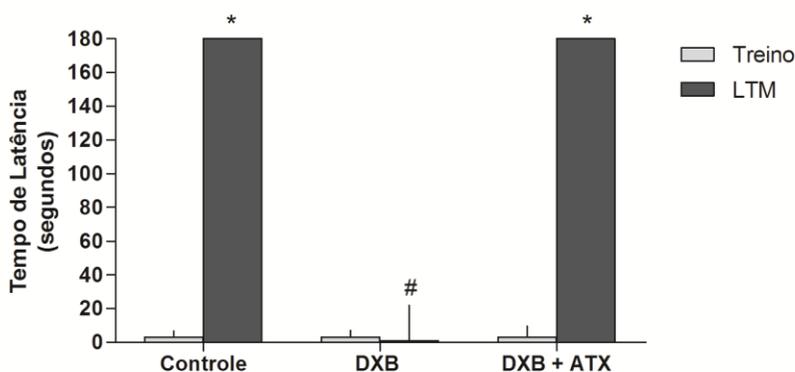


Figura 25: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes sobre a memória de longo prazo (24 h após o treino) durante a tarefa de esquivia inibitória. Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil, $n = 12$ animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o treino. # $p < 0,05$ em comparação com o grupo de controle.

Além disso, observou-se que os animais submetidos a administração crônica de AACR apresentaram maior número de treinos para atingir o critério de aquisição, indicando um déficit de aprendizagem, quando comparado como grupo controle, e a suplementação com antioxidante foi capaz de manter o número de treinos similares ao grupo controle, mostrando que o tratamento foi capaz de prevenir o déficit de aprendizagem (Figura 26A). Por outro lado, no teste de retenção não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 26B).

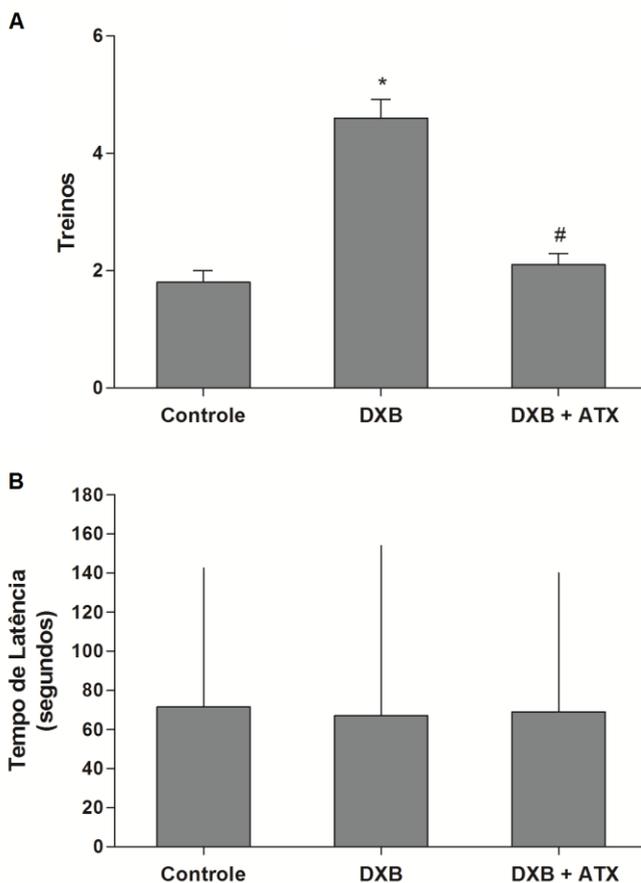


Figura 26: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes na aquisição (A) e retenção (B) de memória durante o teste de esQUIVA inibitória de múltiplos treinos. Os dados do gráfico A são apresentados com média \pm desvio padrão (teste de Tukey). Os dados do gráfico B são apresentados como mediana e intervalo interquartil, $n = 12$ animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo de controle (teste de Wilcoxon).

Efeitos da administração aguda e crônica de AACR sobre a memória não aversiva

Na tarefa de habituação ao campo aberto não houve diferença no número de “*crossings*” e “*rearings*” entre os grupos durante o treino, tanto nos animais submetidos à administração aguda, quanto nos animais submetidos à administração crônica de AACR, estes resultados demonstram que não houve diferença na atividade motora e exploratória entre grupos (Figura 27 e 28, respectivamente). No grupo controle, de ambos os tratamentos, houve uma redução significativa no número de “*crossings*” e “*rearings*” na sessão de teste, quando comparado com sessão treino. No grupo DXB, não houve diferença significativa no número de “*crossings*” e “*rearings*” na sessão de teste, quando comparado com a sessão treino, sugerindo comprometimento da memória não aversiva após a administração aguda e crônica de AACR (Figura 27 e 28). Além disso, o presente estudo demonstrou que os animais que receberam a suplementação com antioxidantes apresentaram uma redução no número de “*crossings*” e “*rearings*” na sessão de teste, quando comparado com a sessão treino, sugerindo que o déficit de memória causado pelo AACR foi prevenido pela suplementação com antioxidantes (Figura 28).

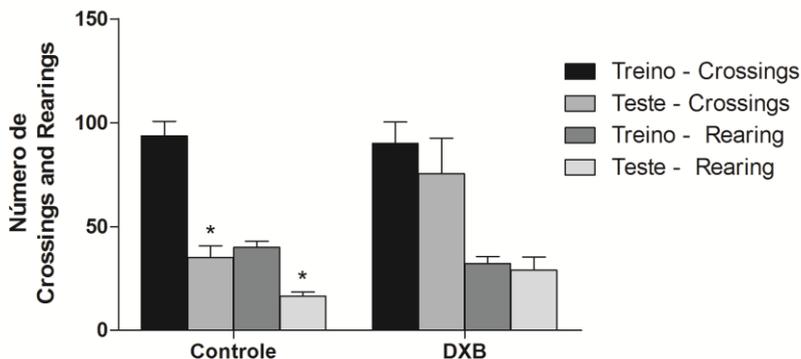


Figura 27: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre a memória não aversiva na tarefa de habituação ao campo aberto. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão, $n = 12$ animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com a sessão treino (teste de Wilcoxon).

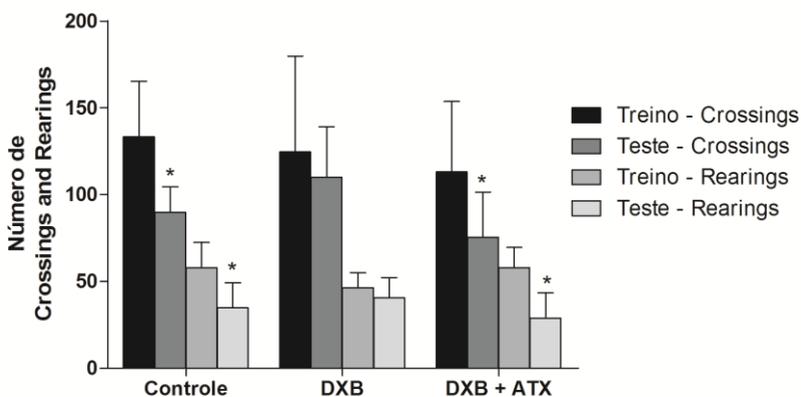


Figura 28: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e antioxidantes sobre a memória não aversiva na tarefa de habituação ao campo aberto. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão, $n = 12$ animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com a sessão treino (teste de Wilcoxon).

Para o teste de reconhecimento de objetos, os animais foram colocados no ambiente em que foi realizado o teste de habituação ao campo aberto. Porém nesse teste foi avaliada a capacidade de memorização e exploração de objetos. Os resultados demonstraram que os animais do grupo controle e do grupo DXB apresentaram uma porcentagem significativamente maior no tempo de exploração de um novo objeto durante a memória de curta e longa duração, demonstrando que os animais do grupo DXB não apresentaram déficit de memória no teste de reconhecimento de objetos (Figura 29A).

Por outro lado, os animais submetidos à administração crônica de AACR apresentaram déficit de memória no teste de reconhecimento de objetos, uma vez que os animais do grupo controle apresentaram uma porcentagem significativamente maior de tempo de exploração do novo objeto no teste de curta e longa duração, enquanto que os animais do grupo DXB apresentam um tempo de exploração ao novo objeto similar à sessão treino. Além disso, após o tratamento com antioxidantes os animais apresentaram um aumento significativo no índice de reconhecimento no teste de curta e a longa duração (Figura 29B).

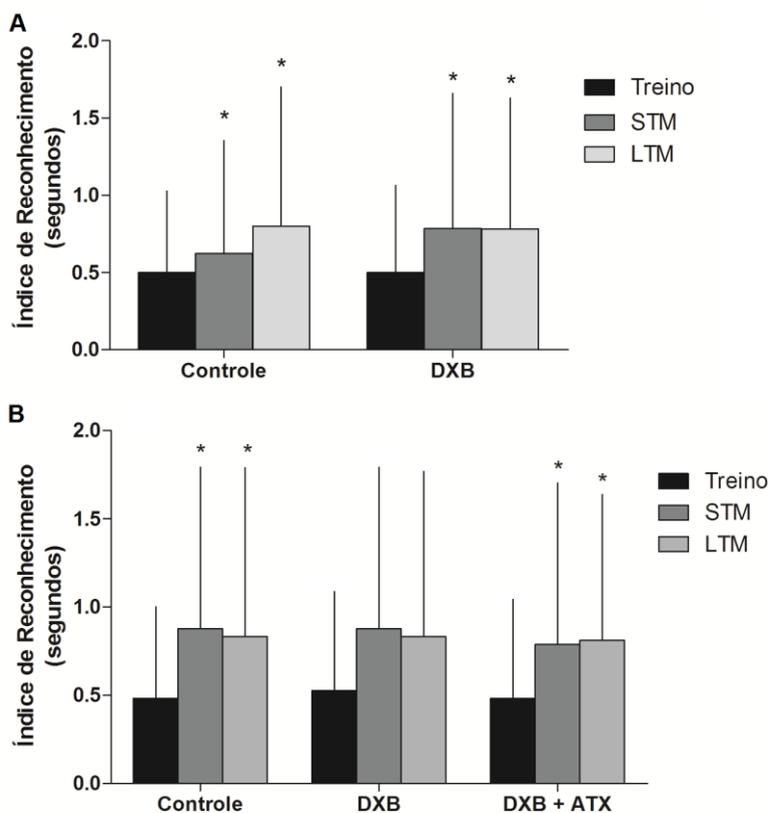


Figura 29: Efeito da administração aguda aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) (A) e da administração de crônica de AACR e antioxidantes (B) sobre a memória não aversiva na tarefa reconhecimento de objetos. Os dados são expressos como a mediana \pm intervalo interquartil, $n = 12$ animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com a sessão treino (teste de Wilcoxon).

Efeitos da administração crônica de AACR, antioxidantes e imipramina sobre o comportamento depressivo

Como demonstrado na Figura 30, a administração crônica de AACR diminuiu o consumo de sacarose, quando comparado com o grupo controle, e o tratamento com antioxidantes ou imipramina preveniu parcialmente a redução do consumo de alimentos doces, quando comparado com o grupo DXB. Além disso, observou-se que não houve diferença do peso corporal dos animais nos diferentes grupos (Tabela 5).

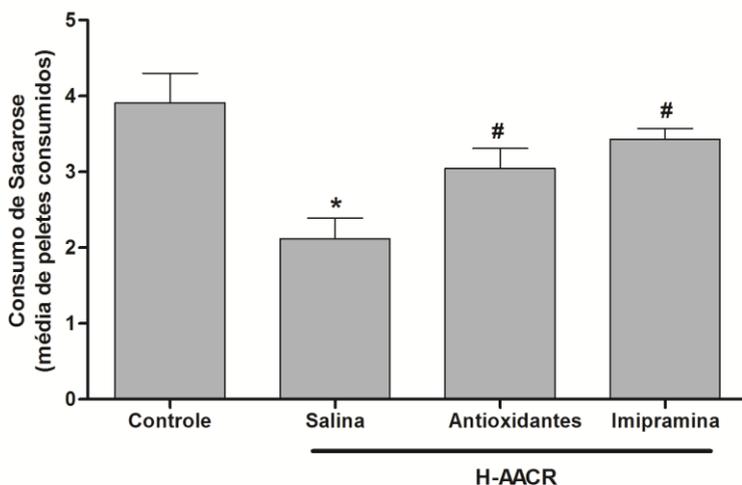


Figura 30: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), antioxidantes e imipramina sobre o consumo de sacarose, durante o teste anedonia. Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado ao controle. # $p < 0,05$ comparado ao grupo DXB (teste de Wilcoxon).

Tabela 5. Efeitos da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), antioxidantes (ATX) e imipramina (IMI) sobre o peso corporal no dia 0 (A) e dia 22 (B). Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de 12 ratos.

	Peso Corporal	
	Dia 0	Dia 22
Controle	11,65 (1,06)	48,77 (4,53)
AACR	11,78 (0,918)	48,94 (2,93)
AACR + ATX	11,81 (0,99)	49,86 (3,22)
AACR + IMI	11,63 (1,07)	47,62 (1,42)

Entretanto, houve um aumento no peso da glândula adrenal nos animais do grupo DXB, em comparação com o grupo controle, e tratamento com antioxidantes ou imipramina foi capaz de manter o peso a glândula adrenal similar ao grupo controle (Figura 31).

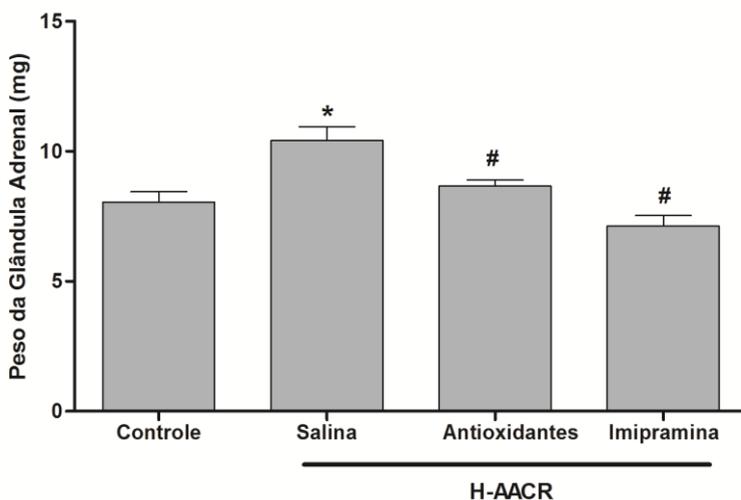


Figura 31: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), antioxidantes e imipramina sobre o peso da glândula adrenal. Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado ao controle. # $p < 0,05$ comparado ao grupo DXB (teste de Tukey).

Por fim, avaliou-se o efeito da administração crônica de AACR sobre o tempo de imobilidade no teste de natação forçada. Os resultados demonstram um aumento no tempo de imobilidade no grupo DXB, em comparação com o grupo controle. Além disso, o tratamento com antioxidantes ou imipramina apresentou um efeito antidepressivo, uma vez que o tempo de imobilidade dos animais tratados com antioxidantes ou imipramina apresentou-se similar ao tempo de imobilidade dos animais controle (Figura 32).

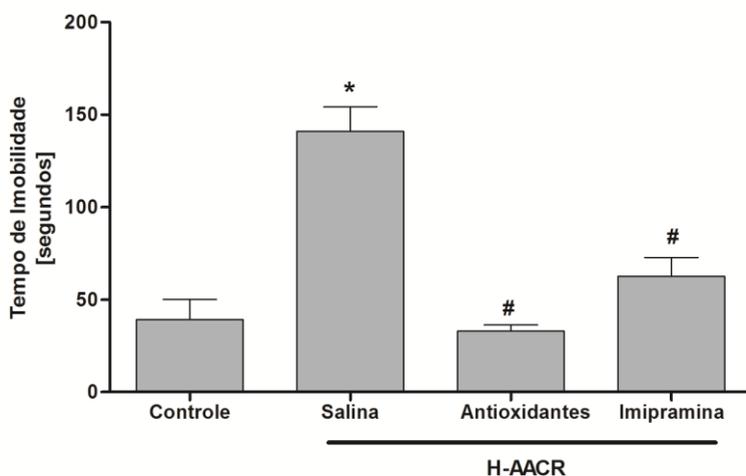


Figura 32: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), antioxidantes e imipramina sobre o tempo de imobilidade durante a tarefa de nado forçada. Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ comparado ao grupo DXB (teste de Wilcoxon).

V. DISCUSSÃO

Pacientes com DXB mostram extensos danos no cérebro, incluindo edema cerebral, atrofia dos hemisférios cerebrais, degeneração da matéria branca e hipomielinização/desmielinização (Snyderman et al., 1964; Chuang e Shih, 2001; Schonberger et al., 2004), resultando em atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e disfunção neurológica em suas diferentes formas de expressão. Apesar das sequelas neurológicas serem comuns em pacientes com DXB, os mecanismos do dano cerebral nesta doença ainda são pouco conhecidos. No entanto, a leucina e/ou o seu α -cetoácido são considerados como sendo os principais metabólitos neurotóxicos na DXB, uma vez que o aumento das concentrações plasmáticas destes compostos (cerca de 5,0 mM) está associado com o aparecimento de sintomas neurológicos (Snyderman et al., 1964; Chuang e Shih, 2001). Além disso, tem sido demonstrado que os metabólitos acumulados na DXB afetam o metabolismo energético (Howell e Lee, 1963; Land et al., 1976; Danner e Elsas, 1989; Pilla et al., 2003; Sgaravatti et al., 2003; Ribeiro et al., 2008; Amaral et al., 2010), induzem o estresse oxidativo (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005a; Bridi et al., 2005b; Mescka et al., 2011; Mescka et al., 2013) e causam apoptose e morte celular em neurônios e outros tipos de células (Jouvet et al., 2000a; Jouvet et al., 2000b; Funchal et al., 2002; Pessoa-Pureur et al., 2002; Funchal et al., 2004a). A neurotoxicidade da leucina pode decorrer, pelo menos em parte, pela sua capacidade em interferir no transporte de outros aminoácidos neutros grandes através da barreira hematoencefálica (BHE), reduzindo o fornecimento de triptofano, metionina, tirosina, fenilalanina, histidina, treonina e valina para o cérebro (Gjedde e Crone, 1983; Smith e Takasato, 1986; Boado et al., 1999; Killian e Chikhale, 2001), levando a diminuição da síntese de neurotransmissores, tais como dopamina, serotonina, norepinefrina e histamina (Kamei et al., 1992, Araújo et al., 2001, Zinnanti et al., 2009). No entanto, muitas questões permanecem sem resposta sobre a patogênese da disfunção cerebral na DXB.

Inicialmente demonstrou-se que os AACR, após a administração aguda, aumentam a atividade da AChE, e este aumento não está diretamente relacionado ao aumento da expressão do gene da *ache*. Esta discrepância aparente entre a atividade da AChE e a sua expressão, pode ser resultado de alterações pós-traducionais, uma vez que a maquinaria de transcrição é continuamente controlado pela regulação da transcrição/tradução, modificações nas interações proteína-

proteína e uma rede metabólica, que formam um sistema que permite que as células respondam de forma sensível a múltiplos sinais que existem em seu ambiente (Krishna et al., 2006). Grifman e colaboradores (1997) demonstram que a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de cAMP (PKA) pode fosforilar a AChE em locais não-consenso. Neste contexto, observamos que as subunidades catalíticas da AChE de ratos apresentam diferentes sítios de fosforilação, como o S-88 (PKA), T-280 (PKA) e S-593 (PKC), de acordo com a análise realizada em NetPhosK, uma ferramenta que faz a previsão dos locais da fosforilação de proteínas, quinase-específica. Assim, a fosforilação da AChE por PKA pode ser uma possível candidata para realizar o aumento na atividade AChE observada após a administração aguda de AACR. Além disso, o fenômeno conhecido como *feedback* negativo (Salgado et al., 2001; Keseler et al., 2005), que situa-se na interface das redes metabólicas e genéticas, poderia esclarecer o concomitante aumento da hidrólise acetilcolina e a diminuição dos níveis de mRNA do gene da *ache* no hipocampo após a administração aguda de AACR.

Por outro lado, os resultados demonstraram que os níveis de mRNA do gene da *ache* aumentaram significativamente após a administração crônica de AACR no córtex cerebral, sugerindo que o aumento da atividade AChE observado neste tratamento pode ser diretamente relacionado a uma maior expressão do gene da *ache*. Interessantemente, a administração de antioxidante (NAC + DFX) foi capaz de impedir o aumento da atividade da AChE, mas não de alterar os níveis de mRNA. No estriado, os níveis de mRNA do gene da *ache* diminuíram significativamente após a administração crônica de AACR, sugerindo que o aumento da atividade da AChE observada nesta região não está diretamente relacionado com um aumento da expressão de gene desta enzima e que o aumento da hidrólise de acetilcolina pode levar a diminuição da expressão do gene da *ache* devido a um *feedback* negativo. Por outro lado, a regulação da atividade AChE observada no estriado e no hipocampo poderia ser atribuída a possíveis alterações no estado de fosforilação da mesma. Neste contexto, sugere-se que a fosforilação da AChE por PKA pode estar diretamente ligada com o aumento a atividade da AChE após a administração crônica, e que a fosforilação da AChE por PKA pode ocorrer em decorrência do aumento de espécies reativas de oxigênio, uma vez que diversos estudos demonstram que os AACR causam estresse oxidativo (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005a; Bridi et al., 2005b; Mescka

et al., 2011; Mescka et al., 2013), que o tratamento com antioxidantes foi capaz de impedir o aumento da atividade da AChE e que espécies reativas de oxigênio estão envolvidas em diferentes eventos de capacitação relacionados com o aumento dos níveis de cAMP e ativação da via PKA dependente de cAMP (Leclerc et al., 1997; Aitken et al., 1998; Herrero et al., 2000). Assim, a fosforilação da AChE por PKA poderia ser um fator decisivo na mudança conformacional da enzima, levando a um aumento da afinidade da enzima com o substrato (Das et al., 2001; Melo et al., 2003; Aldunate et al., 2004).

A AChE é associada com o desenvolvimento do cérebro, aprendizagem, memória e dano neuronal (Ballard et al., 2005; Metz e Tracey, 2005; Zimmerman e Soreq, 2006). A ativação da AChE leva a uma rápida degradação da acetilcolina e um baixo estímulo subsequente de receptores de acetilcolina causando efeitos indesejáveis sobre as funções cognitivas (Tōugu e Kesvatera, 1996; Soreq e Seidman, 2001). Baseado nos resultados apresentados neste estudo pode-se sugerir que o aumento na atividade da AChE causado pelo acúmulo de AACR leva a uma rápida redução da neurotransmissão colinérgica devido a uma diminuição dos níveis de acetilcolina na fenda sináptica, contribuindo assim para um declínio cognitivo progressivo e outras disfunções neurológicas observadas em pacientes com DXB. Além disso, várias linhas de evidência demonstraram atividades não-catalíticas para a AChE, demonstrando que a enzima desempenha um papel complexo, modulando o crescimento e a morte celular (Greenfield, 1984; Layer e Willbold, 1995; Inestrosa et al., 1996; Karpel et al., 1996). Jiang e Zhang (2008) mostraram que as isoformas da AChE participam da apoptose através da promoção ou supressão de morte celular, onde a melhora da expressão variante da AChE pode influenciar na expressão de outro grupo de genes, incluindo aqueles envolvidos na apoptose (Ben-Ari et al., 2006). Além disso, a AChE também contribui para a formação do apoptossomo durante a apoptose, o silenciamento da AChE com RNA de interferência (siRNA), bloqueia a interação entre o fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1 (Apaf-1) e o citocromo c, impedindo a formação do apoptossomo (Park et al., 2004). Desta forma, considerando que estudos têm demonstrado que os AACR causam apoptose e que a AChE é capaz de promover a apoptose, pode-se sugerir que o aumento da AChE também pode estar relacionado com a morte celular através da ativação de vias apoptóticas em decorrência dos AACR.

Estudos demonstram uma estreita relação entre a AChE e os níveis de NGF, visto que a expressão de enzimas relacionadas com a acetilcolina, tais como a colina-acetiltransferase, a AChE e o transportador vesicular de acetilcolina podem ser reguladas pela ação do NGF (Hartikka e Hefti, 1988; Takei et al., 1988; Takei et al., 1989; Knipper et al., 1994) e que o NGF pode ser regulado pelo sistema colinérgico durante o desenvolvimento (da Penha Berzaghi et al., 1993). Além disso, Jiang e colaboradores (2007) mostraram que o H₂O₂ induziu um aumento da AChE em células apoptóticas por mecanismos que requerem a produção de espécies reativas de oxigênio, e o NGF preveniu o aumento da apoptose associada a AChE, mantendo a fosforilação da proteína quinase B (Akt).

Corroborando com essa hipótese, demonstrou-se que os AACR diminuíram os níveis de NGF no hipocampo de ratos, sendo que nos animais com 10 dias de idade observou-se uma diminuição na expressão de mRNA do gene *ngf*, sugerindo que a diminuição observada nos níveis proteicos de NGF está diretamente relacionada com uma menor expressão do gene *ngf*. Entretanto, em animais de 30 dias de idade e após a administração crônica, a diminuição dos níveis de NGF não foi acompanhada por uma diminuição na expressão gênica, sugerindo que o decréscimo nos níveis proteicos de NGF não está diretamente relacionado com uma menor expressão desse gene nessas estruturas, mas pode ser em função de uma alteração pós-traducional.

Embora o mecanismo exato pelo qual os AACR alteram os níveis de NGF ainda é desconhecido, evidências a partir da literatura mostram que o estresse oxidativo provoca alterações seletivas em cascatas de sinalização ativadas pelo NGF, com a fosforilação da ERK1/2, que é induzida por estes fatores de crescimento, sugerindo um mecanismo de ação comum para que o H₂O₂ module negativamente a fosforilação de CREB (proteína de ligação dos elementos responsivos ao cAMP), independentemente do estímulo aplicado, e este pode ser dependente de Ras (Zhang e Jope, 1999; O'Loghlen et al., 2006). A ativação de CREB é um importante componente molecular no processo de aprendizagem e memória (Abel e Kandel, 1998), e a fosforilação de CREB em Ser133 é um local regulador chave para a transcrição de vários genes, e tem sido associado como um fator fundamental na aprendizagem e memória (Sheng et al., 1991). Confirmando essa hipótese, os resultados do presente trabalho demonstrou que a administração de antioxidantes (NAC + DFX)

preveniui a diminuição nos níveis proteicos de NGF pelo aumento na expressão do gene *ngf*.

Vários estudos demonstram que a supressão genética de NGF está associada com déficits tanto na aquisição quanto na retenção de memória espacial (De Rosa et al., 2005; Pironi et al., 2007; Terry et al., 2011). Além disso, o bloqueio de NGF endógeno por infusão de anticorpos anti-NGF reduz a perfusão de LTP no hipocampo e prejudica a retenção da memória (Zou et al., 2002; Conner et al., 2009), mas a administração intranasal de NGF previne o déficit de memória de reconhecimento de objetos (De Rosa et al., 2005). Essas séries de evidências proporcionam a ligação intrínseca entre NGF endógeno e memória dependente do hipocampo. Assim, níveis anormais de NGF poderiam induzir efeitos negativos a longo prazo. Neste contexto, estudos prévios demonstraram que uma única injeção intra-hipocampal de leucina em ratos adultos prejudica a memória de consolidação e a indução da LTP (Glaser et al., 2010). Além disso, a administração crônica por via subcutânea, de doses elevadas de leucina em ratos jovens induz a déficits de aprendizagem/memória verificadas no teste de campo aberto e nos testes de esquivas inibitórias durante a idade adulta (Mello et al., 1999). Assim, é possível que a alteração dos níveis de NGF durante a maturação cerebral possa ser de importância crucial no desenvolvimento dos efeitos neurotóxicos do AACR, podendo estar relacionada com os déficits cognitivos apresentados pelos pacientes com DXB.

Demonstrou-se que os AACR alteram os níveis de BDNF. Entretanto, os efeitos sobre essa neurotrofina diferem quanto ao tempo de exposição. Observou-se que os níveis BDNF detectados através do método de ELISA apresentaram-se elevados após a administração aguda de AACR. Entretanto, este ensaio não permite distinguir entre o pro-BDNF e o mBDNF, pois eles são igualmente reconhecidos pelo anticorpo utilizado no método de ELISA. A hipótese de yin-yang (Lu et al., 2005) sugere que pro-neurotrofinas e neurotrofinas maduras provocam efeitos opostos através da ativação de receptores $p75^{NTR}$ e Trk, respectivamente. A via do pro-BDNF promove a morte celular (Lee et al., 2001) e atenua a transmissão sináptica por induzir a depressão de longo prazo (LTD) (Woo et al., 2005). Em contraste, a sinalização do mBDNF com o TrkB é essencial para a LTP, sobrevivência e plasticidade celular (Korte et al., 1995; Figurov et al., 1996; Patterson et al., 1996). Neste contexto, uma possibilidade interessante é que, no modelo animal de DXB usado neste estudo, a proporcão entre os níveis

de pro-BDNF e mBDNF pode ser em favor do primeiro, resultando em hiperativação global dos receptores de baixa afinidade $p75^{\text{NTR}}$ e um acoplamento relativamente baixo dos receptores TrkB de alta afinidade. Assim, devido aos potenciais efeitos contrastantes do pro-BDNF e mBDNF, os níveis da proteína precursora no cérebro foram avaliados, demonstrando que a administração aguda de AACR aumenta os níveis de pro-BDNF.

É concebível que a administração aguda de AACR pode diminuir a expressão e/ou a atividade de proteases envolvidas na clivagem proteolítica do pro-BDNF, sendo a tPA um dos principais ativadores de plasminogênio, clivando este em plasmina, que por sua vez cliva a forma pro-BDNF em mBDNF (Lee et al., 2001; Pang et al., 2004), enquanto que a S100A10 é uma proteína dimérica determinante para a interação da proteína anexina II tetrâmero com o tPA e o plasminogênio, estimulando assim a clivagem do plasminogênio em plasmina e consequentemente a clivagem do pro-BDNF em mBDNF (Kassam et al., 1998; Zobiack et al., 2003). Assim, no presente estudo observou-se que a administração aguda de AACR causa uma diminuição nos níveis proteicos de tPA, sem alterar os níveis de S100A10. Curiosamente, demonstrou-se que os níveis de mRNA do gene *tPA* não foram alterados após a administração de AACR, sugerindo que a redução dos níveis proteicos de tPA observado após este tratamento não está diretamente relacionada à sua menor expressão, mas pode ser devido a uma alteração pós-traducional. Por outro lado, não foi observado qualquer alteração nos níveis proteicos e de mRNA da proteína S100A10.

Não há na literatura estudos que esclareçam o mecanismo pelo qual os AACR afetam os níveis de tPA. No entanto, estudos anteriores demonstraram que o estresse oxidativo é capaz de afetar a transcrição de ambos os genes em fígado de ratos, causando um aumento na concentração do inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1 (PAI-1), um modulador da atividade do tPA, que se liga a ele tornando-o inativo (Dimova et al., 2004; Zagotta et al., 2013). Confirmando essa hipótese, Zervos e colaboradores (2011) demonstraram que a intoxicação por endossulfan induz estresse oxidativo no cérebro de ratos adultos e aumenta a atividade do PAI-1. Além disso, a administração de vitamina E, isolada ou em combinação com a vitamina C, apresentou efeitos benéficos, diminuindo o estresse oxidativo e o aumento do PAI-1. Assim, especula-se que a diminuição dos níveis de tPA acompanhado pelo aumento dos níveis proteicos de pro-BDNF após administração

aguda de AACR pode estar associado ao aumento do PAI-1, possivelmente atribuído ao estresse oxidativo causado pelo acúmulo de AACR.

Os resultados observados neste trabalho sugerem que a baixa atividade proteolítica gera níveis menores de mBDNF e, portanto, um acúmulo de pro-BDNF no cérebro. Embora o mecanismo pelos quais os AACR possam diminuir a conversão eficiente do pro-BDNF em mBDNF ainda é desconhecido. Vários estudos têm observado que o pro-BDNF tem uma função biológica distinta do mBDNF (Figurov et al., 1996; Yamada et al., 2000; Lu et al., 2005; Woo et al., 2005; Bekinschtein et al., 2008; Lu et al., 2008), demonstrando que pro-BDNF diminui a viabilidade neuronal e enfraquece as conexões sinápticas (Teng et al., 2005; Woo et al., 2005). Assim, pode-se especular que o acúmulo de pro-BDNF causado pelos AACR pode ser prejudicial para o SNC e contribuir para a disfunção neurológica apresentada pelos pacientes com DXB.

Por outro lado, a exposição prolongada a altos níveis de AACR leva a um aumento nos níveis proteicos de BDNF total, sem alterar os níveis proteicos de pro-BDNF, sugerindo que este aumento é de mBDNF. Estudos têm demonstrado que altos níveis de BDNF apresentam efeitos deletérios, causando prejuízos cognitivos. Cunha e colaboradores (2009) demonstraram que a superexpressão crônica de BDNF no SNC provoca déficits de aprendizagem e perda de memória de curto prazo, em tarefas espaciais e instrumentais de aprendizagem. Além disso, foi relatado que doses elevadas de BDNF *in vitro* (em concentrações de 10 a 100 ng/mL) aceleram a necrose neuronal excitotóxica (Koh et al., 1995) e a morte celular por apoptose induzida por doadores de óxido nítrico (NO) em neurônios corticais embrionários (Ishikawa et al., 2000). Além disso, altas doses de BDNF (12-20 ug/dia) inibem significativamente a regeneração axonal motora, mas doses relativamente baixas de BDNF (0,5-2 ug/dia) promovem a regeneração de neurônios motores lesionados periféricos nos ratos (Boyd e Gordon, 2002). Por fim, evidências mostram que a superexpressão de BDNF está associada com hiperexcitabilidade, e essa hiperexcitabilidade pode contribuir para déficits na aprendizagem e plasticidade (Croll et al., 1999).

Embora o exato mecanismo pelo qual os AACR levam ao aumento dos níveis de BDNF ainda é desconhecido, sugerimos um envolvimento do estresse oxidativo nesse processo, uma vez que a administração de antioxidantes preveniu o aumento nos níveis de

BDNF. Enfatizando essa hipótese, Haddad e Land (2002) sugeriu que espécies reativas de oxigênio podem induzir a fosforilação de p38MAPK. Eles também demonstraram que antioxidantes seletivos (incluindo NAC) reduziram a fosforilação de p38MAPK dependente de espécies reativas de oxigênio. Neste contexto, Ishikawa e colegas (2000) demonstraram que o BDNF, através do receptor TrkB, pode acelerar a via de morte induzida por nitroprussiato de sódio, ao estimular as atividades de ERK e p38MAPK. Além disso, Gwag e colaboradores (1995) demonstraram que o BDNF potencializou a morte neuronal induzida tanto por Fe^{2+} , quanto por L-butionina-(S,R)-sulfoximina, e que a adição de trolox (antioxidante) impediu a morte neuronal.

Tendo em vista que pacientes com DXB usualmente apresentam graus variados de retardo mental e outros sintomas neurológicos (Snyderman et al., 1964; Chuang e Shih, 2001), que os resultados deste estudo demonstram que AACR alteram parâmetros que estão envolvidos nos processos de formação de memória (AChE, NGF e BDNF), como já descrito anteriormente, o próximo passo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração de AACR sobre o comportamento cognitivo.

Observou-se que os AACR causam um prejuízo na memória de curta e longa duração através do teste de esQUIVA inibitória simples, bem como um déficit de aprendizagem sem alterações na memória retenção, observado no teste de esQUIVA inibitória de múltiplos treinos. Utilizando o protocolo SHIRPA, o qual determina diversas funções do SNC, demonstrou-se que os animais submetidos à administração aguda e crônica de AACR não apresentaram prejuízos no estado neuropsiquiátrico, tônus muscular e força, e na função autônoma. Neste contexto, alterações da atividade motora ou emocional provavelmente não contribuíram para o prejuízo de memória causado pela administração de AACR. Além disso, observou-se que a administração aguda e crônica de AACR causa déficit na memória não declarativa (habituação), observado no teste de habituação ao campo aberto. Entretanto, apenas os animais submetidos à administração crônica de AACR demonstraram alterações no teste de reconhecimento de objetos, onde os animais expostos aos AACR não reconheceram a mudança do objeto, já que exploraram da mesma forma e praticamente pelo mesmo tempo os objetos conhecido e novo, ao contrário dos animais controle que demonstraram preferência pelo objeto novo.

Apesar do exato mecanismo através do qual os AACR alteram a memória em ratos ainda ser desconhecido, evidências da literatura mostraram que o estresse oxidativo está associado com o déficit de

memória (Bickford et al., 1999; da Silva et al., 2004; Serrano e Klann, 2004), e que a administração dos agentes antioxidantes são alternativas para melhorar tais déficits (Carney et al., 1991; Carrillo et al., 1993; Knoll et al., 1994; Markesbery, 1997; Small, 1998; Kontush, 2001). Vários estudos evidenciam que um possível mecanismo para o prejuízo na LTP pode ser decorrente de espécies reativas de oxigênio, envolvendo o aumento da c-Jun N-terminal quinase (JNK) e p38MAPK, e a diminuição da ERK, resultando na inibição de liberação de glutamato (Lynch, 1998; McGahon et al., 1999; O'Donnell et al., 2000; Vereker et al., 2000; Kelly et al., 2001; Vereker et al., 2001; Martin et al., 2002; Kelly et al., 2003). Corroborando esta hipótese, o protocolo de tratamento antioxidante impediu o déficit de memória.

Tomados em conjuntos, esses resultados demonstram que os AACR alteram a atividade da AChE, bem como os níveis de neurotrofinas, possivelmente por diferentes modulações em vias de sinalização envolvidas com essas proteínas. Além disso, tomados em conjunto os resultados deste estudo e dados da literatura, pode-se sugerir que o estresse oxidativo seja o responsável por essas modulações, uma vez que os AACR causam estresse oxidativo e que a administração de antioxidantes apresentou efeitos benéficos sobre os parâmetros analisados. Além disso, nossos resultados demonstraram que os animais expostos a altos níveis de AACR apresentaram déficits de memória e aprendizagem. Neste contexto, e com base em dados da literatura, é tentador especular que as alterações nos níveis de neurotrofinas e na atividade da AChE estejam envolvidas no déficit cognitivo observado nesse estudo. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de que os AACR, via estresse oxidativo, possam modular outras vias de sinalização importantes nos processos de memória e aprendizagem (Figura 33).

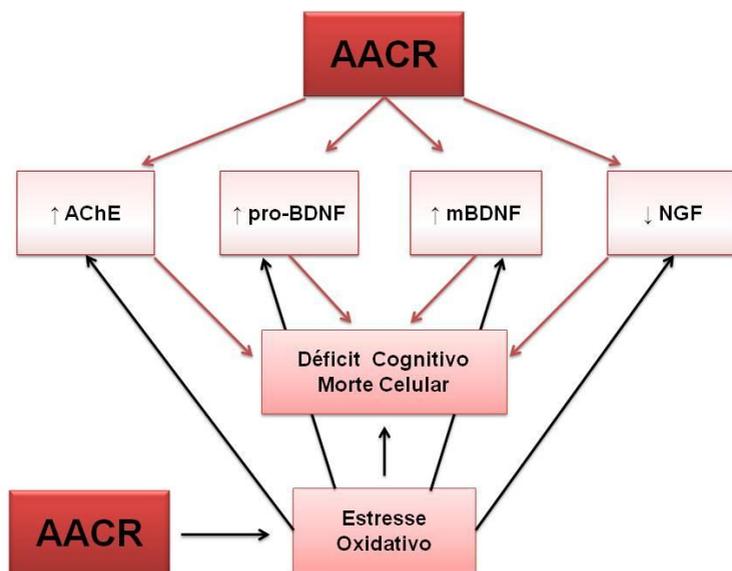


Figura 33: Figura representativa dos efeitos dos aminoácidos sobre parâmetros neuroquímicos (acetilcolinesterase, NGF, pro-BDNF e BDNF) em cérebro de ratos durante o seu desenvolvimento.

Por fim, o último passo deste estudo buscou avaliar os efeitos dos AACR sobre alguns sintomas depressivos, visto que relatos sugerem que o envelhecimento de pacientes com DXB aumentam os risco para o desenvolvimento de problemas neuropsiquiátricos crônicos, como o transtorno de déficit de atenção, depressão e ansiedade (Strauss et al., 2006a, Walterfang et al., 2013). Muelly e colaboradores (2013) mostraram que as deficiências neuroquímicas previamente demonstradas em pacientes com DXB e modelos animais podem persistir no estado crônico, embora em menor grau, e, cumulativamente, contribuir para a morbidade neuropsiquiátrica. No presente estudo, observou-se que os ratos submetidos à administração crônica de AACR apresentam uma ingestão diminuída de alimentos doce e um aumento do peso da glândula adrenal, sem qualquer alteração do peso corporal. Observou-se também um aumento no tempo de imobilidade dos animais submetidos à administração de AACR durante o teste de nado forçado. Como

descrito acima, os AACR não causam alteração da atividade locomotora, reforçando a hipótese de que a diminuição na ingestão de alimentos doce e o maior tempo de imobilidade foram relacionados a mudanças nas tarefas comportamentais (anedonia e nado forçado) e não a alterações motoras.

Além disso, demonstrou-se que a administração de antioxidantes preveniu a diminuição na ingestão de alimentos doce, o aumento no tempo de imobilidade e no peso da glândula adrenal. Corroborando com os resultados do presente trabalho, estudos têm demonstrado que o NAC apresenta atividade antidepressiva em ratos submetidos ao teste de nado forçado (Ferreira et al., 2008) e em camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda (Linck et al., 2012). Smaga e colaboradores (2012) demonstraram que a administração crônica de NAC resultou numa redução, dose dependente, no tempo de imobilidade em ratos bulbectomizados e em um aumento significativo nos mecanismos antioxidantes (atividade da superóxido dismutase). Arent e colaboradores (2012) demonstraram que a administração de NAC e DFX, isoladamente ou em combinação, reverteu a diminuição no consumo de alimentos doce e o estresse oxidativo em ratos submetidos ao modelo de estresse crônico moderado. As ações do NAC são múltiplas e inter-relacionadas, como na produção de glutatona, no ciclo cisteína/cistina, e no transporte reverso cistina-glutamato, contribuindo para a manutenção do equilíbrio oxidativo e da função celular. Além da regulação da liberação de glutamato, o NAC também tem a capacidade de modular a atividade de NMDA e a liberação de dopamina (Gilbert et al., 1991; Leslie et al., 1992; Varga et al., 1997; Baker et al., 2002; Janaky et al., 2007; Gere-Paszti e Jakus, 2009). Além disso, Linck e colaboradores (2012) demonstraram que os receptores AMPA desempenham um papel importante no mecanismo da ação antidepressivo do NAC pela modulação indireta da via serotoninérgica e noradrenérgica. Consistente com esses mecanismos, uma redução de dopamina, serotonina e glutamato e um aumento de espécies reativas de oxigênio é observado em modelo animais de DXB (Dodd et al., 1992; Zinnanti et al., 2009) e em tecido cerebral *pós-mortem* de uma criança que morreu de intoxicação por leucina (Prensky e Moser, 1996).

Curiosamente, demonstrou-se também que a imipramina (um antidepressivo clássico) impediu as alterações comportamentais causadas pelos AACR. A imipramina aumenta os níveis de serotonina e/ou noradrenalina, bloqueando a recaptação desses neurotransmissores

pelos terminais pré-sinápticos (Yagasaki et al., 2006), sugerindo um desequilíbrio na neurotransmissão noradrenérgica e serotoninérgica após a exposição a altos níveis de AACR. De fato, estudos em humanos e animais mostraram baixos níveis de dopamina e serotonina associados com altos níveis de AACR (Wajner e Vargas, 1999; Wajner et al., 2000; Araújo et al., 2001). Além disso, estudos anteriores relataram que o tratamento com antidepressivos apresenta uma ação antioxidante, visto que o tratamento com imipramina reverteu a peroxidação lipídica no cérebro de ratos (Mokoena et al., 2010). Réus e colaboradores (2010) mostraram que a imipramina também apresenta propriedades antioxidantes, reduzindo o dano oxidativo e aumentando a atividade da superóxido dismutase e catalase em cérebro de ratos. Além disso, a imipramina (10 e 20 mg/kg) restaurou os níveis reduzidos de glutatona, a atividade da catalase, atenuou a peroxidação lipídica e as concentrações de nitrito em ratos privados de sono (Kumar e Garg, 2009). Assim, os efeitos antidepressivos da imipramina podem ser resultantes do aumento nos níveis de serotina e noradrenalina, bem como pela sua capacidade de manter a homeostase pró- e antioxidante.

A deficiência de neurotransmissores pode ser a principal causa de distúrbios psiquiátricos ou causar mudanças compensatórias na expressão de receptores e na estrutura sináptica que afetam a função cerebral. Entretanto, o déficit de energia, a desregulação osmótica e a desmielinização também estão envolvidas na fisiopatologia da depressão (Jou et al., 2009; Gardner e Boles, 2011). Além disso, este transtorno é caracterizado por concentrações plasmáticas significativamente mais baixas de antioxidantes importantes, como a vitamina E, zinco e a coenzima Q10, resultando em uma diminuição na capacidade antioxidante (Maes et al., 2000; Khanzode et al., 2003; Maes et al., 2009a; Maes et al., 2009b). Similar aos mecanismos fisiopatológicos da depressão, estudos têm demonstrado que os metabólitos acumulados na DXB afetam o desenvolvimento da mielina (Taketomi et al., 1983; Tribble e Shapira 1983; Treacy et al., 1992), inibem o transporte de tirosina, triptofano e outros aminoácidos essenciais, limitando assim a disponibilidade de substrato para a síntese da catecolaminas e proteínas (Prensky e Moser, 1967; Dodd et al., 1992; Yudkoff et al., 1994; Wajner e Vargas, 1999; Hutson et al., 2000; Tavares et al., 2000; Wajner et al., 2000; Araújo et al., 2001) e causam estresse oxidativo (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005a; Bridi et al., 2005b; Mescka et al., 2011; Mescka et al., 2013). Assim, pode-se sugerir que os sintomas depressivos observados após a administração de AACR podem

ser resultantes de alterações nos níveis de neurotransmissores, bem como alterações no estado redox. Além disso, os resultados do presente estudo sugerem um efeito antidepressivo do NAC/DFX e da imipramina, podendo este estar associado a sua capacidade de manter a homeostase pró- e antioxidante e interagir com sistemas de receptores distintos, como os sistemas glutamatérgicos e monoaminérgicos, que poderiam produzir efeitos sinérgicos sobre os caminhos cerebrais envolvidos na modulação do comportamento antidepressivo.

Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que durante as crises de descompensação metabólica, como observado em pacientes com DXB, quando o cérebro é exposto às altas concentrações de AACR (concentrações milimolares) e metabólitos cognatos, vários mecanismos deletérios podem ser desencadeados, levando a alterações em diferentes vias modulatórias do SNC, como uma diminuição da neurotransmissão colinérgica e do equilíbrio nos níveis de neurotrofinas, culminando em alterações cognitivas importantes, bem como em sintomas do tipo depressivos. Além disso, a suplementação com antioxidantes (NAC e DFX) apresentou efeitos benéficos em todos os parâmetros analisados, sugerindo que o estresse oxidativo deve ser considerado um importante mecanismo fisiopatológico subjacente ao dano cerebral observado na DXB.

VI. CONCLUSÃO

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

- A administração de AACR aumenta a atividade da AChE em cérebro de ratos após a administração aguda e crônica.
- A administração de AACR diminui os níveis proteicos de NGF em hipocampo de ratos após a administração aguda e crônica.
- A administração aguda de AACR aumenta os níveis de pro-BDNF e diminui os níveis de tPA em ratos de 10 e 30 dias de idade.
- A exposição crônica aos AACR aumenta os níveis de BDNF total, sem alterar os níveis de pro-BDNF.
- A administração aguda e crônica de AACR causa déficit de memória e aprendizado.
- A exposição crônica aos AACR induzem sintomas do tipo depressivo.
- A suplementação com antioxidantes no tratamento crônico (NAC e DFX) foi capaz de prevenir todas as alterações causadas pelos AACR.
- O tratamento com imipramina foi capaz de prevenir os sintomas do tipo depressivo após a administração crônica de AACR.

VII. REFERÊNCIAS

- Abel T, Kandel E. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res Rev.* 1998; 26:360-378.
- Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterized by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci.* 1998; 111:645-656.
- Aldunate R, Casar JC, Brandan E. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. *Brain Res Rev.* 2004; 47:96-104.
- Amaral AU, Leipnitz G, Fernandes CG, Seminotti B, Schuck PF, Wajner M. Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Res.* 2010; 1324:75-84.
- Araújo P, Wassermann GF, Tallini K, Furlanetto V, Vargas CR, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M. Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem Int.* 2001; 38:529-537.
- Arent CO, Réus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Steckert AV, Mina F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Synergist effects of n-acetylcysteine and deferoxamine treatment on behavioral and oxidative parameters induced by chronic mild stress in rats. *Neurochem Int.* 2012; 61:1072-1080.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 1989; 6:593-597.
- Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7:355-359.

- Baker DA, Xi ZX, Shen H, Swanson CJ, Kalivas PW. The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *J Neurosci*. 2002; 22:9134–9141.
- Ballard CG, Greig NH, Guillozet-Bongaarts AL, Enz A, Darvesh S. Cholinesterases: Roles in the brain during health and disease. *Curr Alzheimer Res*. 2005; 2:307–318.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982; 1:549-553.
- Barichello T, Machado RA, Constantino L, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho F, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit Care Med*. 2007; 35:2186-2190.
- Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation perforation. *Crit Care Med*. 2005; 33:221–223.
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, de Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*. 2006; 21:279-286.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Katze C, Slipczuk L, Rossato JJ, Goldin A, Izquierdo I. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:2711–2716.
- Ben-Ari S, Toiber D, Sas AS, Soreq H, Ben-Shaul Y. Modulated splicing-associated gene expression in P19 cells expressing distinct acetylcholinesterase splice variants. *J Neurochem*. 2006; 97:24–34.
- Benedetti M, Levi A, Chao MV. Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:7859-7863.

- Benrahmoune M, Thérond P, Abedinzadeh Z. The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29:775-782.
- Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci.* 2003; 17:897-902.
- Bibel M, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J.* 1999; 18:616-622.
- Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 2000; 14:2919-2937.
- Bickel H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme.* 1987; 38:14-26.
- Bickford PC, Shukitt-Hale B, Joseph J. Effects of aging on cerebellar noradrenergic function and motor learning: nutritional interventions. *Mech Ageing Dev.* 1999; 111:141-154.
- Blokland A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res.* 1995; 21:285-300.
- Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:12079-12084.
- Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G. Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse.* 2008; 62:302-309.
- Boyd JG, Gordon T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci.* 2002; 15:613-626.

- Brandão R, Santos FW, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW. DMPS and N-acetilcisteína induced renal toxicity in mice exposed to mercury. *Biometals*. 2006; 19:389-398.
- Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Wajner M, Dutra-Filho CS. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Dev Neurosci*. 2003; 21:327-332.
- Bridi R, Braun CA, Zorzi GK, Wannmacher CM, Wajner M, Lissi EG, Dutra-Filho CS. Alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defences in cerebral cortex from young rats. *Metab Brain Dis*. 2005a; 20:155-167.
- Bridi R, Fontella FU, Pulrolnik V, Braun CA, Zorzi GK, Coelho D, Wajner M, Vargas CR, Dutra-Filho CS. A chemically-induced acute model of maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies. *J Neurosci Methods*. 2006; 155:224-230.
- Bridi R, Latini A, Braum CA, Zorzi GK, Moacir W, Lissi E, Dutra-Filho CS. Evaluation of the mechanism involved in leucine-induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic Res*. 2005b; 39:71-79.
- Brown RE, Corey SC, Moore AK. Differences in measures of exploration and fear in MHC-congenic C57BL/6J and B6-H-2K mice. *Behav Genet*. 1999; 26:263-271.
- Calvo M, Artuch R, Macia E, Luaces C, Vilaseca MA, Pou J, Pineda M. Diagnostic approach to inborn errors of metabolism in an emergency unit. *Pediatr Emerg Care*. 2000; 16:405-408.
- Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Landum RW, Cheng MS, Wu JF, Floyd RA. Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88:3633-3636.

- Carreno FR, Frazer A. Activation of signaling pathways downstream of the brain-derived neurotrophic factor receptor, TrkB, in the rat brain by vagal nerve stimulation and antidepressant drugs. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014; 17:247-258.
- Carrillo MC, Kanai S, Sato Y, Nokubo M, Ivy GO, Kitani K. The optimal dosage of (-) deprenyl for increasing superoxide dismutase activities in several brain regions decreases with age in male Fischer 344 rats. *Life Sci.* 1993; 52:1925-1934.
- Cassol OJ Jr, Rezin GT, Petronilho FC, Scaini G, Gonçalves CL, Ferreira GK, Roesler R, Schwartsmann G, Dal-Pizzol F, Streck EL. Effects of N-acetylcysteine/deferrioxamine, taurine and RC-3095 on respiratory chain complexes and creatine kinase activities in rat brain after sepsis. *Neurochem Res.* 2010; 35:515-521.
- Castellano S, Macchi F, Scali M, Huang JZ, Bozzi Y. Cytosolic branched chain aminotransferase (BCATc) mRNA is up-regulated in restricted brain areas of BDNF transgenic mice. *Brain Res.* 2006; 1108:12-18.
- Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Ciralik H, Kantarceken B, Buyukbese MA. Beneficial effects of n-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2005; 206:131-139.
- Chao VM. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4:299-309.
- Chuang DT, Chuang JL, Wynn RM. Branched-chain amino acids: metabolism, physiological function and application. *J Nutr.* 2006; 136:243S-249S.
- Chuang DT, Shih VE. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1971–2005.
- Chuang DT, Wynn M, Shih VE. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WL, Valle D,

- editores. *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2008. p. 1971–2005.
- Chuang JL, Wynn RM, Moss CC, Song JL, Li J, Awad N, Mandel H, Chuang DT. Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients: a proposed mechanism for the thiamin-responsive phenotype. *J Biol Chem*. 2004; 279:17792–17800.
- Coitinho AS, de Mello CF, Lima TT, de Bastiani J, Figuera MR, Wajner M. Pharmacological evidence that alpha-ketoisovaleric acid induces convulsions through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *Brain Res*. 2001; 894:68-73.
- Conner JM, Franks KM, Titterness AK, Russell K, Merrill DA, Christie BR, Sejnowski TJ, Tuszynski MH. NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. *J Neurosci*. 2009; 29:10883-10889.
- Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons MV, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Wiegand SJ, Rudge JS, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience*. 1999; 93:1491–1506.
- Cunha C, Angelucci A, D'Antoni A, Dobrossy MD, Dunnett SB, Berardi N, Brambilla R. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) overexpression in the forebrain results in learning and memory impairments. *Neurobiol Dis*. 2009; 33:358-368.
- da Penha Berzaghi M, Cooper J, Castren E, Zafra F, Sofroniew M, Thoenen H, Lindholm D. Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat hippocampus. *J Neurosci*. 1993; 13:3818–3826.
- 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. *Int J Dev Neurosci.* 2008; 26:339–343.
- da Silva AL, Piato AL, Bardini S, Netto CA, Nunes DS, Elisabetsky E. Memory retrieval improvement by *Ptychopetalum olacoides* in young and aging mice. *J Ethnopharmacol.* 2004; 95:199-203.
- Dancis J, Hutzler J, Levitz M. Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine disease. *Biochim Biophys Acta.* 1960; 23:342-343.
- Dancis J, Hutzler J, Snyderman SE, Cox RP. Enzyme activity in classical and variant forms of maple syrup urine disease. *J Pediatr.* 1972; 81:312-320.
- Danner DJ, Elsas LJ. Disorders of branched chain amino acids and keto acid metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editores. *The metabolic basis of inherited disease.* New York: McGraw-Hill, 1989. p. 671-692.
- Danner DJ, Lemmon SK, Besharse JC, Elsas LJ. Purification and characterization of branched chain α -ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1979; 254:5522-5526.
- Das A, Dikshit M, Nath C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci.* 2001; 68:1545-1555.
- Day T, Greenfield SA. A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurons in vitro: molecular mechanisms. *Neuroscience.* 2002; 111:649-656.
- de Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM. Mechanisms of n-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis.* 2001; 22:999-1013.
- de Rosa R, Garcia AA, Braschi C, Capsoni S, Maffei L, Berardi N, Cattaneo A. Intranasal administration of nerve growth factor (NGF)

- rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:3811-3816.
- de Vries N, De Flora S. N-Acetylcysteine. *J Cell Biochem*. 1993; 17F:270-277.
- Dias VV, Brissos S, Frey BN, Andrezza AC, Cardoso C, Kapczinski F. Cognitive function and serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2009; 11:663-671.
- Dimova EY, Samoylenko A, Kietzmann T. Oxidative stress and hypoxia: implications for plasminogen activator inhibitor-1 expression. *Antioxid Redox Signal*. 2004; 6:777-791.
- Di-Pietro PB, Dias ML, Scaini G, Burigo M, Constantino L, Machado RA, Dal-Pizzol F, Streck EL. Inhibition of brain creatine kinase activity after renal ischemia is attenuated by N-acetylcysteine and deferoxamine administration. *Neurosci Lett*. 2008; 434:139-143.
- Dodd PR, Williams SH, Gundlach AL, Harper PA, Healy PJ, Dennis JA, Johnston GA. Glutamate and γ -aminobutyric acid neurotransmitter systems in the acute phase of maple syrup urine disease and citrullinemia encephalopathies in newborn calves. *J Neurochem*. 1992; 59:582-590.
- Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther*. 2008; 8:1955-1962.
- Du J, Gould TD, Manji HK. Neurotrophic signaling in mood disorders. In: Gutkind JS, editor. *Signal transduction and human disease*. John Wiley & Sons. 2003. p. 411-446.
- Eisenstein RS, Hoganson G, Miller RH, Harper AE. Altered phosphorylation state of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase in a branched-chain acyltransferase deficient human fibroblast cell line. *J Inherit Metab Dis*. 1991; 14:37-44.

- Ellman GI, Courtney KD, Andres Jr V, Feather-Stone RM. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; 7:88-95.
- Elmariah SB, Hughes EG, Oh EJ, Balice-Gordon RJ. Neurotrophin signaling among neurons and glia during formation of tripartite synapses. *Neuron Glia Biol.* 2005; 1:1-11.
- Ferreira FR, Biojone C, Joca SRL, Guimarães FS. Antidepressant-like effects of N-acetyl-L-cysteine in rats. *Behav Pharmacol.* 2008; 19:747-750.
- Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature.* 1996; 381:706-709.
- Fisher CR, Fisher CW, Chuang DT, Cox RP. Occurrence of a Tyr393Asn (Y393N) mutation in the E1 alpha gene of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex in maple syrup urine disease patients from a Mennonite population. *Am J Hum Genet.* 1991; 49:429-434.
- Fodale V, Quattrone D, Trecroci C, Caminiti V, Santamaria LB. Alzheimer's disease and anaesthesia: implications for the central cholinergic system. *Br J Anaesth.* 2006; 97:445-452.
- Fontella FU, Gassen E, Pulrolnik V, Wannmacher CM, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis.* 2002; 17:47-54.
- Frey BN, Andreazza AC, Ceresér KM, Martins MR, Valvassori SS, Réus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci.* 2006; 79:281-286.
- Funchal C, Dall Bello Pessutto F, de Almeida LM, de Lima Pelaez P, Loureiro SO, Vivian L, Wajner M, Pessoa-Pureur R. Alpha-keto-beta-methylvaleric acid increases the in vitro phosphorylation of

- intermediate filaments in cerebral cortex of young rats through the gabaergic system. *J Neurol Sci.* 2004a; 217:17-24.
- Funchal C, de Lima Pelaez P, Loureiro SO, Vivian L, Dall Bello Pessutto F, de Almeida LM, Tchernin Wofchuk S, Wajner M, Pessoa Pureur R. Alpha-Ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediate filaments in postnatal rat cortical slices through ionotropic glutamatergic receptors. *Brain Res Dev Brain Res.* 2002; 139:267-276.
- Funchal C, Rosa AM, Wajner M, Wofchuk S, Pureur RP. Reduction of glutamate uptake into cerebral cortex of developing rats by the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res.* 2004b; 29:747-753.
- Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R, Dalmaz C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int.* 2003; 42:107-114.
- Gardner A, Boles RG. Beyond the serotonin hypothesis: mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. *Prog. Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011; 35:730-743.
- Garrod AG. *Inborn Errors of Metabolism.* Oxford, Oxford University Press. 1909.
- Gere-Paszti E, Jakus J. The effect of N-acetylcysteine on amphetamine-mediated dopamine release in rat brain striatal slices by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr.* 2009; 23:658-664.
- Gibson GE, Blass JP. Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohydrate utilization by maple syrup urine disease metabolites. *J Neurochem.* 1976; 26:1073-1078.
- Gilbert KR, Aizenman E, Reynolds IJ. Oxidized glutathione modulates N-methyl-D-aspartate- and depolarization-induced increases in intracellular Ca²⁺ in cultured rat forebrain neurons. *Neurosci Lett.* 1991; 133:11-14.

- Gjedde A, Crone C. Biochemical modulation of blood-brain barrier permeability. *Acta Neuropathol Suppl (Berl)*. 1983; 8:59–74.
- Glaser V, Carlini VP, Gabach L, Ghersi M, de Barioglio SR, Ramirez OA, Perez MF, Latini A. The intra-hippocampal leucine administration impairs memory consolidation and LTP generation in rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; 30:1067-1075.
- Greenfield S. Acetylcholinesterase may have novel functions in the brain. *Trends Neurosci*. 1984; 7:364–368.
- 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. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997; 51:179-187.
- Gwag BJ, Koh JY, Chen MM, Dugan LL, Behrens MM, Lobner D, Choi DW. BDNF or IGF-I potentiates free radical-mediated injury in cortical cell cultures. *Neuroreport*. 2005; 7:93–96.
- Haddad JJ, Land SC. Redox/ROS regulation of lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation and MAPK-mediated TNF-alpha biosynthesis. *Br J Pharmacol*. 2002; 135:520-536.
- Haddad JJ. Glutathione depletion is associated with augmenting a proinflammatory signal: evidence for an antioxidant/pro-oxidant mechanism regulating cytokines in the alveolar epithelium. *Cytokines Cell Mol Ther*. 2000; 6:177-187.
- Haddad JJ, Harb HL. L-gamma-glutamyl-l-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro-and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Mol Immunol*. 2005; 42:987–1014.
- Halegoua S, Armstrong RC, Kremer NE. Dissecting the mode of action of neuronal growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1991; 165:119-170.

- Hamburger V, Levi-Montalcini R. Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool.* 1949; 111:457–501.
- Hartikka J, Hefti F. Development of septal cholinergic neurons in culture: plating density and glial cells modulate effect of NGF on survival, fiber growth, and expression of transmitter-specific enzymes. *J Neurosci.* 1988; 8:2967–2985.
- Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004; 45:104-114.
- Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* 1999; 31:273-300.
- Herrero MB, Chatterjee S, Lefièvre L, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29:522-536.
- Howell RK, Lee M. Influence of a-keto acids on the respiration of brain in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1963; 113:660–663.
- Huang Y, Zielke HR, Tildon JT, Zielke CL, Baab PJ. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: leucine infusion. *Dev Neurosci.* 1996; 18:415-419.
- Hutson SM, Lieth E, LaNoue KF. Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system. *J Nutr.* 2001; 131:846S–850S.
- Inestrosa NC, Alvarez A, Pérez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, Casanueva OI, Soto C, Garrido J. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-b-peptides into Alzheimer's fibrils: possible

- role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*. 1996; 16:881–891.
- Ishikawa Y, Ikeuchi T, Hatanaka H. Brain-derived neurotrophic factor accelerates nitric oxide donor-induced apoptosis of cultured cortical neurons. *J Neurochem*. 2000; 75:494-502.
- Izquierdo I, Barros DM, Mello E, Souza T, de Souza MM, Izquierdo IA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 1998; 393:635-636.
- Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zanatta MS, Quevedo J, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci*. 1997; 9:786–793.
- Jan W, Zimmerman RA, Wang ZJ, Berry GT, Kaplan PB, Kaye EM. MR diffusion imaging and MR spectroscopy of maple syrup urine disease during acute metabolic decompensation. *Neuroradiology*. 2003; 45:393-399.
- Janáky R, Dohovics R, Saransaari P, Oja SS. Modulation of [3H]dopamine release by glutathione in mouse striatal slices. *Neurochem Res*. 2007; 32:1357–1364.
- Jiang H, Zhang J, Zhu H, Li H, Zhang X. Nerve growth factor prevents the apoptosis-associated increase in acetylcholinesterase activity after hydrogen peroxide treatment by activating Akt. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2007; 39:46-56.
- Jiang H, Zhang XJ. Acetylcholinesterase and apoptosis. A novel perspective for an old enzyme. *FEBS J*. 2008; 275:612-617.
- Jimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D. The effect of Mendelian disease on human health. In: Scriver CR, Beaudet AR, Sly W, Valle D, editors. *New York: McGraw-Hill*; 2001. p. 167-174.
- Johnson G, Moore SW. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at peripheral anionic site. *Biochem Biophys Res Comm*. 1999; 258:758-762.

- Jou SH, Chiu NY, Liu CS. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Chang Gung Med J*. 2009; 32:370–379.
- Jouvet P, Rustin P, Taylor DL, Pocock JM, Felderhoff-Mueser U, Mazarakis ND, Sarraf C, Joashi U, Kozma M, Greenwood K, Edwards AD, Mehmet H. Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome *c* release: Implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. *Mol Biol Cell*. 2000a; 11:1919–1932.
- Jouvet P, Kozma M, Mehmet H. Primary human fibroblasts from a maple syrup urine disease patient undergo apoptosis following exposure to physiological concentrations of branched chain amino acids. *Ann N Y Acad Sci*. 2000b; 926:116-121.
- Kafitz KW, Rose CR, Thoenen H, Konnerth A. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature*. 1999; 401:918-921.
- Kamei A, Takashima S, Chan F, Becker LE. Abnormal dendritic development in maple syrup urine disease. *Pediatr Neurol*. 1992; 8:145-147.
- 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. *J Neurochem*. 1996; 66:114–123.
- Kassam G, Le BH, Choi KS, Kang HM, Fitzpatrick SL, Louie P, Waisman DM. The p11 subunit of the annexin II tetramer plays a key role in the stimulation of t-PA-dependent plasminogen activation. *Biochemistry*. 1998; 37:16958–16966.
- Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Animal models and human depressive disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 1981; 5:231–246.
- Kawashima K, Fujii T. Extraneural cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Therapeutics*. 2000; 86:29-48.

- Kelly A, Lynch A, Vereker E, Nolan Y, Queenan P, Whittaker E, O'Neill LA, Lynch MA. The anti-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-10, blocks the inhibitory effect of IL-1 beta on long term potentiation. A role for JNK. *J Biol Chem*. 2001; 276:45564–45572.
- Kelly A, Vereker E, Nolan Y, Brady M, Barry C, Loscher CE, Mills KH, Lynch MA. Activation of p38 plays a pivotal role in the inhibitory effect of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta on long term potentiation in rat dentate gyrus. *J Biol Chem*. 2003; 278:19453–19462.
- Keseler IM, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Ingraham J, Paley S, Paulsen IT, Peralta-Gil M, Karp PD. EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 2005; 1:334–337.
- Khanzode SD, Dakhale GN, Khanzode SS, Saoji A, Palasodkar R. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. *Redox Rep*. 2003; 8:365–370.
- Kiil R, Rokkones T. Late manifesting variant of branched-chain ketoaciduria (Maple Syrup Urine Disease). *Acta Paediatr*. 1964; 53:356-364.
- Killian DM, Chikhale PJ. Predominant functional activity of the large, neutral amino acid transporter (LAT1) isoform at the cerebrovasculature. *Neurosci Lett*. 2001; 306:1–4.
- Klee D, Thimm E, Wittsack HJ, Schubert D, Primke R, Pentang G, Schaper J, Mödder U, Antoch A, Wendel U, Cohnen M. Structural white matter changes in adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis*. 2013; 36:945-953.
- Knipper M, Leung LS, Zhao D, Rylett RJ. Short-term modulation of glutamatergic synapses in adult rat hippocampus by NGF. *NeuroReport*. 1994; 5:2433–2436.

- Knoll J, Yen TT, Miklya I. Sexually low performing male rats die earlier than their high performing peers and (-)deprenyl treatment eliminates this difference. *Life Sci.* 1994; 54:1047-1057.
- Koh JY, Gwag BJ, Lobner D, Choi DW. Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science.* 1995; 268:573-575.
- Kontush A. Amyloid-beta, an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31:1120-1131.
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:8856-8860.
- Krishna S, Andersson AM, Semsey S, Sneppen K. Structure and function of negative feedback loops at the interface of genetic and metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34:2455-2462.
- Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature.* 2008; 455:894-902.
- Kumar A, Garg R. Possible role of trazodone and imipramine in sleep deprivation-induced anxiety-like behavior and oxidative damage in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2009; 31:383-387.
- Lackner P, Beer R, Heussler V, Goebel G, Rudzki D, Helbok R, Tannich E, Schmutzhard E. Behavioral and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006; 32:177-188.
- Lambiase A, Aloe L, Centofanti M, Parisi V, Mantelli F, Colafrancesco V, Manni GL, Bucci MG, Bonini S, Levi-Montalcini R. Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: Implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:13469-13474.
- Land JM, Mowbray J, Clark JB. Control of pyruvate and L-hydroxybutyrate utilization in rat brain mitochondria and its

- relevance to phenylketonuria and maple syrup urine disease. *J Neurochem.* 1976; 26:823–830.
- Layer P, Willbold E. Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. *Prog Hisotchem Cytochem.* 1995; 29:1–92.
- le Roux C, Murphy E, Lilburn M, Lee PJ. The longest-surviving patient with classical maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis.* 2006; 29:190–194.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Regulation of protein tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen species derivatives. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22:643-656.
- Lee FS, Kim AH, Khursigara G, Chao MV. The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol.* 2001; 11:281-286.
- Lepage N, McDonald N, Dallaire L, Lambert M. Age-specific distribution of plasma aminoacid concentration in healthy pediatric population. *Clin Chem.* 1997; 43:2397-2402.
- Leslie SW, Brown LM, Trent RD, Lee YH, Morris JL, Jones TW, Randall PK, Lau SS, Monks TJ. Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium entry into dissociated neurons by reduced and oxidized glutathione. *Mol Pharmacol.* 1992; 41:308–314.
- Levi-Montalcini R, Angeletti P. Nerve growth factor. *Physiol Rev.* 1968; 48:534-569.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool.* 1951; 116:321–361.
- Lim KC, Lim ST, Federoff HJ. Neurotrophin secretory pathways and synaptic plasticity. *Neurobiol Aging.* 2003; 24:1135-1145.
- Linck VM, Costa-Campos L, Pilz LK, Garcia CRL, Elisabetsky E. AMPA glutamate receptors mediate the antidepressantlike effects

- of N-acetylcysteine in the mouse tail suspension test. *Behav Pharmacol.* 2012; 23:171–177.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.
- Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6:603–614.
- Lu Y, Christian K, Lu B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and longterm memory? *Neurobiol Learn Mem.* 2008; 89:312-323.
- Lynch MA. Age-related impairment in long-term potentiation in hippocampus: a role for the cytokine, interleukin-1 beta? *Prog Neurobiol.* 1998; 56:571–589.
- Maes M, De Vos N, Pioli R, Demedts P, Wauters A, Neels H, Christophe A. Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defences in that illness. *J Affect Disord.* 2000; 58:241–246.
- Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Increased 8-hydroxy-deoxyguanosine, a marker of oxidative damage to DNA, in major depression and myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009a; 30:715–722.
- Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Lower plasma Coenzyme Q10 in depression: a marker for treatment resistance and chronic fatigue in depression and a risk factor to cardiovascular disorder in that illness. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009b; 30:462–469.
- Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23:134-147.
- Martin DS, Lonergan PE, Boland B, Fogarty MP, Brady M, Horrobin DF, Campbell VA, Lynch MA. Apoptotic changes in the aged brain are triggered by interleukin-1beta-induced activation of p38 and

- reversed by treatment with eicosapentaenoic acid. *J Biol Chem.* 2002; 277:34239–34246.
- Mazariegos GV, Morton DH, Sindhi R, Soltys K, Nayyar N, Bond G, Shellmer D, Shneider B, Vockley J, Strauss KA. Liver transplantation for classical maple syrup urine disease: long-term follow-up in 37 patients and comparative United Network for Organ Sharing experience. *Pediatr.* 2012; 160:116-121.
- McAllister AK. Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb Cortex.* 2000; 10:963-973.
- McGahon B, Maguire C, Kelly A, Lynch MA. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by arachidonic acid and trans-1-amino-cyclopentyl-1,3-dicarboxylate impacts on long-term potentiation in the dentate gyrus in the rat: analysis of age-related changes. *Neuroscience.* 1999; 90:1167–1175.
- Meister A. *Biochemistry of the Amino Acids*, 2d ed. New York, Academic Press, 1965. p 729.
- Mello CF, Feksa L, Brusque AM, Wannmacher CM, Wajner M. Chronic early leucine administration induces behavioral deficits in rats. *Life Sci.* 1999; 65:747-755.
- Melo JB, Agostinho P, Oliveira CR. Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neurosci Res.* 2003; 45:117-127.
- Mendell LM. Neurotrophins and synaptic plasticity in the mammalian spinal cord. *J Physiol.* 2001; 533:91-97.
- Menkes JH, Hurst PL, Craig JM. A new syndrome: Progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics.* 1954; 14:462.
- Menkes JH. Maple syrup urine disease. Isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics.* 1959; 23:348-353.

- Mescka C, Moraes T, Rosa A, Mazzola P, Piccoli B, Jacques C, Dalazen G, Coelho J, Cortes M, Terra M, Regla Vargas C, Dutra-Filho CS. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis.* 2011; 26:21-28.
- Mescka CP, Wayhs CA, Vanzin CS, Biancini GB, Guerreiro G, Manfredini V, Souza C, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas CR. Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: l-carnitine effect. *Int J Dev Neurosci.* 2013; 31:21-24.
- Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience.* 2002; 110:627-639.
- Metz CN, Tracey KJ. It takes nerve to dampen inflammation. *Nat Immunol.* 2005; 6:756-757.
- Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10:850-860.
- Mokoena ML, Harvey BH, Oliver DW, Brink CB. Ozone modulates the effects of imipramine on immobility in the forced swim test, and nonspecific parameters of hippocampal oxidative stress in the rat. *Metab Brain Dis.* 2010; 25:125-133.
- Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, Puffenberger EG, Kelley RI. Diagnosis and treatment of maple syrup urine disease: a study of 36 patients. *Pediatrics.* 2002; 109:999-1008.
- Muelly ER, Moore GJ, Bunce SC, Mack J, Bigler DC, Morton DH, Strauss KA. Biochemical correlates of neuropsychiatric illness in maple syrup urine disease. *J Clin Invest.* 2013; 123:1809-1820.
- Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001; 63:71-124.
- Nellis MM, Danner DJ. Gene preference in maple syrup urine disease. *Am J Hum Genet.* 2001; 68:232-237.

- Nestler EJ, Gould E, Manji H, Buncan M, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky L, Zalcman S. Preclinical model: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry*. 2002; 52:503–528.
- Nitta A, Nishioka H, Fukumitsu H, Furukawa Y, Sugiura H, Shen L, Furukawa S. Hydrophobic dipeptide Leu¹ protects against neuronal death by inducing brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis. *J Neurosci Res*. 2004; 78:250-258.
- Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Ohta K, Akaboshi I, Indo Y, Endo F, Matsuda I. Molecular diagnosis of maple syrup urine disease: screening and identification of gene mutations in the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase multienzyme complex. *J Inherit Metab Dis*. 1992; 15:827-833.
- O'Donnell E, Vereker E, Lynch MA. Age-related impairment in LTP is accompanied by enhanced activity of stress-activated protein kinases: analysis of underlying mechanisms. *Eur J Neurosci*. 2000; 12:345–352.
- Ohira K, Hayashi MA. New aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity. *Curr Neuropharmacol*. 2009; 7:276-285.
- O'Loughlen A, Pérez-Morgado MI, Salinas M, Martín ME. N-acetylcysteine abolishes hydrogen peroxide-induced modification of eukaryotic initiation factor 4F activity via distinct signalling pathways. *Cell Signal*. 2006; 18:21-31.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E. Cleavage of pro-BDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*. 2004; 306:487-491.
- Panten U, Kriegstein E, Poser W, Schönborn J, Hasselblatt A. Effects of L-leucine and alpha-ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS Lett*. 1972; 20:225-228.

- Park SE, Kim ND, Yoo YH. Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Res.* 2004; 64:2652–2655.
- Parrella T, Surrey S, Iolascon A, Sartore M, Heidenreich R, Diamond G, Ponzzone A, Guardamagna O, Burlina AB, Cerone R, Parini R, Dionisi-Vici C, Rappaport E, Fortina P. Maple syrup urine disease (MSUD): screening for known mutations in Italian patients. *J Inherit Metab Dis.* 1994; 17:652-660.
- Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* 2001; 11:272-280.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron.* 1996; 16:1137–1145.
- Peinemann F, Danner DJ. Maple syrup urine disease 1954-1993. *J Inherit Metab Dis.* 1994; 17:3-15.
- Pepeu G. Cholinergic neurotransmission in the central nervous system. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1972; 196:229.
- Pessoa-Pureur R, Funchal C, de Lima Pelaez P, Vivian L, Oliveira Loureiro S, de Freitas Miranda R, Wajner M. Effect of the branched-chain alpha-ketoacids accumulating in maple syrup urine disease on the high molecular weight neurofilament subunit (NF-H) in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis.* 2002; 17:65-75.
- Pilla C, Cardozo RF, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem Res.* 2003; 28:675-679.
- Pirondi S, D'Intino G, Gusciglio M, Massella A, Giardino L, Kuteeva E, Ogren SO, Hokfelt T, Calza L. Changes in brain cholinergic markers and spatial learning in old galanin-overexpressing mice. *Brain Res.* 2007; 1138:10-20.

- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977; 21:266-730.
- Pothos EM. Restricted eating with weight loss selectively decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens and alters dopamine responses to amphetamine, morphine, and food intake. *J Neurosci*. 1995; 15:6640-6650.
- Prensky AL, Moser HW. Brain lipids, proteolipids, and free amino acids in maple syrup urine disease. *J Neurochem*. 1966; 13:863-874.
- Prensky AL, Moser HW. Changes in the amino acid composition of proteolipids of white matter during maturation of the human nervous system. *J Neurochem*. 1967; 14:117-121.
- Prescott LF, Illingworth RN, Critchley JA, Proudfoot AT. Intravenous n-acetylcysteine: the treatment of choice for paracetamol poisoning. *Br Med J*. 1979; 2:1097-1100.
- Quental S, Macedo-Ribeiro S, Matos R, Vilarinho L, Martins E, Teles EL, Rodrigues E, Diogo L, Garcia P, Eusébio F, Gaspar A, Sequeira S, Furtado F, Lança I, Amorim A, Prata MJ. Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. *Molec Genet Metab*. 2008; 94:148-156.
- Quevedo J, Moretto A, Colvero M, Roesler R, Ferreira MB. The N-methyl-D-aspartate receptor blocker MK-801 prevents the facilitatory effects of naloxone and epinephrine on retention of inhibitory avoidance task in rats. *Behav Pharmacol*. 1997; 8:471-474.
- Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, de-Paris F, Izquierdo I, Rose SP. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem*. 1999; 6:600-607.

- Rakonczay Z, Horváth Z, Juhász A, Kálmán J. Peripheral Cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. *Chem Biol Interact.* 2005; 158:233-238.
- Reed LJ, Hackert ML. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *J Biol Chem.* 1990; 265:8971-8974.
- Reis M, Farage M, Wolosker H. Chloride-dependent inhibition of vesicular glutamate uptake by alpha-keto acids accumulated in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1475:114-118.
- Réus GZ, Stringari RB, de Souza B, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Quevedo J. Harmine and Imipramine Promote Antioxidant Activities in Prefrontal Cortex and Hippocampus. *Oxid Med Cell Longev.* 2010; 3:325–331.
- Réus GZ, Vieira FG, Abelaira HM, Michels M, Tomaz DB, Dos Santos MA, Carlessi AS, Neotti MV, Matias BI, Luz JR, Dal-Pizzol F, Quevedo J. MAPK signaling correlates with the antidepressant effects of ketamine. *J Psychiatr Res.* 2014; 55:15-21.
- Ribeiro CA, Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Grando V, Schmidt AL, Ferreira GC, Perry ML, Dutra-Filho CS, Wajner M. Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res.* 2008; 33:114–124.
- Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Treatment with n-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med.* 2004; 32:342-349.
- Riviello JJ Jr, Rezvani I, DiGeorge AM, Foley CM. Cerebral edema causing death in children with maple syrup urine disease. *J Pediatr.* 1991; 119:42-45.

- Rodríguez-Pombo P, Navarrete R, Merinero B, Gómez-Puertas P, Ugarte M. Mutational spectrum of maple syrup urine disease in Spain. *Hum Mutat.* 2006; 27:715.
- Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome.* 1997; 8:711–713.
- Rosa RM, Flores DG, Appelt HR, Braga AL, Henriques JA, Roesler R. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci Lett.* 2003; 341:217–220.
- Rüdiger HW, Langenbeck U, Goedde HW. A simplified method for the preparation of ¹⁴C-labelled branched-chain α-oxo acids. *Biochem J.* 1972; 126:445–446.
- Rush RA, Chie E, Liu D, Tafreshi A, Zettler C, Zhou XF. Neurotrophic factors are required by mature sympathetic neurons for survival, transmission and connectivity. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997; 24:549–555.
- Rybakowski JK, Borkowska A, Skibinska M, Hauser J. Illness-specific association of val66met BDNF polymorphism with performance on Wisconsin Card Sorting Test in bipolar mood disorder. *Mol Psychiatry.* 2006; 11:122–124.
- Sadowska AM, Manuel-Y-Keenoy B, De Backer WA. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007; 20:9–22.
- Salgado H, Santos-Zavaleta A, Gama-Castro S, Millán-Zárate D, Díaz-Peredo E, Sánchez-Solano F, Pérez-Rueda E, Bonavides-Martínez C, Collado-Vides J. RegulonDB (version 3.2): transcriptional regulation and operon organization in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:72–74.

- Sarter M, Parikh V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6:48-56.
- Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U. Whole-body L-leucine oxidation in patients with variant form of maple syrup urine disease. *Pediatr Res.* 2001; 49:627-635.
- Schadewaldt P, Wendel U. Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr.* 1997; 156:S62-S66.
- Schechter LE, Ring RH, Beyer CE, Hughes ZA, Khawaja X, Malberg JE, Rosenzweig-Lipson S. Innovative approaches for the development of antidepressant drugs: current and future strategies. *NeuroRx.* 2005; 2:590-611.
- Schönberger S, Schweiger B, Schwahn B, Schwarz M, Wendel U. Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab.* 2004; 82:69-75.
- Schröder N, O'Dell SJ, Marshall JF. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse.* 2003; 49:89-96.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8 ed. New York: MCGraw-Hill Inc, 2001. p. 3-45.
- Scully JL, Otten U. NGF: Not just for neurons. *Cell Biol Int.* 1995; 19:459-469.
- Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chretien M, Murphy RA. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J.* 1996; 314:951-960.
- Serrano F, Klann E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev.* 2004; 3:431-443.
- Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Ribeiro CA, Wannmacher CM, Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wajner M. Inhibition of brain energy

- metabolism by the alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1639:232-238.
- Shafferman A, Kronman C, Flashner Y, Leitner M, Grosfeld H, Ordentlich A, Gozes Y, Cohen S, Ariel N, Barak D, Harelii M, Silman I, Sussman JL, Velan B. Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *J Biol Chem*. 1992; 267:17640-17648.
- Shaltiel G, Chen G, Manji HK. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Curr Opin Pharmacol*. 2007; 7:22-26.
- Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. CREB: a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*. 1991; 252:1427-1430.
- Shimizu E, Hashimoto K, Watanabe H, Komatsu N, Okamura N, Koike K, Shinoda N, Nakazato M, Kumakiri C, Okada S, Iyo M. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in schizophrenia are indistinguishable from controls. *Neurosci Lett*. 2003; 351:111-114.
- Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*. 2005; 5:293-302.
- Smaga I, Pomierny B, Krzyżanowska W, Pomierny-Chamióło L, Miszkiewicz J, Niedzielska E, Ogórka A, Filip M. N-acetylcysteine possesses antidepressant-like activity through reduction of oxidative stress: behavioral and biochemical analyses in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012; 39:280-287.
- Small GW. Treatment of Alzheimer's disease, current approaches and promising developments. *Am J Med*. 1998; 104:32S-38S.
- Smith QR, Takasato Y. Kinetics of amino acid transport at the blood-brain barrier studied using an in situ brain perfusion technique. *Ann N Y Acad Sci*. 1986; 481:186-201.

- Snyderman SE, Norton PM, Roitman E. Maple Syrup Urine Disease with particular reference to diet therapy. *Pediatrics*. 1964; 34:452-472.
- Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2:294-302.
- Souza CFM, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2002; 7:129-137.
- Strauss KA, Mazariegos GV, Sindhi R, Squires R, Finegold DN, Vockley G, Robinson DL, Hendrickson C, Virji M, Cropcho L, Puffenberger EG, McGhee W, Seward LM, Morton DH. Elective liver transplantation for the treatment of classical maple syrup urine disease. *Am J Transplant*. 2006b; 6:557-564.
- Strauss KA, Puffenberger EG, Morton DH. Maple syrup urine disease. In: Pagon R, Bird T, Dolan C, Stephens K, Adam M, editores. *GeneReviews*. Seattle, Washington, USA: University of Washington, 2006a.
- Strauss KA, Wardley B, Robinson D, Hendrickson C, Rider NL, Puffenberger EG, Shellmer D, Moser AB, Morton DH. Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design. *Mol Genet Metab*. 2010; 99:333-345.
- Takei N, Tsukui H, Hatanaka H. Intracellular storage and evoked release of acetylcholine from postnatal rat basal forebrain cholinergic neurons in culture with nerve growth factor. *J Neurochem*. 1989; 53:1405-1410.
- Takei N, Tsukui H, Hatanaka H. Nerve growth factor increases the intracellular content of acetylcholine in cultured septal neurons from developing rats. *J Neurochem*. 1988; 51:1118-1125.
- Taketomi T, Kunishita T, Hara A, Mizushima S. Abnormal protein and lipid compositions of the cerebral myelin of a patient with maple syrup urine disease. *Jpn J Exp Med*. 1983; 53:109-116.

- Tashian RE. Inhibition of brain glutamic acid decarboxylase by phenylalanine, valine, and leucine derivatives: a suggestion concerning the etiology of the neurological defect in phenylketonuria and branched-chain ketonuria. *Metabolism*. 1961; 10:393-402.
- Tavares RG, Santos CE, Tasca CI, Wajner M, Souza DO, Dutra-Filho CS. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *J Neurol Sci*. 2000; 181:44-49.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*. 2005; 25:5455–5463.
- Terry Jr AV, Kutiyawalla A, Pillai A. Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats. *Physiol Behav*. 2011; 102:149-157.
- Thoenen H, Barde YA. Physiology of nerve growth factor. *Physiol Rev*. 1980; 60:1284-1335.
- Tõugu V, Kesvatera T. Role of ionic interactions in cholinesterase catalysis. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1298:12–30.
- Treacy E, Clow CL, Reade TR, Chitayat D, Mamer OA, Scriver CR. Maple syrup urine disease: interrelationship between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *J Inherit Metab Dis*. 1992; 15:121–135.
- Tribble D, Shapira R. Myelin proteins: degradation in rat brain initiated by metabolites causative of maple syrup urine disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983; 114:440–446.
- Tuon L, Comim CM, Antunes MM, Constantino LS, Machado RA, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Imipramine reverses the

- depressive symptoms in sepsis survivor rats. *Intensive Care Med.* 2007; 33:2165-2167.
- Tyler WJ, Perrett SP, Pozzo-Miller LD. The role of neurotrophins in neurotransmitter release. *Neuroscientist.* 2002; 8:524-531.
- van der Zee EA, Luiten PG. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol.* 1999; 58:409-472.
- Varga V, Jenei Z, Janáky R, Saransaari P, Oja SS. Glutathione is an endogenous ligand of rat brain N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors. *Neurochem Res.* 1997; 22:1165–1171.
- Vasques Vde C, Brinco F, Wajner M. Intrahippocampal administration of the branched-chain alpha-hydroxy acids accumulating in maple syrup urine disease compromises rat performance in aversive and non-aversive behavioral tasks. *J Neurol Sci.* 2005; 232:11-21.
- Vereker E, O'Donnell E, Lynch A, Kelly A, Nolan Y, Lynch MA. Evidence that interleukin-1beta and reactive oxygen species production play a pivotal role in stress-induced impairment of LTP in the rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 2001; 14:1809–1819.
- Vereker E, O'Donnell E, Lynch MA. The inhibitory effect of interleukin-1beta on long-term potentiation is coupled with increased activity of stress-activated protein kinases. *J Neurosci.* 2000; 20:6811–6819.
- Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 2000; 7:333-340.
- Vulcano M, Meiss RP, Isturiz MA. Deferoxamine reduces tissue injury and lethality in LPS-treated mice. *Int J Immunopharmacol.* 2000; 22:635-644.

- Wajner M, Coelho DM, Barschak AG, Araújo PR, Pires RF, Lulhier FL, Vargas CR. Reduction of large neutral amino acid concentration in plasma and CSF of patients with maple syrup urine disease during crises. *J Inherit Metab Dis.* 2000; 23:505–512.
- Wajner M, Vargas CR. Reduction of plasma concentrations of large neutral amino acids in patients with maple urine disease during crises. *Arch Dis Child.* 1999; 80:579.
- Walsh KS, Scott MN. Neurocognitive profile in a case of maple syrup urine disease. *Clin Neuropsychol.* 2010; 24:689-700.
- Walterfang M, Bonnot O, Mocellin R, Velakoulis D. The neuropsychiatry of inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2013; 36:687-702.
- Walz R, Lenz G, Roesler R, Vianna MM, Martins V, Brentani R, Rodnight R, Izquierdo I. Time-dependent enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post-training infusion of nerve growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats. *Eur J Neurosci.* 2000; 12:2185-2189.
- Wendel U, Baulny HO. Branched-Chain Organic Acidurias/Acidemias. In: Fernandes J, Saudubray JM, Berghe GV, editores. *Inborn Metabolic diseases.* 3th Ed. 2006. p. 247-251.
- Westall RG, Dancis J, Miller S. Maple syrup urine disease. *Am J Dis Child.* 1957; 94:571-572.
- Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B. Activation of p75^{NTR} by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci.* 2005; 8:1069–1077.
- Yagasaki Y, Numakawa T, Kumamaru E, Hayashi T, Su TP, Kunugi H. Chronic antidepressants potentiate via sigma-1 receptors the brain-derived neurotrophic factor-induced signaling for glutamate release. *J Biol Chem.* 2006; 281:12941-12949.

- Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci.* 2000; 70:735–744.
- Yamada K, Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci.* 2003; 91:267-270.
- Yan J, Welsh AM, Bora SH, Snyder EY, Koliatsos VE. Differentiation and tropic/trophic effects of exogenous neural precursors in the adult spinal cord. *J Comp Neurol.* 2004; 480:101-114.
- Yeaman SJ. The mammalian 2-oxo acid dehydrogenases: a complex family. *Trends Biochem Sci.* 1986; 11:293-296.
- Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol.* 2010; 70:304-322.
- Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Pleasure D, Stern J, Nissim I. Inhibition of astrocyte glutamine production by alpha-ketoisocaproic acid. *J Neurochem.* 1994; 63:1508-1515.
- Yudkoff M, Nissim I, Daikhin Y, Lin ZP, Nelson D, Pleasure D, Erecinska M. Brain glutamate metabolism: neuronal-astroglial relationships. *Dev Neurosci.* 1993; 15:343-350.
- Yuwiler A, Geller E. Serotonin depletion by dietary leucine. *Nature.* 1965; 208:83-84.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60:6-20.
- Zagotta I, Dimova EY, Funcke JB, Wabitsch M, Kietzmann T, Fischer-Posovszky P. Resveratrol suppresses PAI-1 gene expression in a human in vitro model of inflamed adipose tissue. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013:793525.
- Zervos IA, Nikolaidis E, Lavrentiadou SN, Tsantarliotou MP, Eleftheriadou EK, Papapanagiotou EP, Fletouris DJ, Georgiadis M, Taitzoglou IA. Endosulfan-induced lipid peroxidation in rat brain

- and its effect on t-PA and PAI-1: Ameliorating effect of vitamins C and E. *J Toxicol Sci.* 2011; 36:423–433.
- Zhang L, Jope RS. Oxidative stress differentially modulates phosphorylation of ERK, p38 and CREB induced by NGF or EGF in PC12 cells. *Neurobiol Aging.* 1999; 20: 271-278.?
- Zielke HR, Huang Y, Baab PJ, Collins RM Jr, Zielke CL, Tildon JT. Effect of alpha-ketoisocaproate and leucine on the in vivo oxidation of glutamate and glutamine in the rat brain. *Neurochem Res.* 1997; 22:1159-1164.
- Zielke HR, Huang Y, Tildon JT, Zielke CL, Baab PJ. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: alpha-ketoisocaproate infusion. *Dev Neurosci.* 1996; 18:420-425.
- Zimmermann H. Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp.* 2006; 276:113-128.
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Griffin K, Skvorak KJ, Paul HS, Homanics GE, Bewley MC, Cheng KC, Lanoue KF, Flanagan JM. Dual mechanism of brain injury and novel treatment strategy in maple syrup urine disease. *Brain.* 2009; 132:903–918.
- Zobiack N, Rescher U, Ludwig C, Zeuschner D, Gerke V. The annexin 2/S100A10 complex controls the distribution of transferrin receptor-containing recycling endosomes. *Mol Biol Cell.* 2003; 14:4896-4908.
- Zou L, Yuan X, Long Y, Shine HD, Yang K. Improvement of spatial learning and memory after adenovirus-mediated transfer of the nerve growth factor gene to aged rat brain. *Hum Gene Ther.* 2002; 13:2173-2184.
- Zuccoli G, Siddiqui N, Bailey A, Bartoletti SC. Neuroimaging findings in pediatric Wernicke encephalopathy: a review. *Neuroradiology.* 2010; 52:523–529.

ANEXOS



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA



Resolução

O Comitê de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 04/2008/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou as aulas práticas abaixo.

Protocolo: 60/2010

Professor:

Emílio Luiz Streck

Título: "Avaliação dos efeitos neuroquímicos e comportamentais em um modelo animal da doença do xarope do bordo".

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado ao CEUA. Os membros do CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar o CEUA.

www.unesc.net/propex/ceua.

Criciúma, 18 de novembro de 2010.

Carina Rodrigues Boeck

Coordenadora do CEUA