

**MELINE OLIVEIRA DOS SANTOS MORAIS**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO PRÉ E PÓS-  
NATAL COM ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 SOBRE DANO AO  
DNA EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DA URINA DO  
XAROPE DO BORDO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde para obtenção do  
título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz  
Streck

**CRICIÚMA  
2015**

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M827a Morais, Meline Oliveira dos Santos.

Avaliação dos efeitos do tratamento pré e pós-natal com ácidos graxos ômega-3 sobre dano ao DNA em modelo animal de doença da urina do xarope do bordo / Meline Oliveira dos Santos Morais ; orientador : Emilio Luiz Streck. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2015.  
69 p. : il. ; 21 cm.

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

1. Doença da urina do xarope do bordo - Tratamento. 2. Ácidos graxos ômega-3. 3. Dano ao DNA. 4. Aminoácidos de cadeia ramificada. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1



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

#### ATA DE Mestrado em Ciências da Saúde – Nº 247

Com início às 10h00 (dez horas) do dia 02 (dois) do mês de fevereiro de 2016 (dois mil e dezesseis), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Meline Oliveira dos Santos Moraes**, sob a orientação do Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, intitulada “**Avaliação dos efeitos do tratamento pré e pós-natal com ácidos graxos ômega-3 sobre dano ao dna em modelo animal de doença da urina do xarope do bordo**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Fernanda Schuck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Samira da Silva Valvassori (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof. Dr. Alexandre Umpierrez Amaral (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 11h30 (onze horas e trinta minutos), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza Coordenador do Programa. Criciúma, 02 (dois) de fevereiro de 2016 (dois mil e dezesseis).

Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza  
Coordenador PPGCS

Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza  
Coordenador do PPGCS

Diana Ghisi  
Diana Ghisi Daniel  
Secretária



## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Bioenergética e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.



*Aos meus pais que são meus  
maiores incentivadores.  
Ao meu esposo Fábio e meu  
filho Augusto por fazerem  
parte da minha vida e me  
apoiarem em todas as  
minhas decisões.*





## **AGRADECIMENTOS**

*Ao meu orientador Dr. Emilio Luiz Streck pelos ensinamentos e pela confiança depositada em mim.*

*As minhas colegas de laboratório Giselli, Lara e Milena pela amizade, apoio, e principalmente por tornar a convivência e a rotina do laboratório mais agradável.*

*Aos meus pais que nunca mediram esforços para me proporcionar uma boa educação.*

*Ao meu esposo Fábio e ao meu filho Augusto pelo incentivo e apoio ao longo desta caminhada.*

*Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelos conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado.*

*Aos Laboratórios de Bioenergética e de Erros Inatos do Metabolismo pela amizade e convivência.*

*A Universidade do Extremo Sul Catarinense que foi fundamental para a construção do meu conhecimento.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.*



*“Não é na ciência que está a felicidade, mas na aquisição da ciência”.*

*Edgar Allan Poe*



## RESUMO

A doença da urina do xarope do bordo (DXB) é um distúrbio metabólico hereditário em que ocorre o acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina, e de seus  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (CACR)  $\alpha$ -cetoisocaproico,  $\alpha$ -cetometilvalérico e  $\alpha$ -cetoisovalérico. Pacientes com DXB podem apresentar, entre outros sintomas, prejuízo neurológico. No entanto, a fisiopatologia subjacente a este dano cerebral permanece pouco esclarecida. Muitas estratégias terapêuticas, incluindo antioxidantes, são estudadas na tentativa de contribuir para o tratamento destes pacientes. Neste contexto, os ácidos graxos (AG) da família ômega-3, conhecidos por atuarem na estrutura e manutenção do sistema nervoso central, estão sendo amplamente estudados e recomendados para gestantes. Adicionalmente ao seu papel estrutural, estes AG são utilizados por atuarem como anti-inflamatórios e antioxidantes. O objetivo do presente estudo foi investigar, mediante dois protocolos de administração, os efeitos do ômega-3 sobre o dano ao DNA, através do ensaio cometa, em hipocampo, estriado e córtex cerebral da prole de ratos com DXB. No primeiro protocolo, investigou-se a suplementação materna com ômega-3 (0,8 g/kg peso corporal) durante o período pré-natal e seus efeitos sobre a prole. No segundo protocolo, investigou-se o tratamento de ratos infantes com ômega-3 (0,1 g/kg peso corporal) no período pós-natal. O modelo crônico de DXB aplicado à prole foi induzido quimicamente pelo *pool* de AACR (15,8  $\mu$ L/g peso corporal). Os resultados mostraram que a suplementação materna com ômega-3 durante o período pré-natal não preveniu os danos causados ao DNA no cérebro da prole com DXB. Por outro lado, quando o ômega-3 foi utilizado como tratamento pós-natal, esse reverteu os danos ao DNA nas estruturas cerebrais hipocampo, estriado e córtex dos ratos com DXB. De acordo com estes resultados, pode-se concluir que os metabólitos acumulados na DXB causam dano ao DNA e que o ômega-3 apresentou efeito protetor quando administrado no período pós-natal. Assim, sugere-se que o ômega-3 possa ser utilizado como um possível adjuvante ao tratamento da DXB.

**Palavras-chave:** ácidos graxos ômega-3; aminoácidos de cadeia ramificada; antioxidante; dano ao DNA; doença da urina do xarope do bordo.



## ABSTRACT

Maple syrup urine disease (MSUD) is an inherited metabolic disorder in which there is an accumulation of the branched-chain amino acids (BCAA) leucine, isoleucine and valine, as well as branched chain  $\alpha$ -ketoacid (BCKD)  $\alpha$ -ketoisocaproic,  $\alpha$ -ketometilvalérico and  $\alpha$ -ketocetoisovalérico. MSUD patients can present, among other symptoms, neurological impairment. However, the underlying pathophysiology of this brain damage remains obscure. Many therapeutic strategies, including antioxidants, studied in an attempt to contribute to the treatment of these patients. In this context, fatty acids (FA) of the omega-3 family, known to act on the structure and maintenance of the central nervous system are being widely studied and recommended for pregnant. In addition to their structural role, these FA used because they act as anti-inflammatories and antioxidants. The aim of this study was to investigate the effects of omega-3 by means of two administration protocols on DNA damage in rats with MSUD. The aim of this study was to investigate, by means of two administration protocols, the effects of omega-3 on DNA damage by the comet assay in the hippocampus, striatum and cerebral cortex of rat offspring with MSUD. In the first protocol, we investigated the maternal supplementation with omega-3 (0.8 g/kg body weight) during the prenatal period and their effects on the offspring. In the second protocol, we investigated the treatment of infant rats with omega-3 (0.1 g/kg body weight) on postnatal period. The chronic model MSUD offspring were applied to chemically induced by the BCAA *pool* (15.8  $\mu$ L/g body weight). The results showed that maternal supplementation with omega-3 during the prenatal period did not prevent the damage to the DNA in the MSUD offspring's brain. On the other hand, when omega-3 was used as postnatal treatment, the reversed DNA damage in brain structures hippocampus, striatum and cortex of MSUD rats. According to these results, it can be concluded that metabolites accumulated in MSUD cause DNA damage and that omega-3 showed a protective effect when administered in the postnatal period. Thus it is suggested that omega-3 can be used as a possible adjuvant to treatment of MSUD.

**Keywords:** antioxidant; branched-chain amino acids; DNA damage; maple syrup urine disease; omega-3 fatty acids.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Rota catabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina .....	27
<b>Figura 2.</b> Metabolismo dos ácidos graxos (AG) das famílias n-3 e n-6 .....	38
<b>Figura 3.</b> Esquema de suplementação materna com ômega-3 em ratas gestantes e indução do modelo da doença da urina do xarope do bordo (DXB) na prole.....	43
<b>Figura 4.</b> Esquema de indução do modelo da doença da urina do xarope do bordo (DXB) em ratos infantes e tratamento pós-natal com ômega-3 .....	44
<b>Figura 5.</b> Classificação das células pelo ensaio cometa .....	45
<b>Figura 6.</b> Efeito da suplementação materna com ômega-3 durante o período pré-natal sobre o dano ao DNA em estruturas cerebrais da prole com doença da urina do xarope do bordo (DXB) .....	47
<b>Figura 7.</b> Efeito do tratamento pós-natal com ômega-3 sobre o dano ao DNA em estruturas cerebrais de ratos submetidos a um modelo experimental de doença da urina do xarope do bordo (DXB) .....	48



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA- Ácido araquidônico  
AACR- Aminoácidos de cadeia ramificada  
AG- Ácidos graxos  
ALA- Ácido  $\alpha$ -linolênico (do inglês,  *$\alpha$ -linolenic acid*)  
BDNF- Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*)  
BHE- Barreira hematoencefálica  
CACR-  $\alpha$ -Cetoácidos de cadeia ramificada  
CAT- Catalase  
CDCCR- Complexo desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada  
CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais  
CIC- Ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico  
CIV- Ácido  $\alpha$ -cetocetoisovalérico  
CMV- Ácido  $\alpha$ -cetometilvalérico  
CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
DA- Dopamina  
DFX- Desferroxamina  
DHA- Ácido docohexanoico (do inglês, *docosahexaenoic acid*)  
DMSO- Dimetilsulfóxido  
DNA- Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)  
DXB- Doença da urina do xarope do bordo  
EDTA- Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês, *ethylenedinitrilotetraacetic acid*)  
EIM- Erros inatos do metabolismo  
EPA- Ácido eicosapentanóico (do inglês, *eicosapentaenoic acid*)  
FD- Frequência de danos  
GABA- Ácido gama-aminibutírico (do inglês, *Gamma-aminobutyric acid*)  
GPx- Glutaciona peroxidase  
GSH- Glutaciona reduzida  
5HT- Serotonina (do inglês, *serotonin*)  
ID- Índice de danos  
IFN $\gamma$ - Interferon gama  
IL- Interleucina  
LA- Ácido linoleico (do inglês, *linoleic acid*)  
LEV- Levetiracetam  
MMP- Metaloproteinase de matriz (do inglês, *matrix metalloproteinase*)



NAC- *N*-acetilcisteína

NADH- Dinucleotídio de adenina e nicotinamida, forma reduzida (do inglês, *reduced nicotinamide adenine dinucleotide*)

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

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

PTZ- Pentilenotetrazol

SNC- Sistema nervoso central

SOD- Superóxido dismutase

SPSS - Programa estatístico aplicado as ciências sociais (do inglês, *Statistical Package for the Social Sciences*)



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO .....	25
1.2 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO .....	26
<b>1.2.1 Histórico</b> .....	<b>26</b>
<b>1.2.2 Etiologia</b> .....	<b>26</b>
<b>1.2.3 Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada</b> .....	<b>28</b>
<b>1.2.4 CDCCR</b> .....	<b>28</b>
<b>1.2.5 Manifestações clínicas</b> .....	<b>29</b>
<b>1.2.6 Achados neuropatológicos</b> .....	<b>30</b>
<b>1.2.7 Fisiopatologia do dano neurológico</b> .....	<b>31</b>
<b>1.2.8 Diagnóstico</b> .....	<b>34</b>
<b>1.2.9 Tratamento</b> .....	<b>34</b>
1.3 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA) .....	35
1.4 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 .....	36
1.5 JUSTIFICATIVA .....	38
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
3.1 ANIMAIS .....	41
3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES .....	41
<b>3.2.1 Pool de aminoácidos de cadeia ramificada</b> .....	<b>41</b>
<b>3.2.2 Ácidos graxos ômega-3</b> .....	<b>41</b>
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL .....	42
<b>3.3.1 Tratamento pré-natal</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3.2 Tratamento pós-natal</b> .....	<b>43</b>
3.4 ENSAIO COMETA .....	44
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>67</b>
<b>ANEXO A- Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais</b> .....	<b>68</b>





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

O primeiro relato sobre erros inatos do metabolismo (EIM) foi feito por Archibald Garrod no início do século XX, onde ele descreveu a alcaptonúria, doença no qual indivíduos afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. Garrod observou o surgimento de novos distúrbios relacionados a alterações genéticas e que envolviam o acúmulo de outras substâncias nos fluidos biológicos dos pacientes. Ele, então, postulou que estas doenças resultam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, de caráter enzimático ou não, pertencente ao metabolismo (Scriver et al., 2001). Com base nestas informações, foi proposto que a deficiência enzimática gera um bloqueio metabólico e, como consequência deste bloqueio, ocorre o acúmulo de precursores da reação, com a formação de rotas metabólicas alternativas e deficiência de produtos importantes ao organismo (Bickel, 1987).

Os EIM, quando analisados de forma individual, são considerados raros. Entretanto, quando analisados em conjunto são frequentes e podem atingir um em cada mil nascidos vivos. Este grupo de doenças corresponde a aproximadamente 10 % de todas as doenças genéticas e, atualmente, já foram descritos mais de 500 distúrbios, incluindo defeitos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Jimenez-Sanchez et al., 2001). A ausência ou a grave deficiência de uma atividade enzimática gera um bloqueio metabólico, que por sua vez resulta no acúmulo de substratos e seus derivados. De acordo com a rota metabólica afetada, este bloqueio pode gerar manifestações clínicas variáveis, geralmente provocando sintomas graves, e na maioria das vezes afetam o sistema nervoso central (SNC) (Scriver et al., 2001). Os EIM podem ser divididos em duas principais categorias. A categoria 1 engloba as doenças que envolvem apenas um sistema funcional ou que afetam um único órgão ou sistema anatômico. Os pacientes apresentam sintomas uniformes e o diagnóstico geralmente é fácil. Por outro lado, a categoria 2 abrange um grupo de doenças em que o defeito bioquímico afeta uma via metabólica comum a diversos órgãos ou restrito a apenas um órgão, porém com manifestações humorais e sistêmicas. As doenças da categoria 2 apresentam diversidade clínica e acarretam grande dificuldade diagnóstica (Saudubray e Charpentier, 1995).

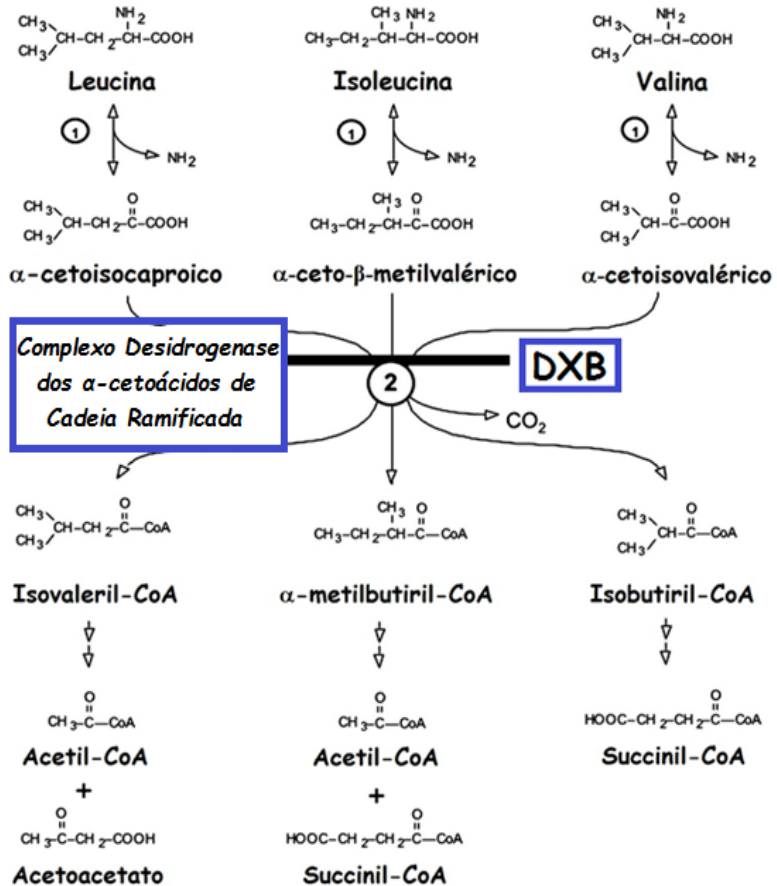
## 1.2 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO

### 1.2.1 Histórico

A doença da urina do xarope do bordo (DXB) foi descrita por Menkes et al. (1954) após observarem quatro pacientes com uma doença neurológica degenerativa, caracterizada por edema cerebral, convulsões, espasticidade e sofrimento respiratório. O início dos sintomas se deu na primeira semana de vida e morte até o terceiro mês. O nome da doença foi proposto porque a urina destes pacientes possuía forte odor de açúcar queimado. Em 1957, Westall et al. observaram outro paciente e encontraram concentrações elevadas dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina na urina. Em 1959, Menkes conseguiu isolar os  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (CACR), derivados destes AACR, da urina dos pacientes com DXB. Posteriormente, foi demonstrado por Dancis et al. (1960) que o bloqueio metabólico na DXB ocorre na descarboxilação dos CACR.

### 1.2.2 Etiologia

A DXB (OMIM #248600) é um distúrbio metabólico de herança autossômica recessiva (Danner e Elsas, 1989; Nobukuni et al., 1991) causado pela deficiência na atividade enzimática do complexo desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (CDCCR; E.C. 1.2.4.4) e apresenta uma incidência mundial de aproximadamente 1 em cada 185.000 nascidos vivos (Chuang e Shih, 2001). O bloqueio metabólico que ocorre nesta doença leva ao acúmulo dos AACR leucina, isoleucina e valina e dos CACR  $\alpha$ -cetoisocaproico (CIC),  $\alpha$ -cetometilvalérico (CMV) e  $\alpha$ -cetocetoisovalérico (CIV) (Figura 1). Estas substâncias são indiretamente responsáveis pelo odor urinário anormal apresentado pelos pacientes (Menkes, 1959; Chuang e Shih, 2001).



**Figura 1. Rota catabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina.** Na reação (1), ocorre transaminação reversível pela enzima aminotransferase dos AACR. Na reação (2), ocorre a descarboxilação oxidativa dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada e esterificação da coenzima A pelo complexo desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada. Em destaque, está demonstrado o bloqueio metabólico que ocorre na doença da urina do xarope do bordo (DXB), devido à deficiência do complexo desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada. Adaptado de Chuang e Shih, 2001.

### 1.2.3 Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada

Os AACR leucina, isoleucina e valina são aminoácidos essenciais constituídos por quatro ou mais átomos de carbono, cuja cadeia carbônica é ramificada por uma metila na posição 3 ou 4. São provenientes da dieta, e em indivíduos normais correspondem a aproximadamente 40 % dos aminoácidos essenciais e 35 % dos aminoácidos considerados indispensáveis para o tecido muscular (Schadwaldt e Wendel, 1997). Estes aminoácidos estão envolvidos na manutenção da proteína corporal e no fornecimento de nitrogênio para a síntese de neurotransmissores (Tom e Nair, 2006), além de servirem como substratos energéticos para o músculo esquelético, rins, coração, tecido adiposo e cérebro (Schadewaldt e Wendel, 1997).

A via de catabolismo dos AACR inicia com o transporte destes aminoácidos através do sistema de transporte L localizado na membrana plasmática, para dentro da célula. Quando os AACR chegam ao interior das células, sofrem três passos iniciais comuns na via metabólica. No primeiro passo, ocorre uma transaminação reversível que é catalisada pela aminotransferase de cadeia ramificada (E.C. 2.6.1.42). Esta enzima se apresenta nas isoformas, citosólica e mitocondrial, e produz os CACR, CIC proveniente da leucina, CMV proveniente da isoleucina e CIV proveniente da valina. Os CACR são translocados, por um translocador específico, para o interior da mitocôndria onde sofrem descarboxilação oxidativa irreversível, catalisada pelo CDCCR. A reação produz os respectivos acil-CoAs ramificados que são metabolizados por vias específicas. Os produtos finais do metabolismo da leucina, da valina e da isoleucina são acetil-CoA e acetoacetato, succinil-CoA e acetil-CoA e succinil-CoA, respectivamente. Os AACR podem ser tanto cetogênicos quanto glicogênicos e são precursores para a síntese de ácidos graxos, colesterol e como substrato energético via succinil-CoA e acetoacetato (Chuang e Shih, 2001).

### 1.2.4 CDCCR

Nas células dos mamíferos o CDCCR está localizado na membrana interna da mitocôndria (Yeaman, 1986; Chuang e Shih, 2001). Este complexo atua no processo de descarboxilação dos CACR provenientes da transaminação dos AACR (leucina, isoleucina e valina) (Parrella et al., 1994; Chuang e Shih, 2001). O fígado é responsável por aproximadamente 15 % da atividade enzimática deste complexo (Strauss

et al., 2006). O fluxo dos AACR usados como substrato energético é regulado pela atividade do CDCCR, sendo este o passo irreversível da via catabólica. Os três componentes catalíticos que compõem este complexo são uma  $\alpha$ -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada heterotetramérica ( $\alpha_2\beta_2$ ), chamada de E1, uma di-hidrolipoil trasacilase (24 subunidades idênticas), chamada de E2, e uma di-hidrolipoamida desidrogenase homodimérica, chamada de E3. Este complexo também apresenta uma enzima cinase e uma fosfatase específicas que regulam sua atividade através da fosforilação/desfosforilação de dois resíduos de serina da subunidade E1 $\alpha$  (Eisenstein et al., 1991; Peinemann e Danner, 1994). Os produtos obtidos ao final da reação da desidrogenase dos CACR são um acil-CoA de cadeia ramificada, um CO<sub>2</sub> e um dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida (NADH) (Danner et al., 1979).

### 1.2.5 Manifestações clínicas

A atividade residual do complexo enzimático é responsável pelos diferentes fenótipos clínicos apresentados pelos pacientes com DXB. Atualmente, são conhecidos cinco fenótipos clínicos que compreendem as formas clássica, intermediária, intermitente, responsiva à tiamina e deficiência da lipoamida desidrogenase-E<sub>3</sub>. Destes, a forma clássica é a mais comum e mais grave. Os demais fenótipos clínicos são variantes e as manifestações clínicas moderadas (Tabela 1) (Chuang e Shih, 2001; Serra et al., 2010). A atividade residual do CDCCR na forma clássica é de 0-2 %, e as principais manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes incluem cetoacidose, hipoglicemia, recusa alimentar, opistótono, bem como disfunção neurológica, convulsões, hipotonia, irritabilidade, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e deficiência intelectual (Chuang e Shih, 2001; Simon et al., 2006).

**Tabela 1. Classificação dos fenótipos clínicos da DXB com base nas manifestações clínicas e na atividade enzimática do CDCCR.**

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

Adaptado de Chuang e Shih (2001).

### **1.2.6 Achados neuropatológicos**

Grande parte dos pacientes com DXB apresenta encefalopatia com edema cerebral generalizado. Adicionalmente, há estudos que mostram hipodensidade difusa do globo pálido e tálamo, afetando a substância branca e sugerindo hipomielinização (Treacy et al., 1992). A fase aguda do edema pode levar a atrofia cerebral, sendo o trato piramidal da medula espinhal, a mielina que circunda o núcleo dentado, o corpo caloso e os hemisférios cerebrais os mais afetados. Nos núcleos da base e substância negra, também foram observados perda neuronal considerável (Chuang e Shih, 2001). Exames radiológicos apontam sinais aumentados em neuroimagens (T2) que mostram modificações no conteúdo aquoso na substância branca indicando possível desmielinização. Das áreas cerebrais observadas, o mesencéfalo, o tronco cerebral, o tálamo e o globo pálido são as mais afetadas (Schonberger et al., 2004), além destas áreas

foram observadas alterações nas cápsulas internas do limbo posterior e na corona radiata (Myers et al., 2012).

### 1.2.7 Fisiopatologia do dano neurológico

A fisiopatologia dos achados neurológicos e dos danos cerebrais apresentados pelos pacientes com DXB ainda é pouco conhecida. No entanto, o aumento dos níveis plasmáticos de leucina parece estar associado ao aparecimento de sintomas neurológicos. A leucina e o CIC são considerados os principais metabólitos neurotóxicos na DXB (Snyderman et al., 1964; Chuang e Shih, 2001). Em um estudo com homogeneizados de cérebro de ratos realizado por Tashian (1961), foi demonstrado que o CIC, o CIV e a leucina e, em menor grau os hidróxiácidos inibem competitivamente a atividade da enzima glutamato descarboxilase. Além disso, foi demonstrado em cultura de astrócitos que o excesso de CIC reduz pela metade o conteúdo de glutamato, aumentando a velocidade de sua oxidação (Yudkoff et al., 1993; Huang et al., 1996; Zielke et al., 1997). Adicionalmente, estudos apontam para uma diminuição da captação de glutamato por vesículas sinápticas em cérebro de ratos jovens. Nestes estudos foi demonstrado que os AACR e os CACR inibem a captação de glutamato em concentrações similares a de pacientes em episódio de descompensação metabólica (Reis et al., 2000; Tavares et al., 2000). Foi também demonstrada uma diminuição acentuada no número de receptores pós-sinápticos ácido gama-aminobutírico da classe A (GABA<sub>A</sub>) em um modelo animal de DXB em bovinos (Dodd et al., 1992).

Dos três  $\alpha$ -cetoácidos envolvidos na DXB, o CIC é o mais tóxico (Gibson e Blass, 1976). Ele inibe o consumo de oxigênio cerebral e provoca deficiência na formação de mielina em cerebelo de ratos. A elevação sérica de leucina e de CIC no espaço extracelular interfere na concentração de aminoácidos, como a metionina, valina, isoleucina, triptofano, tirosina, fenilalanina e glutamima, transportados para o SNC através do transportador dos aminoácidos neutros grandes (sistema L) (Araújo et al., 2001). Desta forma, a diminuição na concentração cerebral de alguns aminoácidos pode afetar a biossíntese de neurotransmissores cerebrais, como as catecolaminas e a serotonina (Huang et al., 1996; Zielke et al., 1997). Nesse sentido, achados mostraram que o excesso de leucina na dieta provoca diminuição de serotonina cerebral (Yuwiler e Geller, 1965).

Foi relatada a ocorrência de apoptose em cultura de fibroblastos de pele de um paciente com DXB, quando exposto a quantidades de AACR e CACR semelhantes às encontradas em pacientes (Jouvet et al., 2000a; Jouvet et al., 2000b). Funchal et al. (2004a) demonstraram, em cultura de astrócitos, que os CACR desencadeiam a morte celular em concentrações semelhantes as observadas em pacientes em estado de descompensação metabólica (Funchal et al., 2002; Pessoa-Pureur et al., 2002; Funchal et al., 2004b).

Também tem sido postulado que o déficit energético cerebral, especialmente durante crises de descompensação metabólica, pode contribuir para a lesão cerebral. Desta forma, Gibson e Blass (1976) demonstraram que  $\alpha$ -cetoácidos CIC, CIV e CMV inibem a oxidação da glicose e a síntese de acetilcolina, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos em fatias de cérebro de ratos. Também inibem a enzima ácido graxo sintase, a oxidação do piruvato, o transporte mitocondrial de piruvato, a atividade do complexo piruvato desidrogenase e a atividade da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase em cérebro de ratos. Estudo realizado por Scaini et al. (2012a) demonstraram que a administração aguda e crônica de AACR aumentou a atividade da acetilcolinesterase em cérebro de ratos. Além disso, os mesmos autores demonstraram que este aumento foi prevenido pela coadministração dos antioxidantes *N*-acetilcisteína (NAC) e desferroxamina (DFX). Também foi descrito que a leucina seria responsável pela hipoglicemia apresentada pelos pacientes com DXB, visto que este aminoácido estimula a secreção de insulina pelo pâncreas (Panten et al., 1972).

Alguns estudos realizados *in vitro* observaram alterações na homeostase mitocondrial causadas pelos AACR e CACR e sugerem que possa haver relação com o dano cerebral observado nos pacientes. Neste contexto, um estudo realizado por Sgaravatti et al. (2003) demonstra um efeito inibitório dos CACR sobre a produção de CO<sub>2</sub> e sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em cérebro de ratos. Em outro estudo, foi demonstrado que os AACR reduzem a atividade da creatina cinase em homogeneizados de cérebro de ratos (Pilla et al., 2003). Ribeiro et al. (2008) observaram que os AACR produziram um efeito inibitório sobre a produção de CO<sub>2</sub> e sobre os complexos II-III, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial. Em outro estudo, também *in vitro*, foi demonstrado em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens que o CIC atua como desacoplador da fosforilação oxidativa. Neste mesmo estudo, também foi observado que tanto o CIC quanto a leucina atuam como inibidores metabólicos (Amaral et al., 2010).



Muitos trabalhos apontam o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da DXB. Experimentos com animais demonstraram que os AACR e os CACR acumulados na DXB estimulam a peroxidação lipídica em cérebro de ratos jovens (Fontella et al., 2002). Barschak et al. (2006) demonstraram que pacientes com DXB apresentam níveis aumentados de marcadores de peroxidação lipídica no plasma. Além disso, foi observado que principalmente a leucina e CIC reduzem a capacidade de modulação cerebral ao dano causado pelos radicais livres e que a peroxidação lipídica estimulada pela leucina pode ser atenuada por antioxidantes como o ácido ascórbico (vitaminas C) e tocoferol (vitamina E), glutathiona reduzida (GSH) e superóxido dismutase (SOD) (Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005a; Bridi et al., 2005b). Mescka et al. (2011) observaram que animais submetidos a um modelo de DXB induzido quimicamente apresentaram aumento nos níveis de peroxidação lipídica, dano a proteínas e diminuição da atividade das enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), também foi demonstrado que estas alterações foram evitadas pela administração de L-carnitina. Ainda utilizando este mesmo modelo animal de DXB, Scaini et al. (2012b) relataram dano ao DNA em hipocampo e estriado e que a administração dos antioxidantes NAC e DFX preveniram este dano. Outros achados mostraram, através de estudos *in vitro* e *in vivo* em plasma de pacientes com DXB, a presença de dano ao DNA e que o tratamento com L-carnitina impediu este dano (Mescka et al., 2014; Mescka et al., 2015a).

Estudos recentes mostram o envolvimento de processos inflamatórios na DXB. Um estudo realizado por Simone et al. (2013) observou em células de microglia que os AACR modulam as propriedades imunológicas por alterarem a capacidade imunológica da resposta pró-inflamatória. Scaini et al. (2014) observaram que o aumento de AACR associado ao processo inflamatório pode contribuir para ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), principalmente por aumentar as metaloproteinases de matriz (MMP), MMP-2 e MMP-9. Recentemente, foi demonstrado um aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias interleucinas (IL) IL-1, IL-6 e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) em plasma de pacientes com DXB, tratados com dieta de restrição proteica, e que o tratamento com L-carnitina reduziu os níveis plasmáticos destas citocinas (Mescka et al., 2015b).

### 1.2.8 Diagnóstico

O diagnóstico da DXB consiste basicamente em exames laboratoriais. A doença é caracterizada pela identificação de altas concentrações de leucina, isoleucina e valina e seus respectivos  $\alpha$ -cetoácidos em plasma e urina dos pacientes por cromatografia de aminoácidos e ácidos orgânicos. Nos pacientes sem tratamento, a leucina é o principal metabólito acumulado, atingindo níveis plasmáticos de até 5 mM, enquanto a isoleucina e a valina atingem 1 mM (Zielke et al., 1996). O diagnóstico confirmatório para DXB pode ser feito através da mensuração da atividade do CDCCR em cultura de leucócitos periféricos dos pacientes (Peinemann e Danner, 1994).

A DXB pode ser identificada pela triagem neonatal em que se impregna uma gota de sangue em papel filtro para realização de análise semiquantitativa por cromatografia de aminoácidos (Brasil, 2002). No Brasil, o teste do pezinho fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) não contempla a triagem para DXB, sendo necessário realizá-lo em laboratórios privados (Souza et al., 2002).

### 1.2.9 Tratamento

O tratamento para DXB pode ser dividido em duas fases: fase aguda e fase de manutenção (Serra et al., 2010). Na fase aguda ocorre a descompensação metabólica decorrente de estresse fisiológico precipitado por infecção, exercícios físicos, febre, jejum prolongado ou por qualquer outra situação que estimule o catabolismo, além de ocorrer pela ingestão excessiva de proteínas da dieta (Chuang e Shih, 2001; Morton et al., 2002; Ramón e Jáuregui, 2005). O tratamento nesta fase consiste na redução imediata das concentrações dos AACR, aporte nutricional adequado e indução do anabolismo para evitar o catabolismo. Em casos mais graves, outras estratégias podem ser utilizadas, como a hemodiálise, a diálise peritoneal e a hemofiltração para eliminar os compostos acumulados (Calvo et al., 2000; Ramón e Jáuregui, 2005).

Na fase de manutenção, o tratamento para DXB consiste em uma dieta com restrição de AACR, suplementação de fórmula semissintética composta por aminoácidos essenciais (exceto os AACR), vitaminas e minerais (Jouvet et al., 2001). O objetivo do tratamento é manter os níveis plasmáticos de leucina próximos aos valores de referência (entre 77 e 153  $\mu\text{mol/L}$ ) (Lepage et al., 1997) ou entre os limites aceitáveis (entre 100 e 300  $\mu\text{mol/L}$ ) para evitar a ocorrência de danos (Morton et al., 2002). Com

a redução do acúmulo de metabólitos tóxicos, principalmente da leucina e do CIC, também ocorre a redução de seus efeitos prejudiciais ao SNC (Strauss et al., 2010).

Em casos mais graves, outra estratégia a ser utilizada é o transplante hepático, cujo objetivo é restaurar parte da função enzimática nos pacientes com DXB, visto que o fígado é o local com maior deficiência na atividade do complexo enzimático (Strauss et al., 2006).

### 1.3 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)

O DNA é uma biomolécula formada por bases nitrogenadas, uma pentose do tipo desoxirribose e grupos fosfato. Esta molécula é vulnerável ao ataque de outras moléculas químicas, o que pode resultar em alterações nas suas propriedades de codificação (Rao, 2007). Danos no DNA celular são considerados grandes ameaças para a estabilidade do genoma e podem levar à perda ou amplificação da atividade cromossômica com consequente alteração na expressão gênica (Kawanishi et al., 2001; Lee et al., 2003). Dentre os principais danos estão a formação de adutos ou ligações cruzadas de DNA e suas proteínas e alterações nas bases nitrogenadas que levam a alterações nas hélices do DNA (Lee et al., 2003). Estes danos podem ocorrer através de dois mecanismos principais: o primeiro deles ocorre de forma espontânea por moléculas endógenas à célula, e o segundo ocorre por outras fontes, como xenobióticos e radiação (Rao, 2007).

Um teste com boa aplicação para avaliar genotoxicidade é o ensaio cometa. Este método detecta danos ao DNA causados por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (Silva et al., 2003). Não detecta mutações, mas consegue detectar lesões genômicas que, após serem processadas, podem acarretar em mutações. Outra aplicação para o ensaio cometa é em pesquisas sobre reparo do DNA, uma vez que ele possibilita a compreensão de dados cinéticos e sobre o tipo de lesão a ser reparada (Gontijo, 2003).

As espécies reativas são produzidas *in vivo* por todos os tecidos e sua produção em excesso pode danificar o DNA (Halliwell, 2001). O aumento na produção de espécies reativas e/ou a diminuição das defesas antioxidantes leva ao estresse oxidativo e este, por sua vez, desencadeia dano oxidativo em biomoléculas (lipídeos, proteínas e DNA) e até mesmo morte celular (Halliwell, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2007). Quando este dano oxidativo ocorre em sequências específicas de DNA pode resultar em carcinogênese ou no envelhecimento tecidual (Kawanishi et al., 2001;

Nakanishi et al., 2009). Alterações na expressão gênica podem favorecer a patogenia de doenças degenerativas relacionadas ao envelhecimento (Lee et al., 2004) e a compreensão dos efeitos do estresse oxidativo na integridade do DNA é fundamental para o entendimento de várias doenças (Sitta et al., 2009). Adicionalmente, processos inflamatórios crônicos também podem causar danos ao DNA por liberarem espécies reativas que causam instabilidade genômica, induzindo a metilação do DNA e câncer (Niwa et al., 2010; Ohnishi et al., 2013; Kidane et al., 2014).

Em modelos animais de diferentes EIM, foi demonstrado que os metabólitos tóxicos acumulados nestas doenças induziram o aumento da produção de espécies reativas e a diminuição das defesas antioxidantes (Colome et al., 2000; Wajner et al., 2004; Sitta et al., 2011). Neste contexto, estudos em modelos animais e em plasma de pacientes com DXB demonstraram que os AACR e os CACR acumulados na DXB são capazes de causar dano ao DNA celular e que este foi revertido pela administração de antioxidantes, indicando que o dano pode ser oxidativo (Scaini et al., 2012b; Mescka et al., 2014; Mescka et al., 2015a).

#### 1.4 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3

Os ácidos graxos (AG) poli-insaturados compreendem duas grandes famílias, a ômega-6 (n-6) e a ômega-3 (n-3). Estes AG podem ser fornecidos pela dieta ou sintetizados a partir de AG essenciais por meio de reações de dessaturação e alongação. Enzimas dessaturases, ao oxidar dois carbonos da cadeia do AG, formam duplas ligações, enquanto as elongases aumentam o tamanho da cadeia carbônica pela adição de dois átomos de carbono (Figura 2) (Rosell et al., 2005; Martin et al., 2006; Poniedziałek-Czajkowska et al., 2014). Desta forma, o ácido linoleico (LA; 18:2n-6), pertencente à família ômega-6, é precursor do ácido araquidônico (AA; 20:4n-6) e o ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA; 18:3n-3) que pertence à família ômega-3, é precursor dos ácidos eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) e docosahexanóico (DHA; 22:6n-3) (Poniedziałek-Czajkowska et al., 2014). Os AG ômega-3 e ômega-6 competem pelas mesmas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongação, porém as enzimas apresentam maior afinidade pelos AG ômega-3 (Calder, 1997; Teitelbaum e Walker, 2001). A razão ômega-6/ômega-3 (n-6/n-3) deve ser equilibrada, pois os AG ômega-3, principalmente o EPA, são produtores de eicosanoides com características anti-

inflamatórias, enquanto o ômega-6 AA possui características inflamatórias, quando em excesso (Perini et al., 2010).

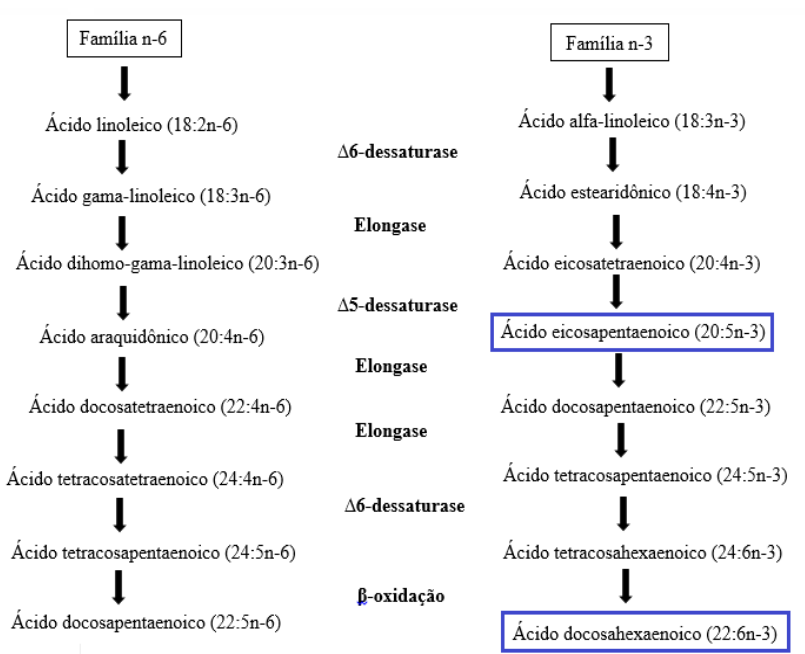
As principais fontes alimentares de AG ômega-3 são os peixes de água fria, mas também estão presentes em vegetais como linhaça, canola e soja (Rosell et al., 2005). É importante ressaltar que gestantes necessitam de maior ingestão de ômega-3 durante a gestação e lactação, por isso é recomendada suplementação de 300 mg/dia de DHA no período da gestação e cerca de 200 mg/dia de DHA durante a lactação (Simopoulos et al., 1999). A suplementação materna tornou-se necessária devido aos diversos efeitos benéficos atribuídos ao ômega-3 e principalmente por estes serem transferidos via placenta e serem incorporados às células do feto durante a gestação (Innis, 2003; Fleith e Candinin, 2005). Um aporte adequado de ômega-3 durante os períodos gestacional e pós-natal pode melhorar o desenvolvimento visual e do SNC do recém-nascido (Silva et al., 2007).

Os AG ômega-6 e ômega-3 são necessários para o crescimento e o desenvolvimento normal do organismo (Innis 1991; Sellmayer e Koletzko, 1999) e atravessam eficientemente a BHE (Guest et al., 2013). O DHA e o AA são acrescidos ao cérebro durante o desenvolvimento, atuam como moduladores na função da membrana e participam dos processos de neurogênese e neurotransmissão. Estes AG são fundamentais para manutenção da estrutura e função do SNC e da retina (Neuringe et al., 1988; Innis, 2008; Hadders-Algra, 2010). Além disso, o DHA melhora a fluidez, flexibilidade e permeabilidade das membranas celulares (Wu et al., 2008).

A disponibilidade destes AG pode ser afetada por deficiências nutricionais (deficiência de proteínas, carnitina e tocoferol) ou por excesso na produção de espécies reativas envolvidas em algumas doenças crônicas (Decsi et al., 1998; Infante e Huszagh, 2000). Uma das principais aplicações do EPA e do DHA é na prevenção de doenças cardiovasculares (Holub, 2003; Poudyal et al., 2011), embora o mecanismo exato ainda não seja conhecido. Sabe-se que estes AG causam supressão da resposta inflamatória e também exercem possível papel antioxidante (Huxley e Neil, 2003; Duda et al., 2007; Nodari et al., 2011).

Muitos EIM apresentam risco aumentado para deficiência de AG ômega-3 (Giovannini et al., 1995), visto que os pacientes são tratados com dietas de restrição proteica. As principais fontes alimentares de AG também são ricas em proteínas e eliminadas da dieta, por isso estes pacientes possuem concentrações diminuídas de DHA (Vlaardingerbroek et al., 2006; Schuchardt et al., 2010). Além do seu papel estrutural e anti-

inflamatório, AG ômega-3 apresentam efeitos antiagregante plaquetário, anti-hipertensivo e anti-hiperlipidêmico. Estes efeitos benéficos podem ser mediados por mecanismos diferentes, entre eles alterações na função e composição da membrana celular, na expressão gênica ou por atuarem como precursores de eicosanoides (Schuchardt et al., 2010).



**Figura 2. Metabolismo dos ácidos graxos (AG) das famílias n-6 e n-3.** Destaque para os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) sintetizados a partir do precursor ácido alfa-linoléico (ALA) da família n-3. Adaptado de Perini et al., 2010.

## 1.5 JUSTIFICATIVA

Pacientes com DXB apresentam, entre outros sintomas, importante prejuízo neurológico e cognitivo. Embora muitos estudos apontem o envolvimento de diferentes mecanismos na tentativa de explicar a fisiopatologia do dano neurológico ela ainda permanece pouco esclarecida. Evidências indicam que os metabólitos acumulados na DXB

causam lesões ao DNA celular, e este dano pode ser um dos fatores que levam ao surgimento dos sintomas neurológicos. Pacientes com EIM apresentam diminuição dos níveis de AG ômega-3, que desempenham importante papel na manutenção da estrutura e função do SNC, além de possuírem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Levando-se em consideração a importância destes AG e o possível envolvimento do dano ao DNA com os danos neurológicos na DXB, torna-se de extrema importância estudar os efeitos da suplementação com ômega-3 durante o período gestacional (pré-natal) e durante o pós-natal sobre os danos ao DNA em ratos submetidos ao modelo de DXB induzido quimicamente. Assim, buscando uma melhor compreensão sobre a fisiopatologia do dano neurológico e contribuir com uma possível terapia adjuvante para o tratamento dos pacientes acometidos por esta doença.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da administração de AG ômega-3 em tratamentos pré e pós-natal sobre o dano ao DNA em cérebro da prole de ratos após a indução do modelo animal de DXB.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

a) Verificar o efeito da suplementação materna com AG ômega-3 no período pré-natal sobre dano ao DNA em córtex cerebral, estriado e hipocampo da prole de ratos submetida a um modelo experimental de DXB.

b) Verificar o efeito do tratamento pós-natal com AG ômega-3 sobre o dano ao DNA em córtex cerebral, estriado e hipocampo da prole de ratos submetida a um modelo experimental de DXB.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados na Universidade do Extremo Sul Catarinense. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e uso de animais de laboratório, além das diretrizes para o uso de animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob protocolo nº 029-2014-02 (ANEXO A).

Foram utilizados 30 ratos machos e fêmeas infantis (7 dias de idade) e 6 fêmeas adultas (60 dias de idade) da linhagem Wistar, obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram acondicionados em grupos de 5 animais por caixa, com ciclo claro-escuro de 12 horas (07:00 às 19:00) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de  $23 \pm 1^\circ$  C. Os filhotes foram mantidos com as mães até o desmame (21 dias).

#### 3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

##### 3.2.1 *Pool* de aminoácidos de cadeia ramificada

Uma solução de aminoácidos de cadeia ramificada, contendo leucina (190 mmol/L), isoleucina (59 mmol/L) e valina (69 mmol/L) foi preparada em solução salina (0,85 %). Os animais foram submetidos à administração crônica do *pool* de AACR (15,8  $\mu$ L/g de peso corporal) ou salina (grupo controle), por 21 dias, duas vezes ao dia com intervalos de 12 h, por via subcutânea (Bridi et al., 2006).

##### 3.2.2 Ácidos graxos ômega-3

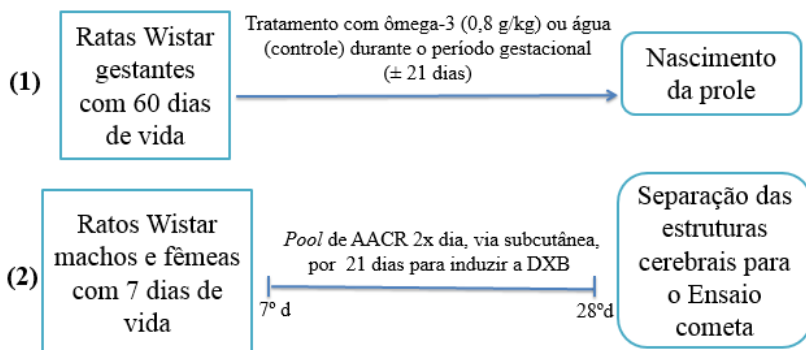
Foram utilizadas cápsulas comerciais de ômega-3 (Vitamed, Caxias do Sul, Brasil). Cada cápsula continha 125 mg de DHA e 188 mg de EPA dissolvidos em 1 mL de óleo de peixe, conforme descrito no rótulo pelo fabricante.

### 3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Neste estudo, foram utilizados dois protocolos de tratamento. No primeiro protocolo (pré-natal), as mães foram suplementadas (tratadas) com ômega-3 durante o período gestacional e os filhos foram submetidos ao modelo de DXB induzido quimicamente. Por outro lado, no segundo protocolo (pós-natal), as mães não foram tratadas durante o período gestacional e os filhos foram submetidos ao modelo de DXB induzido quimicamente e tratados com ômega-3.

#### 3.3.1 Tratamento pré-natal

O período de acasalamento foi de aproximadamente 3 dias. Após, os machos foram retirados das caixas, permanecendo somente as fêmeas. As ratas gestantes foram suplementadas com AG ômega-3 ou água (controle), uma vez por dia, durante o período gestacional ( $\pm 21$  dias). A dose de ômega-3 administrada foi de 0,8 g/kg de peso corporal (Ozyurt et al., 2007), administrada por via orogástrica. Após o nascimento dos filhotes, as ratas não foram mais suplementadas. Ratos infantis (7 dias de idade) receberam duas administrações diárias de um *pool* de AACR (15,8  $\mu\text{L/g}$  de peso corporal) com intervalo de 12 horas entre as administrações, por via subcutânea no período de 21 dias (crônico) (Bridi et al., 2006). Os animais foram tratados até o 28º dia de vida. Doze horas após a última administração do *pool* de AACR, os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina e sem anestesia e as estruturas cerebrais hipocampo, estriado e córtex foram removidas e homogeneizadas em tampão PBS para realização do ensaio cometa (Figura 3).

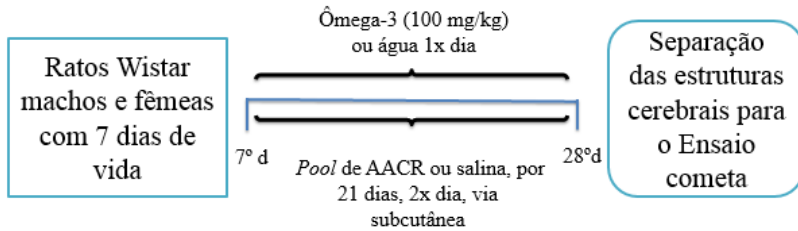


**Figura 3. Esquema de suplementação materna com ômega-3 em ratas gestantes e indução do modelo da doença da urina do xarope do bordo (DXB) na prole.** Ratas gestantes (n=3 animais por grupo) receberam ômega-3 ou água por gavagem durante o período gestacional (1). Em (2) administração subcutânea do *pool* de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) (7º ao 28º dia de vida) para indução de DXB na prole cujas mães foram tratadas com ômega-3 durante o período gestacional (n= 6 animais por grupo).

### 3.3.2 Tratamento pós-natal

Ratas grávidas não receberam nenhum tipo de tratamento durante o período gestacional. Após o nascimento da prole, os animais foram divididos em três grupos: 1) controle (salina), 2) DXB e 3) DXB + ômega-3. Ratos infantis (7 dias de idade) receberam duas administrações diárias de um *pool* de AACR (15,8  $\mu\text{L/g}$  de peso corporal), com intervalo de 12 horas entre as administrações, por via subcutânea no período de 21 dias (crônico) (Bridi et al., 2006) e foram tratados com ômega-3 (100 mg/kg de peso corporal) por via orogástrica, uma vez por dia, por 21 dias (El-Ansary et al., 2011). Os animais do grupo controle receberam o mesmo protocolo de tratamento, porém foram administradas solução salina por via subcutânea e água por via orogástrica.

Os animais foram tratados até o 28º dia de vida e doze horas após a última administração do *pool* de AACR os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina e sem anestesia e as estruturas cerebrais hipocampo, estriado e córtex foram removidas e homogeneizadas em tampão PBS para realização do ensaio cometa (Figura 4).



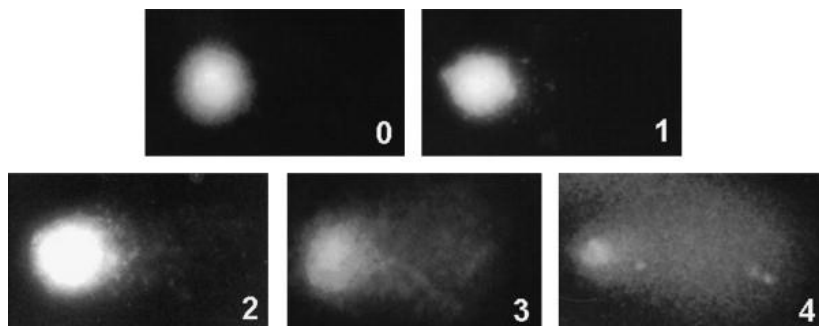
**Figura 4. Esquema de indução do modelo da doença da urina do xarope do bordo (DXB) em ratos infantis e tratamento pós-natal com ômega-3.** A figura mostra a administração do *pool* de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) para indução de DXB ou salina (controle) por 21 dias (7º ao 28º dia) em ratos Wistar e tratamento com ômega-3 ou água por via orogástrica também por 21 dias (n= 6 animais por grupo).

### 3.4 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa alcalino foi realizado como descrito por Singh et al. (1988) com as modificações sugeridas por Tice et al. (2000). Amostras de 5  $\mu\text{L}$  de homogeneizado de hipocampo, estriado ou córtex cerebral, em tampão PBS foram embebidos em 95  $\mu\text{L}$  de agarose *Low Melting Point* 0,75 % e adicionado a uma lâmina de microscópio (duas lâminas por amostra) que foi pré-revestida com 300  $\mu\text{L}$  de agarose normal (1,5 %). Quando a agarose estava solidificada, as lâminas foram colocadas em tampão de lise [2,5 M de NaCl, 100 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 10 mM Tris, pH 10,0-10,5] com adição a fresco de solução contendo 1 % (v/v) de Triton X-100 e 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) a 4 °C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 2 semanas. Após o tratamento com tampão de lise para permitir o desenovelamento do DNA, as lâminas foram incubadas em eletroforese alcalina (300 mM de NaOH e 1 mM EDTA, pH>13) por 20 minutos. O DNA foi, em seguida, submetido à eletroforese durante 20 minutos a 25 V (0,90 V/cm) e 300 mA. Cada passo foi realizado sob luz amarela indireta. Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas três vezes em tampão de neutralização (0,4 M de Tris, pH 7,5) durante 5 minutos, enxaguadas três vezes em água destilada e colocadas para secar durante a noite à temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com 50  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), e as imagens de 100 células de cada animal selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas duplicadas) foram analisadas cegamente utilizando um microscópio de

fluorescência, equipado com um filtro de excitação de BP546/12 nm e um filtro barreira de 590 nm.

A extensão do dano ao DNA foi avaliada utilizando o método de classificação visual de Collins (2004). As células foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho e forma da cauda (não danificadas de 0 a um dano máximo = 4), e um valor (índice de danos) foi atribuído a cada cometa de acordo com sua classe (Figura 5). Assim, o índice de dano variou de 0 (completamente intacta: 100 células  $\times$  0) para 400 (com dano máximo: 100 células  $\times$  4). O cálculo da frequência de danos (%) para cada amostra foi feito com base no número de células com cauda *versus* o número de células sem cauda, sendo expresso em porcentagem de danos das células (0-100 %). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. De acordo com Collins (2004) e Tice et al. (2000), o dano celular causado por apoptose e/ou necrose pode não ser evidenciado pela técnica do teste cometa. Desta forma, as células que não apresentaram o formato requerido para classificação do ensaio cometa foram excluídas das lâminas analisadas para evitar possíveis erros de interpretação.



**Figura 5. Classificação das células pelo ensaio cometa.** As células sem danos são classificadas como 0 (sem cauda cometa) e as com dano máximo ao DNA (máximo comprimento da cauda cometa) são classificadas como 4. Adaptado de Heuser et al., 2007.

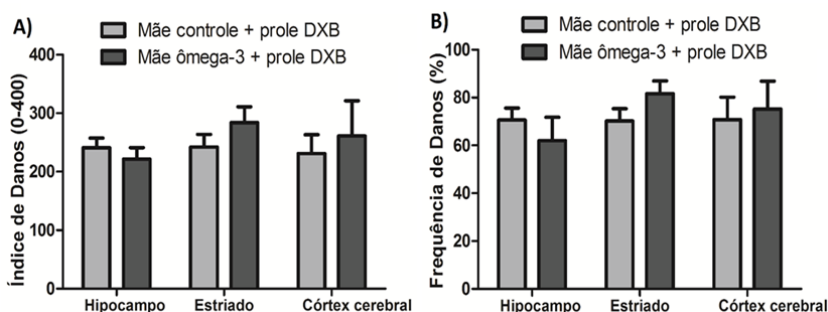
### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. Os ensaios foram realizados em duplicata, e foram utilizadas as médias para as análises estatísticas. O teste *t* de Student para amostras

independentes foi utilizado para comparações entre duas médias. Para comparações entre três médias foi utilizada análise de variância de uma via (ANOVA) seguida por teste *post-hoc* de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor de  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas em um PC compatível com computador IBM utilizando o programa estatístico aplicado as ciências sociais (SPSS) versão 20.0.

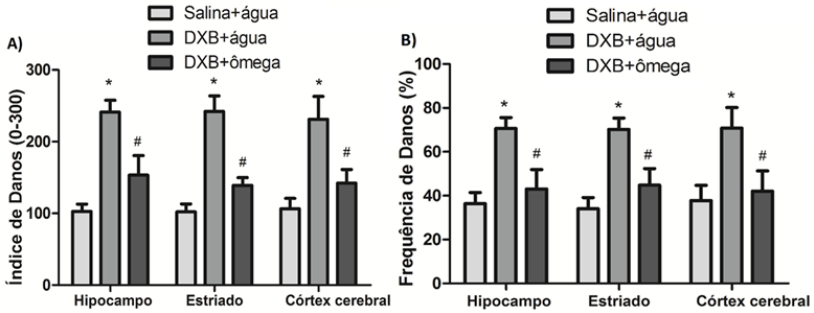
## 4 RESULTADOS

Inicialmente foram investigados os efeitos do tratamento com ômega-3 em ratos cujas mães receberam suplementação com ômega-3 durante o período pré-natal e em ratos que receberam tratamento com ômega-3 após o nascimento (pós-natal) sobre o possível efeito genotóxico ao DNA causado pelos AACR. Os resultados mostram que a suplementação com ômega-3 durante a gestação (pré-natal) não preveniu o aumento do ID e da FD ao DNA em hipocampo, estriado e córtex cerebral da prole de ratos com DXB (Figuras 6A e 6B).



**Figura 6. Efeito da suplementação materna com ômega-3 durante o período gestacional (pré-natal) sobre o dano ao DNA em estruturas cerebrais da prole com doença da urina do xarope do bordo (DXB).** O gráfico mostra em (A) o índice de danos ao DNA (ID) e em (B) a frequência de danos ao DNA (FD) em hipocampo, estriado e córtex cerebral da prole de ratos submetida a um modelo experimental de DXB. Os dados foram analisados por teste *t* de Student para amostras independentes e são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=6$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Este estudo também mostrou que a administração crônica de AACR (grupo DXB) causou aumento do ID e na FD ao DNA em hipocampo, estriado e córtex cerebral. Foi verificado também que o grupo DXB que recebeu tratamento com ômega-3 (DXB + ômega) após o nascimento apresentou diminuição do ID e da FD nas três estruturas cerebrais estudadas (Figuras 7A e 7B).



**Figura 7. Efeito do tratamento pós-natal com ômega-3 sobre o dano ao DNA em estruturas cerebrais de ratos submetidos a um modelo experimental da doença da urina do xarope do bordo (DXB).** O gráfico mostra em (A) o índice de danos ao DNA (ID) e em (B) a frequência de danos ao DNA (FD) em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey e expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (n=6). \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DXB.



## 5 DISCUSSÃO

A DXB é uma doença cujos pacientes podem apresentar, além de outros sintomas, grave prejuízo ao SNC (Chuang e Shih, 2001). Embora os mecanismos subjacentes ao dano cerebral ainda sejam pouco esclarecidos, a leucina e o CIC são apontados como os metabólitos mais tóxicos na DXB e o aumento de suas concentrações plasmáticas parece estar associado com o surgimento de sintomas neurológicos (Snyderman et al., 1964; Chuang e Shih, 2001).

Neste estudo um grupo de ratas grávidas recebeu administrações de AG ômega-3 durante o período gestacional e sua prole foi submetida a um modelo experimental de DXB. Outro grupo de animais infantes recebeu administrações de AG ômega-3 após o nascimento (pós-natal). Estes dois protocolos de tratamento foram aplicados para avaliar se os AG ômega-3 minimizariam ou impediriam as alterações causadas pelos AACR ao DNA em estruturas cerebrais dos filhotes submetidos a um modelo experimental de DXB. Verificou-se que a suplementação materna com ômega-3 durante o período pré-natal não impediu a ocorrência do dano ao DNA nas estruturas cerebrais hipocampo, estriado e córtex cerebral da prole de ratos submetida ao modelo de DXB quimicamente induzido. Esses resultados divergem dos resultados encontrados por Sable et al. (2012), em que os autores sugerem que a suplementação materna com AG ômega-3 aliada a uma dieta pobre em micronutrientes, como a cobalamina (vitamina B12) e o ácido fólico, durante a gravidez e aleitamento protege os níveis das neurotrofinas fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento do nervo (NGF) na prole de ratos. Rathod et al. (2014) mostraram que a prole de ratos cujas mães receberam suplementação durante a gestação e lactação com vitamina B12 e ômega-3 obtiveram melhora nos níveis de DHA e de BDNF no cérebro, com melhora no desempenho cognitivo devido à neuroplasticidade apresentada.

Muitos autores têm destacado a importância da suplementação com AG ômega-3, principalmente com DHA, durante o período gestacional, já que este AG é rapidamente acumulado pelo feto nos três últimos meses de gestação (Clandinin, 1980a). Estudos *pós-mortem* mostraram que o feto acumula aproximadamente 70 mg/dia de DHA, durante o último trimestre da gravidez (Clandinin, 1980b). A ingestão materna de AG ômega-3, bem como as concentrações circulantes de DHA, são fatores determinantes para as concentrações deste AG no sangue fetal (Innis e Friesen, 2008). Assim, toda a quantidade de AG

ômega-3 acumulada pelo feto antes do nascimento é proveniente da circulação materna por meio da transferência placentária. Após o nascimento o aporte de AG ômega-3 se faz através do leite materno, desde que a amamentação seja exclusiva (Innis, 2003). A suplementação com ômega-3 durante a gravidez e lactação também previne parto prematuro, e traz efeitos benéficos no desenvolvimento visual e cognitivo do feto (Helland et al., 2003; Helland et al., 2006; Koletzko et al., 2007; Poniedzialek-Czajkowska, 2014). Também há evidências de que a suplementação com DHA pode reduzir o risco de morte perinatal e convulsões em recém-nascidos (Zhou et al., 2012).

Grande parte dos estudos sobre suplementação materna com AG ômega-3 relatam seus benefícios sobre os filhos, sugerindo um efeito protetor sobre o SNC (Sable et al., 2012; Rathod et al., 2014). Embora os resultados do presente estudo não tenham corroborado essa afirmativa, vão ao encontro dos resultados obtidos em um estudo que avaliou o desenvolvimento neurológico após a suplementação com DHA em crianças pré-maturas e em neonatos nascidos a termo. Este estudo demonstrou que a suplementação extraútero com DHA, em níveis semelhantes aos acumulados no útero, foi mais eficaz na melhoria do desenvolvimento neurológico das crianças pré-maturas quando comparada às crianças que receberam suplementação de DHA intraútero (mães receberam 800 mg/kg de DHA) a partir do segundo trimestre da gestação (Makrides, 2013).

Em outro estudo foram avaliados os efeitos da suplementação materna com ômega-3 durante a gestação e a lactação, sobre o perfil lipídico das mães e dos filhos, e sobre o desenvolvimento visual e cognitivo dos filhos. Embora este estudo tenha demonstrado que a suplementação com ômega-3 melhorou o teor de AG em ambos, melhorando assim o perfil lipídico, esta suplementação não mostrou efeitos sobre os desenvolvimentos psicomotor e cognitivo dos filhos até os 12 meses de idade (Hurtado et al., 2015).

É importante ressaltar que lesões ao DNA celular podem ser causadas por instabilidade genômica decorrente de processos inflamatórios crônicos (Niwa et al., 2010; Ohnishi et al., 2013; Kidane et al., 2014) e por dietas com desequilíbrio em nutrientes (Kvitko et al., 2012). Neste contexto, a utilização do ômega-3 na gestação, período em que pode ocorrer deficiência de micronutrientes (Sable et al., 2012; Rathod et al., 2014) mostrou resultados positivos, principalmente no que diz respeito às neurotrofinas. Considerando-se que a maior parte dos estudos encontrados na literatura mostram efeitos benéficos da

suplementação materna com ômega-3 sobre a prole, sugere-se que o modelo proposto no presente estudo não obteve resultados benéficos devido a limitações, como o fato de que os filhotes não receberam um aporte adequado de ômega-3 pela lactação, pois as ratas foram tratadas somente durante o período gestacional. Adicionalmente, a baixa disponibilidade de DHA não preveniu o dano causado ao DNA celular pelos AACR acumulados na DXB.

Os AG ômega-3 EPA e DHA são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normais (Innis 1991; Sellmayer e Koletzko, 1999), bem como para manter a estrutura e a função do SNC e da retina (Neuringer et al., 1988). Está bem estabelecido que o DHA e o AA são acrescidos ao cérebro durante o desenvolvimento (Hadders-Algra, 2010) e que atuam como importantes moduladores na função da membrana, na neurogênese e na neurotransmissão. Tais efeitos benéficos ocorrem devido a capacidade que estes AG possuem em atravessar a BHE (Innis, 2007; Guest et al., 2013).

Em relação à administração de ômega-3 no período pós-natal, os resultados do presente estudo mostraram que os AACR aumentaram significativamente a ID e o FD ao DNA em hipocampo, estriado e córtex cerebral da prole de ratos, observado pelo ensaio cometa, sugerindo que o acúmulo destes metabólitos na DXB causa dano ao DNA. Scaini et al. (2012b), utilizando o mesmo modelo animal de DXB do presente estudo, demonstraram que a administração aguda de AACR em ratos de 10 dias de idade causou dano ao DNA em hipocampo. Por outro lado, a administração crônica de AACR em ratos causou dano ao DNA em hipocampo e estriado, e a administração de antioxidantes NAC e DFX preveniu tais danos. Mescka et al. (2014), em um estudo *in vitro* utilizando plasma de pacientes com DXB, mostraram que houve dano ao DNA em todas as concentrações de leucina e CIC (100, 250, 500, 1000, 2500 e 3000  $\mu\text{M}$ ) testadas. Neste mesmo estudo foi demonstrado que concentrações de L-carnitina acima de 90  $\mu\text{M}$  e 120  $\mu\text{M}$  reduziram o dano ao DNA. Recentemente, os mesmos autores mostraram a presença de dano ao DNA em amostras de sangue de pacientes com DXB que estão sob tratamento de restrição proteica, e que a suplementação de L-carnitina nestes pacientes por um período de até dois meses reverte tal dano (Mescka et al., 2015a).

Corroborando os achados acima descritos, no presente estudo verificou-se que o tratamento com ômega-3 após o nascimento em ratos submetidos a um modelo de DXB induzido quimicamente impediu o dano causado pelos AACR envolvidos nesta doença nas três estruturas

cerebrais estudadas. Este suposto efeito neuroprotetor pode ser atribuído ao fato dos AG ômega-3 EPA e DHA possivelmente apresentarem ação antioxidante (Huxley e Neil, 2003; Wu et al., 2004; Bazan, 2005). Os antioxidantes são substâncias que, em baixas concentrações, impedem ou evitam a oxidação de um determinado substrato oxidável (Halliwell e Gutteridge, 1995). Neste contexto, El-Ansary et al. (2011) demonstrou que ratos jovens submetidos à modelo de toxicidade por ácido propiônico apresentaram múltiplas alterações cerebrais avaliadas pela depleção dos neurotransmissores ácido gama-aminobutírico (GABA), serotonina (5HT) e dopamina (DA) e que o tratamento com ômega-3 (100 mg/kg) re-estabeleceu os níveis destes neurotransmissores.

Recentemente, foi demonstrado, em modelo animal de convulsão induzido por pentilenotetrazol (PTZ), que as administrações única e combinada do anticonvulsivante levetiracetam (LEV; 30mg/kg i.p) e ômega-3 (200 mg/kg i.p) reduziram o déficit cognitivo causado por inflamação e diminuiu dano oxidativo e dano ao DNA em hipocampo de ratos jovens. Também foi observado que a combinação do ômega-3 com o LEV foi mais eficaz no controle das crises convulsivas, quando comparado à administração do LEV sozinho (Abdel-Wahab et al., 2015).

O mecanismo pelo qual o ômega-3 apresenta propriedades antioxidantes ainda não está bem estabelecido, mas uma possível explicação para este efeito seria a presença da neuroprotectina D1, um mediador endógeno derivado do DHA, sintetizado pelo cérebro e pelas células epiteliais de pigmento da retina. Ela atua como um mediador de vias de sinalização responsável por promover sobrevivência celular, por impedir a ativação da via apoptótica sob condições de estresse oxidativo, e diminuir a ativação da caspase-3 efetora e a degradação do DNA (Bazan, 2005; Lukiv et al., 2005). Wu et al. (2004) sugerem que a dieta com ômega-3 (principalmente o DHA) pode atuar diminuindo a geração de espécies reativas, reduzindo o prejuízo cognitivo após a lesão cerebral traumática, ajudando o cérebro a preservar a fluidez e integridade das membranas celulares e promovendo a plasticidade sináptica.

As células eucarióticas respondem à danos causados ao DNA através de proteínas cinases transdutoras e efetoras, que atuam como sensores de ponto de verificação, gerando sistemas de reparo (Nakanishi et al., 2009). Porém, o dano oxidativo ao DNA pode ser causado por exposições químicas ou biológicas crônicas, mesmo que em baixas doses, capazes de gerar aumento nos níveis de espécies reativas e dificultar os sistemas de reparo do DNA (Powell et al., 2005). Muitos autores relatam o envolvimento do estresse oxidativo na DXB, no qual foram observadas

redução na atividade de enzimas antioxidantes e aumento na produção de espécies reativas com consequente dano oxidativo em lipídeos, proteínas e DNA (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005; Barchask et al., 2006; Mescka et al., 2011; Scaini et al., 2012b; Mescka et al., 2014; Mescka et al., 2015a). Desta forma, pode-se considerar a hipótese de que a administração crônica de AACR no modelo animal utilizado no presente estudo causou aumento na formação de espécies reativas, que pode ser considerada uma forma de agressão ao DNA celular. Também pode-se considerar que o tratamento com ômega-3 foi eficaz devido à sua possível ação antioxidante, visto que impediu a progressão dos danos causados ao DNA pelos metabólitos tóxicos da DXB.

Sabe-se que os AG ômega-3 DHA e EPA diminuem o dano oxidativo, mas o mecanismo pelo qual este efeito acontece ainda não está totalmente descrito. Acredita-se que os AG ômega-3 possam melhorar a atividade das enzimas antioxidantes GPx e SOD, além de aumentar o poder antioxidante de redução do ferro e reduzir as concentrações séricas de malondialdeído, um produto final da lipoperoxidação (Tayyebi-Khosroshahi et al., 2010). Deficiência de AG ômega-3, principalmente DHA, são observadas em pacientes com EIM (Giovannini et al, 1995), assim como o envolvimento do estresse oxidativo nestas doenças (Colome et al., 2000; Wajner et al., 2004; Sitta et al., 2011) que são apontados como um dos mecanismos envolvidos com o surgimento dos sintomas neurológicos. Se analisados em conjunto, estes achados reforçam a importância de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da DXB e da necessidade de mais estudos acerca do papel antioxidante do ômega-3.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que a suplementação materna com AG ômega-3 no período pré-natal não preveniu ou impediu o dano ao DNA nas estruturas cerebrais da prole com DXB. Por outro lado, o tratamento pós-natal com AG ômega-3 na prole de ratos com DXB impediu o dano ao DNA nas estruturas cerebrais. Com base nestes resultados, sugere-se que o ômega-3 apresentou efeito neuroprotetor devido a sua possível ação antioxidante, e por isso acredita-se que ele possa ser utilizado como uma terapia adjuvante ao tratamento utilizado na DXB, visto que os pacientes possuem acúmulo de metabólitos nos tecidos e fluidos corporais capazes de oxidar as biomoléculas.

## REFERÊNCIAS

- Abdel-Wahab BA, Shaikh IA, Khateeb MM, Habeeb SM. Omega-3 polyunsaturated fatty acids enhance the protective effect of levetiracetam against seizures, cognitive impairment and hippocampal oxidative DNA damage in young kindled rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015; 135:105-13.
- Amaral AU, Leipnitz G, Fernandes CG, Seminotti B, Schuck PF, Wajner M. Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Res.* 2010; 1324: 75-84.
- Araújo P, Wassermann GF, Tallini K, Furlanetto V, Vargas CR, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M. Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem Int.* 2001; 38 (6):529-537.
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, Olivera 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; 21:279-86.
- Bazan NG. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol.* 2005; 15:159-166.
- Bickel H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme* 1987; 38(1-4):14-26.
- Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- 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.

Calder PC. *N-3 Polyunsaturated fatty acids and immune cell function.* *Adv Enzyme Regul.* 1997; 37:197-237.

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.

Chuang DT, Shih VE. Maple syrup urine diaseze (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver, CR, Beaudt AL, Sly WL, Valle D, editores. *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* 8 ed. New York: Mc Graw-Hill; 2001.

Clandinin MT, Chappell JE, Leong S, Heim T, Swyer PR, Chance GW. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early Hum Dev.* 1980a; 412: 121-129.

Clandinin MT, Chappell JE, Leong S, Heim T, Swyer PR, Chance GW. Extrauterine fatty acid accretion in infant brain: implications for fatty acid requirements. *Early Hum Dev.* 1980b; 412: 131-138.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004; 26:249-61.

Colome C, Sierra C, Vilaseca MA. Congenital errors of metabolism: Cause of oxidative stress? *Med Clin.* 2000; 115(3):111-7.

Dancis J, Hutzler J, Levitz M. Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine disease. *Biochim Biophys Acta.* 1960; 23:342-3.

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.* 6 ed. New York: McGraw-Hill; 1989. p. 671-692.

Danner DJ, Lemmon SK, Besharse JC, Elsas LJ. Purification and characterization of branched chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1979; 254 (12):5522-6.

Decsi T, Molnár D, Koletzko B. The effect of under and over nutrition on essential fatty acid metabolism in childhood. *Eur J Clin Nutr.* 1998; 52:541-8.

Dodd PR, Williams SH, Gundlach AL, Harper PA, Healy PJ, Dennis JA, Johnston GA. Glutamate and  $\gamma$ -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.

Duda MK, O'Shea KM, Lei B, Barrows BR, Azimzadeh AM, McElfresh TE, Hoit BD, Kop WJ, Stanley WC. Dietary supplementation with omega-3 PUFA increases adiponectin and attenuates ventricular



- remodeling and dysfunction with pressure overload. *Cardiovasc Res.* 2007; 76(2):303-10.
- 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(1):37-44.
- El-Ansary AK, Al-Daihan SK, El-Gezeery AR. On the protective effect of omega-3 against propionic acid-induced neurotoxicity in rat pups. *Lipids Health Dis.* 2011; 10:142.
- Fleith M, Clandinin MT. Dietary PUFA for preterm and term infants: review of clinical studies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005; 45:205-29.
- Fontella FU, Gassen E, Pulrolni V, Wannmacher CMD, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 2002; 17:47-54.
- 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.
- Gibson GE, Blass JP. Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohydrate utilization by maple syrup urine disease metabolites. *J Neurochem.* 1976; 26:1073-8.
- Giovannini M, Biasucci G, Agostoni C, Luotti D, Riva E. Lipid status and fatty acid metabolism in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 1995; 18:265-72.
- Gontijo AMMC. Teste de cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra; 2003. p. 247-71.
- Guest J, Garg M, Bilgin A, Grant R. Relationship between central and peripheral fatty acids in humans. *Lipids Health Dis.* 2013; 12:79.

- Hadders-Algra M. Effect of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on neurodevelopmental outcome in full-term infants. *Nutrients*. 2010; 2(8):790-804.
- Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 2001; 18 (9): 685-716.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4 ed. New York: Oxford University Press Inc; 2007. 704 p.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biol Med*. 1995; 18: 125-126.
- Helland IB, Saugstad OD, Saarem K, Van Houwelingen AC, Nylander G, Drevon CA. Supplementation of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation reduces maternal plasma lipid levels and provides DHA to the infants. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2006;19 (7):397-406.
- Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics*. 2003; 111: 39-44.
- Heuser VD, Erdtmann B, Kvitko K, Rohr P, Silva J. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology*. 2007; 232:235-247.
- Holub BJ. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *CMAJ*. 2002; 166(5):608-15.
- Huang Y, Zielke HR, Tildon JT, Zielke CL, Baab PJ. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: leucine infusion. *Dev Neurosci*. 1996; 18 (5-6):415-9.
- Hurtado JA, Iznola C, Peña M, Ruíz J, Peña-Quintana L, Kajarabille N, Rodriguez-Santana Y, Sanjurjo P, Aldámiz-Echevarría L, Ochoa J, Lara-Villoslada F. Effects of maternal  $\Omega$ -3 supplementation on fatty acids and on visual and cognitive development. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015; 61(4):472-80.
- Huxley RR, Neil HA. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr*. 2003; 57(8):904-8.
- Infante JP, Huszagh VA. Secondary carnitine deficiency and impaired docosahexaenoic (22: 6n-3) acid synthesis: a common denominator in the pathophysiology of diseases of oxidative phosphorylation and beta-oxidation. *FEBS Lett*. 2000; 468:1-5.

- Innis SM. Essential fatty acids in growth and development. *Prog Lipid Res.* 1991; 30:39-103.
- Innis SM. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr.* 2003; 143(4 Suppl):S1-8.
- Innis SM, Friesen RW. Essential n-3 fatty acids in pregnant women and early visual acuity maturation in term infants. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87: 548-557.
- Jimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D. The effect of mendelian disease on human health. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: MCGraw-Hill Inc. 2001. p.167-174.
- Jouvet P, Jugie M, Rabier D, Desgres J, Hubert P, Saudubray JM, Man NK. Combined nutritional support and continuous extracorporeal removal therapy in a severe acute phase of maple syrup urine disease. *Intensive Care Med.* 2001; 27: 1798-1806.
- 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.
- 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.
- Kidane D, Chae WJ, Czocho J, Eckert KA, Glazer PM, Bothwell ALM, Sweasy JB. Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014; 49(2): 116–139.
- Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res.* 2001; 488:65-76.
- Koletzko B, Larqué E, Demmelmair H. Placental transfer of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA). *J Perinat Med.* 2007; 35(1 Suppl):S5-S11.
- Kvitko K, Bandinelli E, Henriques JAP, Heuser VD, Rohr P, Silva FR, Schneider NB, Fernandes S, Ancines C, Silva J. Susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides, to tannery chemicals and to coal dust during mining. *Genet Mol Biol.* 2012; 35(4 Suppl):1060-1068.

- Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Rev Food Sci Saf.* 2004; 3(1):21-33.
- 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.
- Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, et al. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotection D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2005; 115:2774-83.
- Makrides M. DHA supplementation during the perinatal period and neurodevelopment: do some babies benefit more than others? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013; 88: 87-90.
- Martin CA, Almeida, VV, Ruiz MR, Visentainer JEL, Matshushita M, Souza, NE, Visentainer JV. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev Nutr.* 2006; 19(6):761-70.
- Menkes JH. Maple syrup urine disease: Isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics.* 1959; 23:348-53.
- Menkes JH, Hurst PL, Craig JM. A new syndrome: Progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics.* 1954; 14(5):462.
- Mescka CP, Guerreiro G, Donida B, Marchetti D, Wayhs CAY, Ribas GS, Coitinho AS, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas CR. Investigation of inflammatory profile in MSUD patients: benefit of L-carnitine supplementation, *Metab Brain Dis.* 2015b; 30(5):1167-74.
- Mescka CP, Guerreiro G, Hammerschmidt T, Faverzani J, Coelho DM, Manfredini V, Wayhs CAY, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas CR. L-Carnitine supplementation decreases DNA damage in treated MSUD patients. *Mutation Research.* 2015a; 775:43-47.
- Mescka CP, 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 CAY, Guerreiro G, Manfredini V, Dutra-Filho CS, Vargas CR.
- Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro. *Gene.* 2014; 548: 294-298.

- 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.
- Myers KA, Reeves M, Wei XC, Khan A. Cerebral edema in maple syrup urine disease despite newborn screening diagnosis and early initiation of treatment. *IMD Rep*. 2012; 3:103-106.
- Neuringer M, Anderson GJ, Connor WE. The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Annu Rev Nutr*. 1988; 8:517-41.
- Nakanishi M, Niida H, Murakami H, Shimada M. DNA damage responses in skin biology: Implications in tumor prevention and aging acceleration. *J Dermatol Sci*. 2009; 56:76-81.
- Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, et al. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res*. 2010; 70:1430-40.
- 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 Inher Metab Dis*. 1992; 15(5):827-33.
- Nodari S, Triggiani M, Campia U, Manerba A, Milesi G, Cesana BM, et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on left ventricular function and functional capacity in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57(7):870-9.
- Ohnishi S, Ma N, Thanan R, Pinlaor S, Hammam O, Murata M, Kawanishi S. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013:387014.
- Ozyurt B, Sarsilmaz M, Akpolat N, Ozyurt H, Akyol O, Herken H, Kus I. The protective effects of omega-3 fatty acids against MK-801-induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rat. *Neurochem Int*. 2007; 50:196-202.
- Pantener U, Kriegstein E, Poser W, Schönborn J, Hasselblatt A. Effects of L-leucine and alpha-ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS Letters*, 1972; 20(2):225-8.
- 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(6):652-60.
- Peinemann F, Danner DJ. Maple syrup urine disease 1954-1993. *J Inherit Metab Dis.* 1994; 17(1):3-15.
- Perini, JAL, Stevanato FB, Sargi SC, Visentainer JEL, Dalalio MMO, Matshushita M, Souza NE, Visentainer JV. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Rev. Nutr.* 2010; 23(6):1075-1086.
- 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 (5):675-9.
- Poniedziałek-Czajkowska E, Mierzyński R, Kimber-Trojnar Z, Leszczyńska-Gorzela B, Oleszczuk J. Polyunsaturated fatty acids in pregnancy and metabolic syndrome: A review. *Curr Pharm Biotechnol.* 2014; 15: 84-99.
- Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res.* 2011; 50(4):372-87.
- Powell CL, Swenberg JA, Rusyn I. Expression of base excision DNA repair genes as a biomarker of oxidative DNA damage. *Cancer Lett.* 2005; 229:1-11.
- Ramón DAL, Jáuregui IO. Enfermedad de jarabe de arce: una entidad rara que debemos recordar. A propósito de su manejo dietético. *An. Med. Interna (Madrid).* 2005; 22(10): 493-497.
- Rao KS. Mechanisms of disease: DNA repair defects and neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007; 3(3):162-72.
- Rathod R, Khaire A, Kemse N, Kale A, Joshi S. Maternal omega-3 fatty acid supplementation on vitamin B12 rich diet improves brain omega-3 fatty acids, neurotrophins and cognition in the Wistar rat offspring. *Brain Dev.* 2014; 36(10):853-63.
- 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(2):114-18.
- Ribeiro CA, Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Grando V, Schmidt AL, Ferreira GC, Perry L, 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; 33:114-24.
- Rosell NS, Lloyd-Wright Z, Appleby PN, Sanders TA, Allen NE, Key TJ. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in plasma in British meat eating, vegetarian, and vegan men. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82:327-34.
- Sable PS, Dangat D, Joshi A, Joshi SR. Maternal omega 3 fatty acid supplementation during pregnancy to a micronutrient-imbalanced diet protects postnatal reduction of brain neurotrophins in the rat offspring. *Neuroscience.* 2012; 217:46-55.
- Saudubray JM, Charpentier C. Clinical phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver, CR, Beaudt AL, Sly WL, Valle D, editores. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 7.ed. New York: MCGraw-Hill Inc; 1995. p. 1-173.
- Scaini G, de Rochi N, Jeremias IC, Deroza PF, Zugno AI, Pereira TC, Oliveira GM, Kist LW, Bogo MR, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. Evaluation of acetylcholinesterase in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol Neurobiol.* 2012a; 45:279-86.
- Scaini G, Jeremias IC, Morais MO, Borges GD, Munhoz BP, Leffa DD, Andrade VM, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. DNA damage in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab.* 2012b; 106(2):169-74.
- Scaini G, Morais MO, Galant LS, Vuolo F, Dall'Igna DM, Pasquali MA, Ramos VM, Gelain DP, Moreira JC, Schuck PF, Ferreira GC, Soriano FG, Dal-Pizzol F, Streck EL. Coadministration of branched-chain amino acids and lipopolysaccharide causes matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown. *Mol Neurobiol.* 2014; 50:358-367.
- Schadewaldt PL, Wendel U. Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr.* 1997; 156(1):S62-S66.
- 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 Gen Metab.* 2004; 82(1):69-75.
- Schuchardt JP, Huss M, Stauss-Grabo M, Hahn A. Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *Eur J Pediatr.* 2010; 169:149-64.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8.ed. New York: MCGraw-Hill Inc; 2001.

- Sellmayer A, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in infants- physiological and pathophysiological aspects and open questions. *Lipids*. 1999; 34:199-205.
- Serra JD, S anches FA, Visus FSV. Enfermidades de orina de jarabe arce. In Sanjurjo P, Baldellou A, editores. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditárias. 3 ed. Madri: Eddiciones Ergon; 2010. 1303 p.
- 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(3):232-8.
- Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance; 2003.
- Silva DRB, Miranda J nior PF, Soares EA. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gesta o e lacta o. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant*. 2007; 7(2):123-133.
- Simon E, Fingerhut R, Baumk tter J, Konstantopoulou V, Ratschmann R, Wendel U. Maple syrup urine disease: favourable effect of early diagnosis by newborn screening on the neonatal course of the disease. *J Inherit Metab Dis*. 2006; 29:532-7.
- Simone R, Vissicchio, F, Mingarelli C, Nuccio C, Visentin S, Ajmone-Cat MA, Minghetti L. Branched-chain amino acids influence the immune properties of microglial cells and their responsiveness to pro-inflammatory signals. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1832:650-9.
- Simopoulos A, Leaf A, Salem N. Essentiality and recommended dietary intakes of omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann Nutr Metab*. 1999; 43: 127-30.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*. 1988; 175:184-191.
- Sitta A, Manfredini V, Biasi L, Trem a R, Schwartz IV, Wajner M, Vargas CR. Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutat. Res*. 2009; 679:13-6.
- Sitta a, Vanzin CS, Biancini GB, Manfredini V, de Oliveira AB, Wayhs CA, Ribas GO, Giugliani L, Schwartz IV, Bohrer D, Garcia SC, Wajner M, Vargas CR. Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol*. 2011; 31(3): 429-36.



- Snyderman SE, Norton PM, Roitman E. Maple Syrup Urine Disease with particular reference to diet therapy. *Pediatrics*. 1964; 34:452-472.
- Souza, C FM, Schuwartz IV, Giugliani R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciência & 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*. 2006; 6:557-564.
- 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.
- 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; 181:44-9.
- Tayyebi-Khosroshahi H, Houshyar J, Tabrizi A, Vatankhah AM, Razzagi ZN, Dehghan-Hesari R. Effect of omega-3 fatty acid on oxidative stress in patients on hemodialysis. *Iran J Kidney Dis*. 2010; 4:322-326.
- Teitelbaum JE, Walker WA. Review: The role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation *J Nutr Biochem*. 2001; 12(1):21-32.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamori Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and an in vivo genetic toxicological testing. *Environ. Mol Mutagen*. 2000; 35:206-21.
- Tom A, Nair KS. Assessment of branched-chain amino acid status and potential for biomarkers. *J. Nutr*. 2006; 136 (1 Suppl):324S-330S.
- Treacy E, Clow CL, Reade TR, Chitayat D, Mamer OA, Scriver CR. Maple syrup urine disease: interrelations between branched-chain amino-oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS demyelination. *J Inheret Metab Dis*. 1992; 15(1):121-35.
- Vlaardingerbroek H, Hornstra G, de Koning TJ, Smeitink JA, Bakker HD, de Klerk HB, Rubio-Gozalbo ME. Essential polyunsaturated fatty acids in plasma and erythrocytes of children with inborn errors of amino acid metabolism. *Mol Genet Metab*. 2006; 88:159-65.

- Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inher Metab Dis*. 2004; 27:427-48.
- Westall RG, Dancis J, Miller S. Maple syrup urine disease. *AM J Dis Child*. 1957; 94:571-2.
- Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 2004; 21(10):1457-1467.
- Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Neuroscience*. 2008; 155:751-9.
- Yeaman SJ. The mammalian 2-oxo acid dehydrogenases: a complex family. *Trends Biochem Sci*. 1986; 11:293-6.
- 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(5005): 83-4.
- 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; 22:1159-64.
- 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; 18:420-5.
- Zhou SJ, Yelland L, McPhee AJ, Quinlivan J, Gibson RA, Makrides M. Fish-oil supplementation in pregnancy does not reduce the risk of gestational diabetes or preeclampsia. *Am J Clin Nutr*. 2012; 95(6):1378-84.

**ANEXO**

## ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



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

### Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

**Protocolo: 029-2014-02**

**Professor responsável:** Emilio Luiz Streck

**Equipe:** Meline Oliveira dos Santos Morais, Milena Carvalho Silva, Lara Mezari Gomes.

**Título:** “Avaliação da suplementação materna com ácidos graxos ômega-3 sobre parâmetros de estresse oxidativo e inflamação na prole submetida a um modelo animal de doença da urina do xarope do bordo”.

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 70 Ratos Wistar, com 7 e 60 dias, pesando de 15 a 300 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).*

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

**Protocol number: 029-2014-02**

**Principal Investigator:** Emilio Luiz Streck

**Researchers:** Meline Oliveira dos Santos Morais, Milena Carvalho Silva, Lara Mezari Gomes.

**Project title:** “Evaluation of maternal supplementation with omega-3 fatty acids on oxidative stress parameters and inflammation in offspring subjected to an animal model of maple syrup urine disease”.

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

Criciúma, 27 de agosto de 2014.

VILSON HEIZEN CARDOSO  
Coordenador Adjunto da CEUA