

MIRIAM SALETE WILK WISNIEWSKI

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO
INTRACEREBROVENTRICULAR DO ÁCIDO α -
CETOISOCAPROICO SOBRE PARÂMETROS
NEUROQUÍMICOS EM RATOS JOVENS**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade do
Extremo Sul Catarinense para obtenção
do título de Doutora em Ciências da
Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz
Streck

**Criciúma
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

W815e Wisniewski, Miriam Salete Wilk.

Efeito da administração intracerebroventricular do ácido α -cetoisocaproico sobre parâmetros neuroquímicos em ratos jovens / Miriam Salete Wilk Wisniewskic ; orientador : Emílio Luiz Streck. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2015.

113 p. : il. ; 21 cm.

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

1. Ácido α -cetoisocaproico. 2. Metabólitos. 3. Dano ao DNA. 4. Estresse oxidativo. 5. Fatores de crescimento neural. 6. Doença da urina do xarope do bordo I. Título.

CDD 22. ed. 612.39



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

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


PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata MIRIAM SALETE WILK WISNIEWSKI sob o título “Efeitos da administração intracerebrovascular do ácido alfa-cetoisocaproico sobre parâmetros neuroquímicos em ratos jovens”, para obtenção do grau de DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros são de parecer pela “APROVAÇÃO” da Tese.

Criciúma, SC, 14 de dezembro de 2015.


Prof.ª Dr.ª PATRÍCIA FERNANDA SCHUCK
Membro Relator - UNESC


Prof.ª Dr.ª JOSIANE BUDNI
Membro Interno - UNESC


Prof. Dr. ALEXANDRE UMPIERREZ AMARAL
Membro Externo - UFRGS


Prof.ª Dr.ª JANAINA KOLLING
Membro Externo - UFRGS


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Orientador


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Bioenergética e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

*“De tudo, ao meu amor serei atento
Antes, e com tal zelo, e sempre, e tanto
Que mesmo em face do maior encanto
Dele se encante mais meu pensamento”
Vinícius de Moraes*

*Com amor à
Mariano e Antonina
Carlos e Audrey
Marco Antônio
Ao grande amor desta, passadas e novas vidas
Elvis!*

AGRADECIMENTOS

*Se as coisas são inatingíveis ... ora!
Não é motivo para não querê-las ...
Quê tristes os caminhos se não fora
A presença distante das estrelas!
Mário Quintana, 1951*

*Às estrelas maiores de minha vida, que em pequenos atos e
palavras de amor diário, traduzem o essencial da vida, o amor de um ao
outro!*

*- Dinda, Dindo!!! Vocês chegaalam!!! Como vocês demolalam hoje!!!!
Eu estava com saudades!!!!
Marco Antônio, aos 3 anos*

*Atos rotineiros, mas que fizeram muita diferença!
Uma lentilha para a chegada da viagem, a 1h da manhã!
Uma torta de coco, ou de limão, ou de amendoim sobre a mesa da
cozinha!
Um lanchinho no meio da tarde!
Uma oração, um desejo de boa viagem!
Um abraço apertado!
- Vem tomar um chimarrão comigo para descansar um pouco!!!
Audrey e Carlos
Antonina e Mariano
Carmen
Marco Antônio
Elvis*

*Às estrelas acadêmicas, que em uma ação decisiva,
concretizaram esta utopia.*

*Agradeço o apoio financeiro, físico, emocional
E a compreensão incondicional em cada momento particular desta
travessia!*

*Em consonância com Fernando Pessoa ... “Há um tempo em que
é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso
corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos
mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la,
teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”!*

Elisabete Maria Zanin

Paulo Roberto Giollo

Paulo José Sponchiado

*Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI
Erechim*

*Às estrelas viajantes, por compartilharem cansaços, fazendo-os
desaparecer;*

apreensões, fazendo-as minimizar;

ansiedades fazendo-as tranquilizar;

dificuldades teórico-técnicas, fazendo-as compreensíveis.

E acima de tudo, pela amizade e fortalecimento mútuo!!!

Fernanda Dal’Maso Camera

Janesca Mansur Guedes

Mari Sbardelotto

Irany Achilles Denti

Elvis Wisniewski

Márcia Bairros de Castro

Ana Lúcia Bernardo de Carvalho Morsch

Wolnei Luiz Amado Centenaro

*Às estrelas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde –
PPGCS*

Pelo saber compartilhado e caminhos apresentados

Meu reconhecimento à competência!!!

Minha gratidão ao colegiado do PPGCS!!!

Dr. Cláudio Teodoro de Souza e Dra. Vanessa Moraes de Andrade

Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC

*À grande estrela guia deste estudo, que em tempos passados encantou-se com a DXB e hoje integra a Rede DXB Nacional.
Agradeço humildemente por ter-me aceito como orientanda,
compreender-me em alguns momentos complexos e apresentar-me à
DXB. Como expressei certa vez,
“fiquei encantada com a fisiopatologia!”
Dr. Emilio Luiz Streck*

*À estrela Dra. Giselli Scaini, por aproximar Houston de Erechim!
Obrigada pela paciência! Pelas explicações!
Por me tranquilizar! Por revisar, reorientar, ajustar...
Meu reconhecimento a competência e exemplar caminhada científica!
Às estrelas Lara Mezari Gomes e Milena Carvalho Silva obrigada pelo
trabalho experimental compartilhado, o carinho na minha chegada ao
Laboratório e os bons momentos neste período!
Aos colegas Hugo Galvane Zapelini e Ândrea Cristina Ramos pela
colaboração no experimento!
À Meline Moraes, pela delicadeza em todos os momentos!*

*À estrela maior e mais brilhante!
Permita que a espiritualidade e fé estejam sempre comigo!*

*À todas estrelas,
em seus mais diferentes graus de proximidade,
Muito obrigada!*

A inspiração não é um privilégio exclusivo de poetas e artistas. Existe, existiu, existirá sempre um grupo de pessoas que são visitadas pela inspiração. Ela é composta por todos aqueles que escolheram conscientemente a sua vocação e fazem o seu trabalho com amor e imaginação... as dificuldades e contratempos nunca reprimem a sua curiosidade. Um enxame de novas questões emerge de cada problema que eles resolvem. O que quer que seja a inspiração, esta nasce de um contínuo “Eu não sei”.

Wisława Szymborska, 1996

RESUMO

A doença da urina do xarope do bordo (DXB) é um distúrbio neurometabólico de herança autossômica recessiva, causado por uma deficiência da atividade do complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada. Esta deficiência leva ao acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina, bem como de seus α -cetoácidos correspondentes em tecidos e líquidos corporais de pacientes. O acúmulo destes interfere no metabolismo astrocítico e neuronal, sendo que concentrações elevadas de leucina e do ácido α -cetoisocaproico (CIC) são consideradas particularmente tóxicas ao cérebro. Acredita-se que o CIC seja o mais tóxico dos cetoácidos, visto que esse inibiu o consumo de oxigênio cerebral, induziu estresse oxidativo, provocou deficiência na formação de mielina em cerebelo de ratos e está associado ao aparecimento de sintomas neurológicos. No entanto, até o momento, os mecanismos fisiopatológicos não estão completamente estabelecidos. Considerando que a viabilidade neuronal pode ser afetada pela redução dos fatores neurotróficos e pelo estresse oxidativo, o propósito deste estudo foi avaliar os efeitos neuroquímicos da administração intracerebroventricular (ICV) de CIC sobre estruturas cerebrais de ratos com 30 dias de vida. Analisaram-se os níveis proteicos do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), do pró-BDNF e do fator de crescimento neural (NGF). Também foram avaliados os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), proteínas carboniladas, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), bem como o dano ao DNA em hipocampo, estriado e córtex cerebral uma hora após a administração ICV de CIC. Os resultados demonstraram que a administração de CIC reduziu os níveis proteicos do BDNF em hipocampo, estriado e córtex cerebral, sem alterar os níveis proteicos de pró-BDNF. Adicionalmente os níveis proteicos de NGF mostraram-se reduzidos em hipocampo, observou-se aumento significativo da concentração do marcador de peroxidação lipídica TBA-RS, bem como da quantidade de proteínas carboniladas em todas as estruturas cerebrais estudadas. A enzima CAT teve sua atividade reduzida no estriado, enquanto que a atividade da SOD se mostrou aumentada em hipocampo e estriado dos animais que receberam CIC. Por fim, a administração ICV de CIC ocasionou aumento significativo do índice e da frequência de danos ao DNA em todas as estruturas estudadas. Em conclusão, esses resultados sugerem que o CIC causa um desequilíbrio nos níveis de neurotrofinas, bem como induz estresse oxidativo.

Baseando-se em dados da literatura que demonstram que os metabólitos acumulados na DXB causam desmielinização e prejuízos na memória, especula-se que os efeitos do CIC encontrados neste trabalho possam colaborar para tais achados por causar redução do suporte trófico de BDNF e NGF, pelo estresse oxidativo e dano ao DNA. Além disso, os baixos níveis de BDNF e NGF são consistentes com a hipótese que um déficit nestes fatores neurotróficos pode contribuir para alterações estruturais e funcionais do cérebro subjacentes à fisiopatologia da DXB, apoiando a hipótese do processo neurodegenerativo na DXB.

Palavras-chaves: Ácido α -cetoisocaproico; Dano ao DNA; Doença da urina do xarope do bordo; Estresse oxidativo; Fatores Neurotróficos.

ABSTRACT

Maple syrup urine disease (MSUD) is an autosomal recessive neurometabolic disorder caused by a deficiency in the activity of the α -branched-chain ketoacids dehydrogenase complex. This deficiency leads to the accumulation of the branched-chain amino acids (BCAA) leucine, isoleucine and valine, as well as their α -keto acids in body tissues and fluids. The excess of them interferes on the astrocytic and neuronal metabolism, being high concentrations of leucine and α -ketoisocaproic acid (KIC) considered particularly toxic to the brain. It is believed that the KIC is the most toxic ketoacid since it was able to inhibit the brain consumption of oxygen, to induce oxidative stress, to cause impairment in the myelin formation in the cerebellum of rats, and it has been associated with the onset of neurological symptoms. However, there has not been a completely satisfactory explanation to clarify the pathophysiology of brain damage in this disease. Considering that the neuronal viability can be affected by the reduction of neurotrophic factors and by oxidative stress, the purpose of this study was to deepen knowledge about the neurochemical effects of intracerebroventricular (ICV) administration of KIC on brain structures of 30 day old rats. The protein levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), pro-BDNF and nerve growth factor (NGF); levels of reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) and carboline protein; the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), as well as the damage to DNA in the hippocampus, striatum and cerebral cortex one hour after ICV administration of KIC were analyzed. The results showed that the ICV administration of KIC reduced the protein levels of BDNF in the hippocampus, striatum and cerebral cortex without changing the protein levels of pro-BDNF, while the levels of NGF protein were reduced in the hippocampus. Regarding the oxidative stress parameters, it was observed an increase in the concentration of markers of lipid peroxidation TBA-RS as well as for protein in every brain structures studied; CAT enzyme had a reduced activity in the striatum while SOD activity was statistically increased in the hippocampus and striatum of the animals. Finally, ICV administration of KIC caused a significant increase in the rate and frequency of damage to DNA in all structures studied. In conclusion, these results suggest that KIC causes an imbalance in neurotrophin levels as well induces oxidative stress. Based on data from the literature showing that the metabolites accumulated in DXB cause demyelination and impaired memory performance, it is tempting to speculate that KIC

effects on demyelination and memory processes may be mediated by the reduction of the trophic support of BDNF and NGF and oxidative stress. Moreover, low levels of BDNF and NGF are consistent with the hypothesis that a deficit in these neurotrophic factors may contribute to structural and functional changes of the brain, subjacent the pathophysiology of DXB, supporting the hypothesis of neurodegenerative process in DXB.

Key-words: α -ketoisocaproic acid; DNA damage; Maple syrup urine disease; Oxidative stress; Neurotrophic factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada	38
Figura 2: Teorias do mecanismo neurotóxico na DXB.....	46
Figura 3: Esquema representativo das NTs e de seus receptores específicos.....	51
Figura 4: Esquema representativo das vias de produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e a chave do sistema antioxidante enzimático que controla sua produção.....	56
Figura 5: Protocolo experimental da administração intracerebroventricular de CIC, bem como das análises neuroquímicas.....	62
Figura 6: Efeito da administração ICV aguda de CIC sobre os níveis proteicos de BDNF em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida.....	69
Figura 7: Efeito da administração ICV aguda de CIC sobre os níveis proteicos de pró-BDNF em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida.....	70
Figura 8: Efeito da administração ICV aguda de CIC sobre os níveis proteicos do fator de crescimento neural (NGF) em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida.....	71
Figura 9: Efeito da administração intracerebroventricular de CIC sobre níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (A) e proteínas carboniladas (B) em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida.....	72
Figura 10: Efeito da administração intracerebroventricular de CIC sobre a atividade da catalase (A) e superóxido dismutase (B) em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida.....	73
Figura 11: Efeito da administração intracerebroventricular de CIC sobre o índice de dano (A) e a frequência de dano (B) em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos fenótipos clínicos da DXB de acordo com a atividade residual do CDCCR.	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AACR – Aminoácidos de Cadeia Ramificada
AChE – Acetilcolinesterase (do inglês, *acetylcholinesterase*)
aCSF – Líquido cérebro espinhal artificial (do inglês, *artificial cerebrospinal fluid*)
ATCR – Aminotransferase de Cadeia Ramificada
ATCRc – Aminotransferase de Cadeia Ramificada Citosólica
ATCRm – Aminotransferase de Cadeia Ramificada Mitocondrial
BDNF- Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*)
CACR – α -cetoácidos de cadeia ramificada
CAT – Catalase
CDCCR – Complexo da α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CIC – Ácido α -cetoisocaproico
CIV – Ácido α -cetoisovalérico
CMV – Ácido α -cetometilvalérico
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CREB – Proteína de ligação dos elementos responsivos ao cAMP (do inglês, *cAMP responsive elemento binding protein*)
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNPH – Dinitrofenilidrazina (do inglês, *dinitrophenylhydrazine*)
DXB – Doença da Urina do Xarope do Bordo
EIM – Erros inatos do metabolismo
ERNs – Espécies reativas de nitrogênio
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FD – Frequência de dano
GDNF – Fator Neurotrófico Derivado da Glia (do inglês, *glial cell line-derived neurotrophic factor*)
GFAP – Proteína ácida fibrilar glial
GLN – Glutamina
GLU – Glutamato
GPx – Glutathiona peroxidase
GSH – Glutathiona reduzida
GSR – Glutathiona redutase
GSSG – Glutathiona oxidada
ICV – Intracerebroventricular
ID – Índice de dano
ISO – Isoleucina

LAT-1 – Transportador de aminoácido do tipo 1 (do inglês, *L-type amino acid transporter 1*)

LEU – Leucina

LMP – Baixo ponto de fusão (do inglês, *low melting point*)

LTP – Potenciação de longa duração (do inglês, *long-term potentiation*)

MAG – Glicoproteína associada à mielina (do inglês, *myelin-associated glycoprotein*)

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

MBP – Proteína básica da mielina (do inglês, *myelin basic protein*)

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês, *messenger ribonucleic acid*)

mtDNA – Ácido desoxirribonucleico mitocondrial (do inglês, *mitochondrial deoxyribonucleic acid*)

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear *kappa* B (do inglês, *nuclear factor kappa B*)

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

NMP – Metilpirrolidona

NT-3 – Neurotrofina-3

NT-4/5 – Neurotrofina-4/5

NTs – Neurotrofinas

OMIM – do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man*

p75^{NTR} – Receptor de neurotrofina p75 (do inglês, *p75 neurotrophin receptor*)

PI-3-Cinase – Fosfatidilinositol-3-cinase (do inglês, *phosphoinositide 3-kinase*)

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

PLP – Proteolipoproteína (do inglês, *myelin proteolipid protein*)

SOD – Superóxido dismutase

SOD1 – Superóxido dismutase cobre/zinco

SOD2 – Superóxido dismutase manganês

SOX10 – do inglês, *SRY (sex determining region Y)-box 10*

TBA – Ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid*)

TBA-RS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances*)

TCA – Ácido tricloroacético

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

Trk – Tropomiosina receptor cinases (do inglês, *tyrosine kinase receptor*)

VAL – Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	35
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	35
1.2 DOENÇA DO XAROPE DO BORDO	35
1.2.1 Breve histórico	35
1.2.2 Etiologia e aspectos epidemiológicos	36
1.2.3 Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada	37
1.2.3.1 CDCCR	39
1.2.4 Aspectos moleculares do CDCCR	40
1.2.5 Aspectos clínicos da doença da urina do xarope do bordo	40
1.2.6 Diagnóstico e tratamento	43
1.2.7 Achados neurofisiopatológicos	45
1.3 FATORES NEUROTROFICOS	50
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO	53
1.5 JUSTIFICATIVA.....	57
2 OBJETIVOS	59
2.1 OBJETIVO GERAL	59
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
3. METODOLOGIA	61
3.1 ANIMAIS	61
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	61
3.3 AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS	61
3.3.1 Níveis proteicos de BDNF e NGF	62
3.3.2 Avaliação de estresse oxidativo	64
3.3.3 Dano ao DNA	66
3.3.4 Dosagem de proteínas	66
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
4. RESULTADOS	69
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	111

1. INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios monogênicos, em sua maioria com padrão de herança autossômica recessiva, que ocasionam mudanças bioquímicas complexas por defeitos enzimáticos específicos. Dependendo da importância da rota afetada, o defeito enzimático repercute de forma clínica variável, geralmente provocando sintomatologia grave e afetando o sistema nervoso central (SNC) (Scriver et al., 2001).

Os EIM de aminoácidos forneceram os primeiros exemplos de defeitos bioquímicos ligados a condições patológicas. Archibald Garrod (1858-1936) reconheceu bloqueios herdáveis no fluxo metabólico humano normal, que obedeciam aos mecanismos mendelianos de herança e os descreveu em 1908, na obra “*Croniam Lectures*”, utilizando pela primeira vez o termo EIM, para designar doenças como a alcaptonúria, o albinismo, a cistinúria e a pentosúria (Scriver, 2008). Garrod observou que, na alcaptonúria, os indivíduos afetados excretavam na urina grandes quantidades de ácido homogentísico, relacionando seu acúmulo a um bloqueio enzimático na via de degradação da tirosina (Garrod, 1909; Louis e Elsas, 2009; Berg et al., 2010). Também observou maior frequência dos casos em indivíduos da mesma família e decorrentes de casamentos consanguíneos. Frente a estas evidências e analisando que pais dos indivíduos afetados não apresentavam a doença, propôs para estes um modelo de herança autossômica recessiva (Garrod, 1909; Pasternak, 2007; Louis e Elsas, 2009; Berg et al., 2010).

Os EIM formam um grupo heterogêneo de mais de 700 distúrbios genéticos descritos que afetam a síntese, a degradação, o transporte e o armazenamento de moléculas (Sinclair, 1982; Jimenez-Sanchez et al., 2001). Embora individualmente raros, quando analisados em conjunto, atingem 1 para cada 1.000 nascidos vivos (Jimenez-Sanchez et al., 2001) e quando observados em grupos pré-selecionados como de alto risco, podem atingir frequência superior a 200 vezes àquela identificada na população em geral (Wannmacher et al., 1982).

1.2 DOENÇA DO XAROPE DO BORDO

1.2.1 Breve Histórico

Em 1954, Menkes e colaboradores descreveram quatro casos de encefalopatia degenerativa familiar, com início dos sintomas na primeira

semana de vida e sobrevida máxima de três meses. Episódios convulsivos, edema cerebral, espasticidade muscular generalizada, recusa alimentar e disfunção respiratória grave, associados a um forte odor de açúcar queimado na urina, semelhante ao xarope do bordo, estavam entre os principais sinais e sintomas. Esta característica, comum a todos os casos, deu origem a doença da urina do xarope do bordo (DXB; OMIM 248600) (Menkes et al., 1954). Anos mais tarde, Westall e colaboradores (1957) relataram outro caso semelhante, identificando concentrações elevadas de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) na urina de uma criança com DXB. Menkes, em 1959, a partir de amostras de urina cedidas por Westall, relatou elevadas concentrações do ácido α -cetoisocaproico (CIC), bem como de menores concentrações dos ácidos α -cetoisovalérico (CIV) e do α -cetometilvalérico (CMV), provenientes, respectivamente, da via de degradação dos AACR leucina (LEU), valina (VAL) e isoleucina (ISO). Supôs, então, que os α -cetoácidos poderiam ser indiretamente responsáveis pelo odor de açúcar queimado da urina (Menkes, 1959). A partir de estudos enzimáticos em leucócitos e fibroblastos de indivíduos com DXB na década de 60, identificou-se como causa bioquímica da doença uma deficiência no complexo enzimático da α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR; EC 1.2.4.4), responsável pela descarboxilação dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (CACR) (Dancis et al., 1960; Menkes, 1962; Chuang e Shih, 2001).

1.2.2 Etiologia e Aspectos Epidemiológicos

A DXB é um distúrbio neurometabólico de herança autossômica recessiva, causada pela deficiência da atividade do CDCCR, que envolve a via de degradação dos AACR. O defeito metabólico leva ao acúmulo dos aminoácidos essenciais LEU, ISO e VAL, dos α -cetoácidos correspondentes, CIC, CMV e CIV, bem como dos hidroxíácidos, ácido α -hidroxi-isocaproico, α -hidroxi-isovalérico e 2-hidroxi-3-metilvalérico, em tecidos e líquidos corporais de pacientes (Mackenzie e Woolf, 1959; Treacy et al., 1992; Chuang e Shih, 2001).

Estima-se que a incidência mundial da DXB seja de 1 para 185.000 nascidos vivos. Embora relativamente rara, apresenta elevada incidência entre os Menonitas residentes no estado da Pensilvânia/Estados Unidos, atingindo 1 para cada 176 (Chuang e Shih, 2001). A segregação mendeliana da mutação do tipo IA (p.Y393N/pY438N) foi estabelecida através de estudo genômico de 70 membros, incluindo 12 pacientes de diferentes gerações Menonitas (Mitsubuchi et al., 1992) que migraram da Europa Central para a

Pensilvânia no século XVIII (Love-Gregory et al., 2002; Puffenberger, 2003). Em sua totalidade, os Menonitas carregam a mutação do tipo IA, o mais prevalente fenótipo clássico da DXB (Zhang et al., 1989).

Estudos epidemiológicos realizados em países que incluem a DXB em programas de rastreamento neonatal estimam incidências variadas para esta doença. Na Alemanha, 1 para 133.000 nascidos vivos (Fingerhut, 2009), em Portugal, 1 para 86.800 (Quental et al., 2010) e na região da Galícia/Espanha, 1 para 39.300 (Couce Pico et al., 2007). Estima-se a prevalência da DXB no Brasil em 1 para 43.000 nascidos vivos (Pinto et al., 1998; Martins, 1999; Souza et al., 2002).

1.2.3 Metabolismo dos AACR

Os AACR LEU, ISO e VAL são aminoácidos alifáticos neutros, constituídos por quatro ou mais átomos de carbono, com um grupamento metila que ramifica a cadeia de carbonos na posição 3 ou 4 (Schadewaldt e Wendel, 1997; Chuang e Shih, 2001). São aminoácidos essenciais que resultam em um acréscimo superior a 60 % na concentração dos aminoácidos sanguíneos após a ingestão de proteínas (Wahren et al., 1976). Estes três aminoácidos possuem rota catabólica semelhante e são metabolizados pelo músculo esquelético como fonte alternativa de energia (Odessey e Goldberg, 1972; Hutson et al., 1978), sendo também oxidados ativamente pelos rins (Goldberg e Odessey, 1972), coração (Buse et al., 1972; Sans et al., 1980), tecido adiposo (Goodman, 1977) e cérebro (Chaplin et al., 1976).

A via de degradação dos AACR inicia com o transporte desses aminoácidos para o interior celular através do sistema L-transportador independente de Na⁺, localizado na membrana plasmática (Oxender e Christensen, 1963; Prentki e Renold, 1983). Na célula, estes aminoácidos passam por três etapas iniciais comuns: transaminação, descarboxilação oxidativa e desidrogenação (Meister, 1965). Na primeira etapa, ocorre uma transaminação reversível, catalisada pela aminotransferase dos aminoácidos de cadeia ramificada (ATCR; EC 2.6.1.42), existente nas isoformas citosólica (ATCRc) e mitocondrial (ATCRm) (DeSantiago, 1998). Essa transaminação origina os AACR derivados da LEU, CIC, da ISO, CMV e da VAL, CIV. Na sequência, os α -cetoácidos citosólicos são translocados para o interior mitocondrial através de seus transportadores específicos (Hutson e Rannels, 1985), onde sofrem descarboxilação oxidativa irreversível catalisada pelo CDCCR (Pettit et al., 1978; Danner et al., 1979). Nesta segunda etapa, haverá a produção de isovaleril-CoA, α -metilbutiril-CoA e isobutiril-CoA, derivados do CIC, CMV e CIV,

respectivamente, que passam posteriormente para a terceira etapa, em que sofrem desidrogenação pelas acil-CoA desidrogenases específicas (Ikeda e Tanaka, 1988a; Ikeda e Tanaka, 1988b). Após estas etapas, cada α -cetoácido segue uma via diferente de degradação. A LEU forma acetil-CoA e acetoacetato como produtos finais, sendo, portanto, um aminoácido cetogênico, a ISO produz acetil-CoA e succinil-CoA, sendo tanto cetogênico como glicogênico e a VAL é convertida exclusivamente a succinil-CoA, portanto, glicogênico (Chuang e Shih, 2001). A deficiência enzimática na segunda etapa resulta no acúmulo dos AACR e seus cetoácidos, originando a DXB (Figura 1).

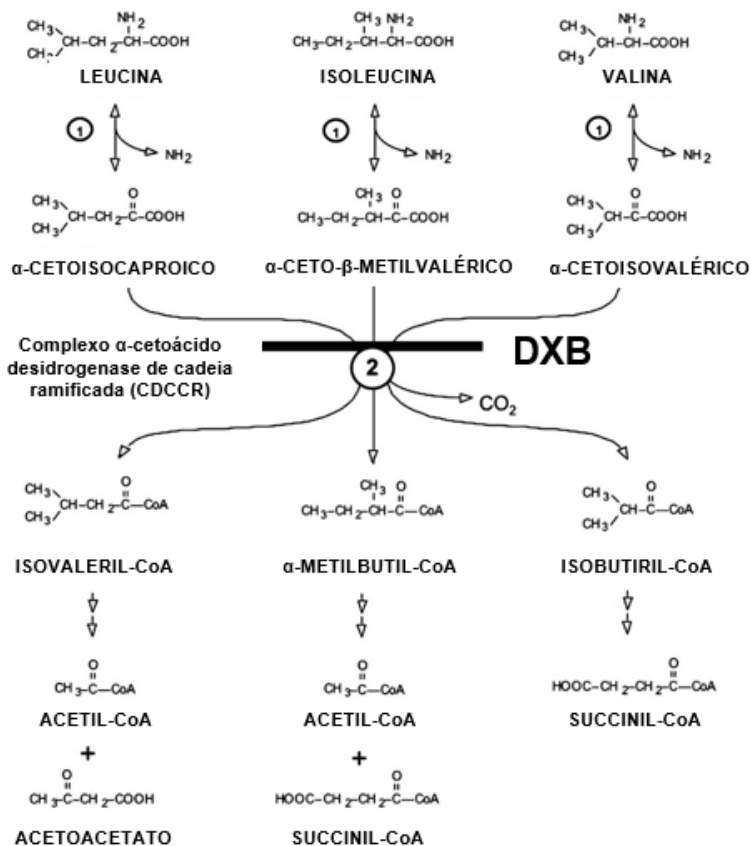


Figura 1. Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina. As duas primeiras reações comuns são catalisadas pelas

seguintes enzimas: transaminação reversível pela aminotransferase dos aminoácidos de cadeia ramificada (1); descarboxilação oxidativa dos cetoácidos de cadeia ramificada e esterificação da coenzima A pelo complexo α -cetoácido desidrogenase (2). Em 2, destaque ao bloqueio que determina a doença da urina do xarope do bordo pela deficiência do complexo multienzimático mitocondrial CDCCR. Adaptado de Chuang e Shih (2001).

1.2.3.1 CDCCR

O CDCCR é um complexo multienzimático localizado na membrana mitocondrial interna das células de mamíferos (Yeaman, 1986; Chuang e Shih, 2001; Chuang et al., 2008) envolvido na descarboxilação oxidativa dos AACR (Nobukuni et al., 1992; Parrella et al., 1994; Chuang e Shih, 2001). É uma macromolécula que compreende três componentes catalíticos: uma α -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada ($\alpha 2\beta 2$) ou E1, uma di-hidrolipoil transacilase (24 subunidades idênticas) ou E2 e uma di-hidrolipoamida desidrogenase homodimérica ou E3 (Chuang et al., 2008). O componente catalítico E1 é composto por duas subunidades: E1 α e E1 β (Yeaman, 1989). O complexo multienzimático é composto ainda por duas enzimas regulatórias, uma cinase e uma fostatase. Estas enzimas regulam a atividade do complexo através dos ciclos de fosforilação (inativação)/desfosforilação (ativação) de dois resíduos de serina da unidade E1 α (Eisenstein et al., 1991; Peinemann e Danner, 1994).

A atividade deste complexo regula o fluxo dos AACR usados para a obtenção de energia, sendo o passo irreversível da via catabólica. Os componentes E1 e E2 são específicos para o CDCCR, enquanto que a proteína E3 é também componente dos complexos α -cetoglutarato e piruvato desidrogenase (EC 1.2.4.1) (Reed e Hackert, 1990). O componente E1 catalisa uma descarboxilação dos α -cetoácidos mediada pela tiamina pirofosfatase (EC 3.6.1.-) reduzindo a molécula de lipoil covalentemente ligada à E2. A molécula do lipoil reduzida e o domínio lipoil servem como um braço móvel para transferir o grupo acil do componente E1 para a CoA, aumentando a quantidade de acil-CoA. Finalmente, o componente E3, que é fortemente ligado ao dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), reoxida o resíduo de di-hidrolipoil do componente E2, dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado (NAD⁺) como último aceptor de elétrons (Reed e Hackert, 1990; Treacy et al., 1992; Peinemann e Danner, 1994; Chuang e Shih, 2001). O resultado final da reação da desidrogenase dos AACR é a produção de acil-CoA de cadeia ramificada, CO₂ e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida (NADH) na proporção de 1:1:1 (Danner et al., 1979).

1.2.4 Aspectos moleculares do CDCCR

O CDCCR humano é codificado por seis loci genéticos ($E1\alpha$, $E1\beta$, E2, E3, CDCCR cinase e CDCCR fosfatase). Com base na subunidade afetada do CDCCR humano, a DXB é classificada em quatro grupos moleculares que destacam a heterogeneidade genética da doença (Chuang e Shih, 1995). Estes incluem os tipos IA e IB para mutações nos genes *BCKDHA* e *BCKDHB*, subunidades catalíticas $E1\alpha$ e $E1\beta$, respectivamente, tipo II para mutações no gene *DBT* (unidades catalíticas E2) e tipo III para mutações no gene *DLD* (unidade catalítica E3). Há outros dois tipos ainda não documentados, tipo IV e V, reservados para as mutações na CDCCR cinase e CDCCR fosfatase (Nellis e Danner, 2001; Chuang et al., 2008).

Foram identificadas até hoje um total de 166 mutações em três unidades catalíticas que causam a DXB, sendo 50 mutações no tipo IA, 53 no tipo IB, 49 no tipo II e 14 no tipo III, demonstrando não haver ocorrência preferencial de mutações da DXB entre as três subunidades CDCCR específicas ($E1\alpha$, $E1\beta$ e E2), exceto para o tipo III (Nellis e Danner, 2001). A gravidade da deficiência enzimática causada por mutações na unidade E3 pode estar associada a um aumento na letalidade intrauterina, resultando em menor incidência de NVs com DXB tipo III (Fischer et al., 1989; Chuang et al., 1997; Chuang et al., 2004). As 50 mutações do tipo IA estão fortemente associadas ao fenótipo da DXB clássica (Zhang et al., 1989).

1.2.5 Aspectos clínicos da DXB

Há cinco fenótipos clínicos na DXB, causados por mutações genéticas em alguns dos genes citados acima. As manifestações clínicas são variáveis e dependentes da atividade residual do CDCCR. São classificadas em fenótipo clássico, intermediário, intermitente, responsivo à tiamina e deficiente de E3 (Tabela 1) (Chuang e Shih, 2001).

Tabela 1. Classificação dos fenótipos clínicos da DXB de acordo com a atividade residual do CDCCR.

<i>Fenótipo Clínico</i>	<i>Características Clínicas</i>	<i>Atividade Enzimática Residual (%)</i>
<i>Clássico</i>	Início neonatal, recusa alimentar, letargia, hipotonia ou hipertonia muscular, cetoacidose e convulsões	0 a 2
<i>Intermediário</i>	ADNPM*, cetoacidose pouco frequente	3 a 30
<i>Intermitente</i>	Início de desenvolvimento normal. Episódios de ataxia, cetoacidose precipitada por infecção ou estresse	5 a 20
<i>Responsivo à Tiamina</i>	Semelhante à forma intermediária	2 a 40
<i>Deficiência de E3</i>	Ausência de sintomas neonatais, ADNPM*, hipotonia, acidose láctica, distúrbios do movimento, deterioração progressiva	0 a 25

*ADNPM = Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Adaptado de Chuang e Shih (2001).

A forma neonatal clássica é a mais comum e a mais grave da doença, visto que a atividade enzimática do CDCCR nos recém-nascidos atinge um máximo 2 %. Representa aproximadamente 80 % dos casos de DXB. Os níveis de AACR, em especial da LEU, estão particularmente elevados, podendo chegar a 2000 $\mu\text{mol/L}$ em sangue, líquido cefalorraquidiano e urina. Cinquenta por cento ou mais dos α -cetoácidos presentes é o que deriva da LEU, ou seja, CIC (Chuang e Shih, 2001). Valores de LEU superiores a 800 $\mu\text{mol/L}$ aumentam o risco de desenvolvimento de encefalopatia (Morton et al., 2002; Serra et al., 2010). Os recém-nascidos apresentam-se assintomáticos ao nascimento, sendo que as manifestações clínicas se iniciam geralmente entre o 4º e 7º

dia de vida e caracterizam-se por letargia e sucção débil, que evoluem com perda de peso e sinais neurológicos progressivos, com alternância entre hipotonia/hipertonia muscular com extensão distônica (opistótono) semelhante a postura de descerebração. Cetose e odor adocicado que se assemelha ao odor do xarope do bordo é perceptível nesta fase, na urina/cerúmen. No entanto, é mais aparente quando a urina seca na roupa ou fralda (Morton et al., 2002). A intensidade do odor na urina está diretamente relacionada ao aumento da LEU no plasma, sendo mais evidente durante a descompensação metabólica (Chuang e Shih, 2001). Se não tratados, o quadro clínico evolui para convulsões e edema cerebral generalizado com progressiva deterioração neurológica, que culmina com o óbito em poucas semanas de vida (Chuang e Shih, 2001). Observa-se hipomielinização/desmielinização no SNC e atrofia cerebral, principalmente durante as crises de descompensação metabólica (Chuang e Shih, 2001; Schönberger et al., 2004).

Indivíduos com a forma intermediária da DXB apresentam uma atividade enzimática residual entre 3 a 30 % do normal, geralmente não manifestam sintomas no período neonatal e o diagnóstico ocorre entre os cinco meses e sete anos de vida. Apresentam ADNPM e convulsões (Fischer e Gerritsen, 1971; Kalyanaraman et al., 1972; Weiss et al., 1975; Stoppoloni et al., 1978; Verdu et al., 1985; Rittinger et al., 1986) e graves episódios de cetoadicose (Fischer e Gerritsen, 1971; van der Horst e Wadman, 1971; Duran et al., 1978; Velázquez et al., 1981; Gonzalez-Rios et al., 1985), porém a encefalopatia aguda é rara (Müller et al., 1971; Gonzalez-Rios et al., 1985). Os pacientes cursam com persistentes elevações de AACR e prejuízo neurológico, podendo apresentar deficiência intelectual progressiva e inespecífica (Chuang e Shih, 2001).

Na forma intermitente da doença, a atividade enzimática representa 5-20 % de atividade normal do CDCCR. O surgimento dos sintomas geralmente aparece entre o quinto mês e o segundo ano de vida em associação com otite média e/ou outra infecção, mas pode aparecer até a 5ª década de vida (Lie et al., 1985). Nesta forma, os níveis de AACR estão aumentados apenas nas crises metabólicas agudas, desencadeadas por quadro infeccioso ou sobrecarga de proteínas na dieta (Chuang e Shih, 2001; de Baulny et al., 2012).

A forma responsiva à tiamina é similar à intermediária. Os pacientes apresentam atividade residual do CDCCR entre 2 a 40 % e, conseqüentemente, não apresentam sintomas no período neonatal, mas na vida adulta podem apresentar um curso semelhante à forma intermediária. O diferencial se dá pelo fato de que os pacientes possuem melhora do

quadro clínico e dos exames laboratoriais quando submetidos ao teste terapêutico com tiamina (Chuang et al., 2004).

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

1.2.6 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da DXB é laboratorial através da análise de aminoácidos e/ou ácidos orgânicos em sangue, plasma ou urina, sendo geralmente realizado em indivíduos com teste de triagem positivo, com sintomas sugestivos ou naqueles com história positiva para DXB (Chuang e Shih, 2001, Strauss et al., 2006a). A identificação da doença pode ocorrer através do Teste do Pezinho ampliado (teste de triagem neonatal), o qual fornece um resultado semiquantitativo, quando realizado por cromatografia de aminoácidos, ou quantitativo, quando realizado por espectrometria de massa em sequência (MS/MS) (Souza et al., 2002). Esse último, considerado um teste diagnóstico por apresentar maior sensibilidade e especificidade (Simon et al., 2006).

A identificação de concentrações plasmáticas e urinárias elevadas de LEU, ISO e VAL é feita por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), autoanalisador de aminoácidos ou por espectrometria de massa em sequência. No entanto, o perfil normal destes aminoácidos não pode excluir o diagnóstico da forma intermitente, que geralmente é diagnosticada durante a descompensação aguda. Os CIC, CIV e CMV podem ser detectados pela análise de ácidos orgânicos na urina através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) (Chuang e Shih, 2001). O diagnóstico é confirmado pela avaliação da atividade enzimática do CDCCR em linfócitos, fibroblastos ou por biópsia de fígado (Schadewaldt et al., 2001; Strauss et al., 2006a). As concentrações plasmáticas normais dos AACR, depois de 2 a 3 horas de ingestão de proteína, são LEU entre 80-200 $\mu\text{mol/L}$ (1,0-2,6 mg/dL), ISO 40-90 $\mu\text{mol/L}$ (0,5-1,2 mg/dL) e VAL 200-425 $\mu\text{mol/L}$ (2,3-5,0 mg/dL) (de Baulny et al., 2012). Entretanto, em pacientes com DXB não tratados, a LEU, principal metabólito acumulado na doença, pode atingir níveis plasmáticos de até 5 mM, enquanto a ISO e a VAL atingem 1 mM

(Zielke et al., 1996). O diagnóstico pré-natal para as famílias em que já houve identificação da mutação envolvida pode ser obtido através da cultura de células do líquido amniótico retiradas por amniocentese entre a 14^a e a 18^a semanas gestacionais (Chuang e Shih, 2001, Wajner e Vargas, 2002, de Luis Román e Izaola Jáuregui, 2005). A detecção sérica da aloisoleucina é considerada fator patognomônico da doença (Schadewaldt et al., 1999). Esta é um aminoácido não proteico formado a partir da ramificação da ISO e apresenta depuração lenta. Isto faz com que sua concentração plasmática permaneça elevada por vários dias após a descompensação metabólica, sendo permanentemente detectável na forma clássica da DXB (Chuang e Shih, 2001, de Luis Román e Izaola Jáuregui, 2005). Exames complementares como a tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética e eletroencefalograma geralmente são realizados com fins de acompanhamento e/ou definição prognóstica (Chuang e Shih, 2001).

Essencialmente, o tratamento da DXB visa a restaurar a homeostase do metabolismo intermediário e evitar a descompensação metabólica, através da manutenção da síntese de proteína normal e prevenção de catabolismo proteico. Ainda, através da prevenção de desequilíbrios ou deficiências de aminoácidos e intermediários metabólicos, da atenuação da disfunção celular, da restauração da homeostase energética e da promoção de anabolismo (Snyderman et al., 1964; Chuang e Shih, 2001). Clinicamente, há duas condutas a serem adotadas: o tratamento de fase aguda (durante crises de descompensação metabólica) e o de fase de manutenção (paciente assintomático e com bom controle dos níveis de AACR). Na fase aguda, o tratamento é baseado em três pontos: rápida redução das concentrações dos níveis de AACR, suporte nutricional e indução do anabolismo através do aporte de proteínas hidrolisadas isentas de AACR. Outras estratégias podem ser utilizadas, se necessário, como diálise peritoneal (mais prática e mais utilizada nos hospitais), hemodiálise e hemofiltração (Calvo et al., 2000; Strauss et al., 2006a).

Na fase de manutenção, preconiza-se uma dieta restrita de proteínas, com baixo conteúdo de AACR e suplementada com uma fórmula semissintética, que consiste em complemento alimentar isento de AACR, mas que contém uma mistura de outros aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais e oligoelementos (Strauss et al., 2006a). Recentemente, as fórmulas para pacientes com DXB foram enriquecidas com aminoácidos essenciais (triptofano, tirosina, fenilalanina, metionina e treonina), uma vez que estes competem com os AACR pelo mesmo transportador de aminoácidos neutros no cérebro, objetivando diminuir o

aporte de AACR para esta estrutura (Strauss et al., 2010). Esse tratamento visa a diminuir o acúmulo de metabólitos tóxicos, principalmente da LEU e do CIC, minimizando os efeitos deletérios ao SNC. O objetivo do tratamento é manter os níveis plasmáticos de LEU o mais próximo possível dos valores de referência, entre 77 e 153 $\mu\text{mol/L}$ (Lepage et al., 1997) ou, preferencialmente, entre 100 e 300 $\mu\text{mol/L}$, que são limites aceitáveis para evitar danos (Morton et al., 2002). Contudo, a disfunção neurológica pode ser observada em muitos pacientes, uma vez que o desenvolvimento mental está relacionado à idade de início da terapia (mais precoce possível), à duração dos períodos de descompensação metabólica e ao estrito cumprimento da dieta a longo prazo (Chuang e Shih, 2001; Morton et al., 2002; Strauss et al., 2010).

Outra opção terapêutica proposta recentemente é o transplante ortotópico hepático, considerado particularmente benéfico na DXB clássica, quando a atividade residual do CDCCR é extremamente baixa (Serra et al., 2010). No entanto a experiência relacionada a esta prática ainda é limitada. A possibilidade de passar de uma dieta restrita para uma dieta livre e prevenir crises de encefalopatias é contrastada com os problemas cirúrgicos e riscos de imunossupressão, fazendo com que as taxas de morbidade e mortalidade sejam substanciais (Strauss et al., 2006b; Ng et al., 2008; Mazariegos et al., 2012).

1.2.7 Achados Neurofisiopatológicos

Os AACR, particularmente a LEU, são rapidamente transportados para cérebro e metabolizados ativamente (Oldendorf, 1971; Chuang e Shih, 2001), sugerindo um importante papel na manutenção estável do glutamato (GLU), maior neurotransmissor excitatório para a comunicação interneuronal do SNC, por serem doadores de nitrogênio (Yudkoff et al., 1993). A síntese de GLU nos astrócitos, local de maior transaminação dos AACR, transfere o grupamento amino para α -cetoglutarato para produzir GLU, que é convertido à glutamina (GLN). Os α -cetoácidos produzidos pela transaminação podem ser liberados dos astrócitos para o líquido extracelular e capturados pelos neurônios. Estas células podem oxidar o CIC; no entanto, este preferencialmente é reaminado à LEU (Snyderman, 1988; Yudkoff, 1997; Chuang e Shih, 2001).

Na DXB, o excesso de AACR e de seus α -cetoácidos interfere no metabolismo astrocítico e neuronal, podendo afetar a biossíntese de serotonina e catecolaminas e alterar a homeostase dos ciclos GLU/LEU e GLU/GLN (Chuang e Shih, 2001). Concentrações elevadas de LEU e CIC

são particularmente tóxicas ao cérebro (Zinnanti et al., 2009; Strauss et al., 2010). O CIC é considerado o cetoácido mais tóxico, pois inibe o consumo de oxigênio no cérebro de ratos (Amaral et al., 2010), a oxidação do 3-hidroxiubutirato de cobaias e provoca deficiência na formação de mielina em cerebelo de ratos (Gibson e Blass, 1976). Além disso, o acúmulo de CIC favorece a síntese de LEU, numa reação bidirecional de transaminase, consumindo GLU, que é utilizado tanto como neurotransmissor como fonte de energia (Hutson et al., 2001). O GLU é precursor direto do neurotransmissor inibitório GABA, que também pode estar depletado (Figura 2) (Zinnanti et al., 2009; Strauss et al., 2010; Muelly et al., 2013).

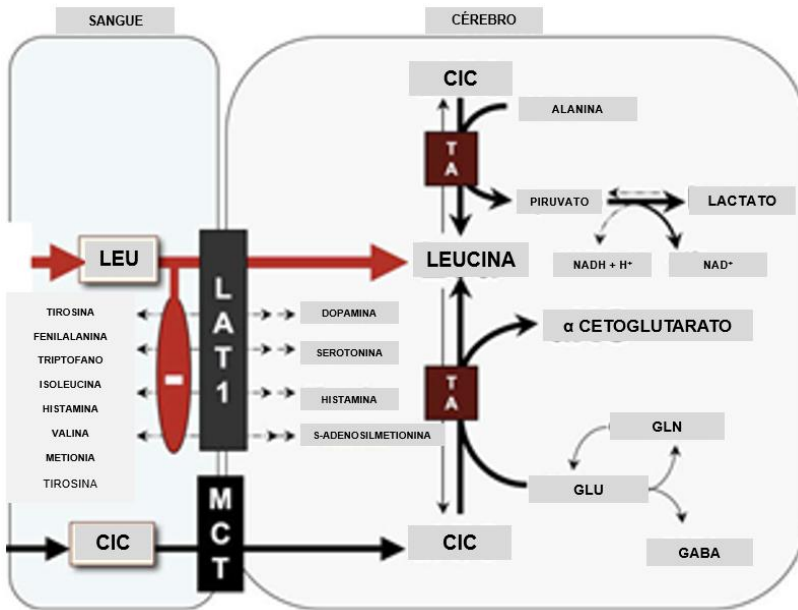


Figura 2. Teorias do mecanismo neurotóxico na DXB. Na barreira hematoencefálica, a LEU, possui alta afinidade pelo LAT-1, satura o transportador e bloqueia a captação de outros competidores tiosina, fenilalanina, triptofano, isoleucina, histamina, valina, metionina, glutamina e treonina. Entre estes estão os precursores dos neurotransmissores (dopamina, norepinefrina, serotonina e histamina) e S-adenosilmetionina (S-AdoMet), o maior doador de grupo metila cerebral. O CIC entra no cérebro através do transportador de monocarboxilatos (MCT) e reverte o sentido da atividade da transaminase cerebral. Isto esgota o GLU, o GABA e a GLN, enquanto aumenta a produção de

LEU e α -cetogluturato. O GLU e o GABA são os neurotransmissores excitatórios e inibitórios mais abundantes, respectivamente, no cérebro humano. A encefalopatia na DXB pode também bloquear a fosforilação oxidativa, através de um mecanismo ainda desconhecido, que aumenta as relações de NADH/NAD⁺, o que poderia explicar os níveis elevados de lactato cerebral observados tanto em camundongos como em humanos, durante crises metabólicas. LEU = leucina; CIC = ácido α -cetoisocaproico; LAT-1 = transportador de aminoácido do tipo 1; MCT = transportador de monocarboxilatos; TA = transaminação; NADH = dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido; NAD⁺ = dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido; GLU = glutamato; GABA = ácido gama aminobutírico; GLN = glutamina. Adaptado de Strauss et al., (2010) e Muelly et al., (2013).

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

Estudos *in vitro* apontam para um efeito inibitório dos CACR sobre a produção de CO₂ e a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória (Sgaravatti et al., 2003). Nesse mesmo modelo, foi demonstrado que os AACR, mas não CACR, reduzem a atividade da creatina cinase em homogeneizados de cérebro (Pilla et al., 2003). Ribeiro e colaboradores (2008) demonstraram que os AACR produziram um efeito inibitório *in vitro* sobre a produção de CO₂, bem como sobre a cadeia respiratória, inibindo os complexos II-III, III e IV. Outros resultados *in vitro* indicaram que o CIC atua como desacoplador da fosforilação oxidativa e como um inibidor metabólico, possivelmente através do seu efeito inibitório sobre a atividade da α -cetogluturato desidrogenase, enquanto a LEU atua como um inibidor metabólico (Amaral et al., 2010).

Evidências crescentes demonstram que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia da DXB. Barschak e colaboradores (2009) demonstraram que pacientes com DXB apresentam um aumento nos níveis de peroxidação lipídica, enquanto que as concentrações de triptofano e metionina estão significativamente reduzidas. Foi

demonstrado que pacientes com DXB com uma dieta restrita de AACR apresentam um aumento significativo de no teor de malondialdeído e de carbonilas no plasma, quando comparado com pacientes controles. Além disso, os pacientes submetidos à suplementação de L-carnitina apresentaram uma acentuada redução no teor de malondialdeído em relação aos controles, reduzindo a peroxidação lipídica (Mescka et al., 2013). Estudos *in vitro* também têm demonstrado que os AACR e os α -cetoácidos de cadeia ramificada, especialmente a LEU e o CIC, aumentam a quimioluminescência e os níveis de TBA-RS, reduzem a reatividade antioxidante total e inibem a GPx em córtex cerebral de ratos de 30 dias de idade (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005a). Ainda, a peroxidação estimulada pela LEU foi atenuada pelos antioxidantes: vitaminas C e E, GSSG e SOD (Bridi et al., 2005b). Estudos *in vivo* também demonstram o envolvimento do estresse oxidativo na DXB, Mescka e colaboradores (2011) demonstraram que animais submetidos ao modelo quimicamente induzido de DXB apresentaram peroxidação lipídica e dano a proteína, assim como uma diminuição na atividade da CAT e GPx em córtex cerebral de ratos, e a suplementação com L-carnitina foi capaz de prevenir tais alterações. Além disso, também foi demonstrado que a administração aguda e crônica de AACR induz dano ao DNA em hipocampo e estriado de ratos, e a suplementação com antioxidantes foi capaz de prevenir tal dano (Scaini et al., 2012b).

Jouvet e colaboradores (2000) descreveram efeitos deletérios dos α -cetoácidos de cadeia ramificada e aminoácidos de cadeia ramificada sobre a viabilidade celular de fibroblastos cultivados da pele de um paciente com DXB. Pela proposição dos autores, a apoptose foi ativada pela presença de níveis de α -cetoácidos de cadeia ramificada e aminoácidos de cadeia ramificada semelhantes aos encontrados nos pacientes. Funchal e colaboradores (2004a) demonstraram, em cultura de astrócitos, que os α -cetoácidos de cadeia ramificada levam a morte celular em concentrações comparáveis as observadas em indivíduos afetados e que estão no estado de descompensação metabólica. Demonstraram ainda que os α -cetoácidos de cadeia ramificada alteram a fosforização de proteínas do citoesqueleto celular, levando a reorganização da actina e da GFAP (proteína fibrilar glial ácida) do citoesqueleto (Funchal et al., 2002; Pessoa-Pureur et al., 2002; Funchal et al., 2004c), bem como observaram que as células gliais tratadas com estes metabólitos apresentam morfologia distinta das células controles, distinguindo-se da característica poligonal e apresentando uma distribuição fusiforme (Funchal et al., 2004a). Scaini e colaboradores (2012a) demonstraram que a

administração aguda e crônica AACR provoca um aumento na atividade da acetilcolinesterase em cérebro de ratos, e a coadministração de N-acetilcisteína e deferroxamina previne este aumento.

Além disso, estudos em culturas de células e modelos animais têm demonstrado o envolvimento dos AACR na modulação de fatores neutróficos, como o BDNF e NGF. Nitta e colaboradores (2004) relataram que a LEU-ISO, um dipeptido hidrofóbico, induz a síntese de BDNF no estriado e em cultura de neurônios mesencefálicos. Por outro lado, o BDNF regula a expressão de mRNA da aminotransferase de AACRc (enzima que catalisa a transaminação de AACR com α -cetoglutarato, o que resulta na produção α -cetoácidos de cadeia ramificada no cérebro (Castellano et al., 2006). Scaini e colaboradores (2015) demonstraram que a administração aguda de AACR em ratos de 10 e 30 dias de idade aumentou os níveis de pró-BDNF e diminuiu os níveis proteicos do ativador de plasminogênio tecidual (tPA) no estriado e hipocampo, sugerindo que a baixa atividade proteolítica gera níveis menores de mBDNF e, portanto, um acúmulo de pró-BDNF no cérebro. Por outro lado, os mesmos autores demonstraram que a administração crônica de AACR causou um aumento nos níveis de BDNF no hipocampo e córtex cerebral acompanhado por prejuízo da memória espacial, sugerindo que o prejuízo da memória possa ser decorrente da hiperexcitabilidade cerebral causada pelo BDNF (Scaini et al., 2013a). Além disso, um estudo realizado em ratos submetidos ao modelo quimicamente induzidos de DXB, demonstrou que após a administração aguda e crônica de AACR houve uma redução significativa nos níveis proteicos de NGF e dos níveis de mRNA do gene *ngf* no hipocampo de ratos, e a suplementação com antioxidante foi capaz de prevenir essa diminuição nos animais submetidos a administração crônica de AACR (Scaini et al., 2013b).

Alterações comportamentais também são atribuídas ao acúmulo de AACR e seus respectivos α -cetoácidos. Walsh e Scott (2010) demonstraram alterações no perfil neurocognitivo e motor de uma paciente com diagnóstico de DXB, observando déficit no raciocínio não verbal e visuo-espacial, déficit de atenção, de controle motor fino e prejuízo das funções executivas. Mello e colaboradores (1999), utilizando um modelo crônico de administração de LEU, observaram alterações comportamentais de longa duração em ratos submetidos a duas tarefas diferentes de aprendizado (habituação ao campo aberto e esquivas ativas de duas vias), sugerindo que a LEU e seu α -cetoácido causam alterações em processos associados com a aprendizagem. Coitinho e colaboradores (2001) demonstraram que animais submetidos à administração

intraestriatal de CACR apresentam comportamento convulsivante. Foi, também, demonstrado que a administração intra-hipocampal de CACR provoca déficit cognitivo em tarefas aversivas e não aversivas (Vasques et al., 2005). Nesse contexto, foi demonstrado que uma única administração intra-hipocampal de LEU em ratos adultos prejudica a consolidação da memória e causa comprometimento na formação da potencialização de longa duração (LTP) (Glaser et al., 2010). Além das alterações neurocognitivas, estudos têm demonstrado que pacientes com DXB na idade adulta apresentam elevada taxa de distúrbios neuropsiquiátricos, como transtorno de déficit de atenção, depressão e ansiedade (le Roux et al., 2006; Strauss et al., 2006a; Walterfang et al., 2013). Muelly e colaboradores (2013) demonstraram que as deficiências neuroquímicas demonstradas em pacientes com DXB e em modelos animais podem persistir no estado crônico, embora em menor grau, e cumulativamente contribuir para a morbidade neuropsiquiátrica.

1.3 FATORES NEUOTRÓFICOS

Fatores neurotróficos são proteínas solúveis que regulam a sobrevivência, o crescimento, a plasticidade morfológica e a síntese de novos neurônios com funções diferenciadas (Hefti et al., 1993; Lewin e Barde, 1996; Bibel e Barde, 2000). Seu conjunto de ações inclui também a inibição do processo de morte celular por apoptose (Shaltiel et al., 2007) e o envolvimento em processos cognitivos (Rybakowski et al., 2006). Sendo esses fatores essenciais para o funcionamento e sobrevivência neuronal, supõe-se que a viabilidade neuronal possa ser afetada pela redução persistente destes no SNC (Du et al., 2003).

Os fatores neurotróficos compõem duas principais famílias: a das neurotrofinas (NTs) e a do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (Chao, 2003). A família das NTs compreende peptídeos com grande homologia estrutural, sintetizados inicialmente como pró-neurotrofinas (pró-NTs) no retículo endoplasmático rugoso e clivadas no complexo de Golgi pela furina ou nos grânulos secretores pelas pró-proteínas convertases, adquirindo então sua forma madura. Em geral, são armazenadas no complexo de Golgi e então transportadas para o terminal axônico pré-sináptico ou dendritos pós-sinápticos para secreção local, que pode ocorrer espontaneamente (permissiva, constitutiva) ou em resposta a um estímulo (instrutiva, regulada) (Seidah et al., 1996; Lim et al., 2003). Os principais componentes dessa família são o fator de crescimento neural (NGF) (Sofroniew et al., 2001; Aloe, 2004), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Barde et al., 1982), a neurotrofina-3 (NT-

3) (Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990) e a neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (Hallböök et al., 1990, Berkemeier et al., 1991).

As formas maduras das NTs ligam-se à receptores específicos chamados tropomiosina receptor cinases (Trk), promovendo a sua dimerização e ativação. Existem três tipos de receptores Trk: TrkA, cujo ligante é NGF, TrkB, cujos ligantes são BDNF e NT-4, e TrkC, ao qual se liga NT-3 (Lim et al., 2003; Schechter et al., 2005). As pró-NTs apresentam afinidade ao receptor $p75^{NTR}$, membro da família do fator de necrose tumoral (TNF). Usualmente, a ligação de NTs maduras ao receptor $p75^{NTR}$ desencadeia cascatas de sobrevivência neuronal, enquanto que a ligação de pró-NTs a ele, ativa cascatas apoptóticas (Lu et al., 2005). Além disso, o receptor $p75^{NTR}$ também pode ser visto como modulador desta interação. Existem evidências de que a expressão do receptor $p75^{NTR}$ confere maior seletividade de ligação e maior intensidade de atuação dos receptores Trk. Embora o receptor $p75^{NTR}$ e os receptores Trk não tenham capacidade de ligação entre si, existem evidências da formação de complexos interativos entre eles na ausência de ligantes (Figura 3) (Benedetti et al., 1993; Bibel et al., 1999; Chao, 2003).

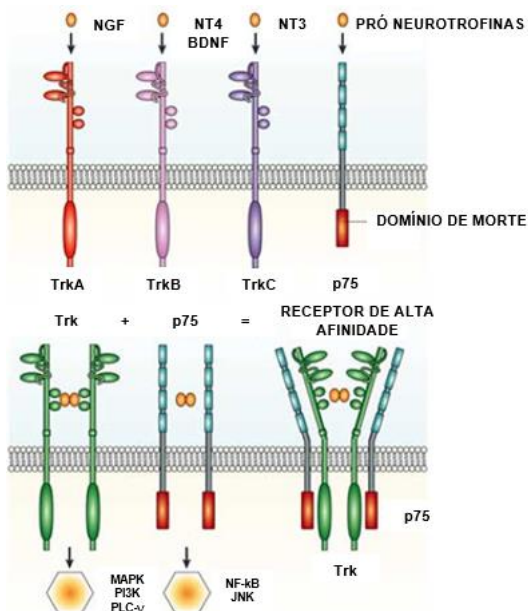


Figura 3. Esquema representativo das NTs e de seus receptores específicos. As NTs ligam-se seletivamente a receptores específicos de Trk promovendo a sua

dimerização e ativação de vias de transdução de sinal. O NGF liga-se em alta afinidade ao Trk-A, o BDNF e o NT-4 ligam-se ao Trk-B e o NT-3 liga-se ao Trk-C, ao passo que todas as pró-NTs se ligam ao receptor p75^{NTR}, ativando cascatas de morte celular. Interações entre Trk e receptores p75 podem alterar a especificidade da ligação dos receptores Trk, aumentando sua afinidade. Trk = tropomiosina receptor cinases; NGF = fator de crescimento neural; BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; NT-3 = neurotrofina 3; NT-4 = Neurotrofina 4. Adaptado de Chao (2003).

Os receptores Trk têm como característica a presença de domínios tirosina-cinases desencadeadores da transdução de sinais intracelulares. Sofrem dimerização induzida pelo ligante, ativando múltiplos sinais que promovem manutenção e sobrevivência neuronal através da autofosforilação de domínios específicos (Barbacid, 1995; Gargano et al., 1997). Kaplan e colaboradores (2000) analisaram diferentes vias de sinalização citoplasmáticas, comparando a atuação diferencial dos receptores TrkA e TrkB em neurônios simpáticos. O TrkA desencadeia predominantemente a ativação de fosfatidilinositol-3-cinase (PI-3-cinase), garantindo sobrevivência, enquanto que o TrkB pode desencadear vias distintas de sinalização pela ativação de PI-3-cinase ou cinase ativada por mitógeno (MAPK). Através das neurotrofinas, as cascatas de vírus do sarcoma de rato (Ras), proteína associada ao receptor 1 (Rap-1), MAPK, PI-3-cinase e fosfolipase C-C- γ (PLC- γ) são ativadas. Estas vias estão envolvidas em mecanismos patológicos e também na modulação da plasticidade fisiológica, como na melhora nos processos de memória em roedores devido à ativação da MAPK pelo NGF (Walz et al., 2000).

O NGF, descoberto e caracterizado no início da década de 50 como fator de sobrevivência e crescimento de neuritos provenientes de neurônios simpáticos e sensitivos (Hamburger e Levi-Montalcini, 1949; Levi-Montalcini e Hamburger, 1951), é produzido no cérebro durante a vida e é crucial para o crescimento, manutenção e sobrevivência de neurônios colinérgicos (Sofroniew et al., 2001). Além disso, o NGF atua como fator trófico para neurônios colinérgicos, uma vez que sua administração *in vivo* aumenta a atividade da colina acetiltransferase (Gnahn et al., 1983; Mobley et al., 1985). Knipper e colaboradores (1994) demonstraram que a estimulação aguda com NGF aumenta a liberação de GLU em sinaptossomas corticais de ratos. A administração intracerebroventricular (ICV) contínua de NGF melhora a retenção da aprendizagem em camundongos (Ricceri et al., 1996), reverte o declínio associado à idade em neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal e

corrige os déficits de memória espacial (Fischer et al., 1987). Estudos também demonstraram que a infusão de anticorpos anti-NGF durante quatro semanas, prejudicaram o desempenho no labirinto aquático de Morris (Nabeshima et al., 1991) e a indução da LTP (Hennigan et al., 2009). Além disso, níveis diminuídos de NGF estão correlacionados com a demência em pacientes com Alzheimer (Gelfo et al., 2011).

O BDNF, uma pequena proteína dimérica amplamente expressa no cérebro humano (Thoenen, 1995; Lewin e Barde, 1996), foi isolado em 1982 por Barde e colaboradores em neurônios de suínos (Barde et al., 1982). É considerado a principal NT do cérebro e o fator neurotrófico mais abundante do SNC. O BDNF é produzido principalmente pela glia e pelos núcleos neuronais, apresentando grande expressão em hipocampo, neocórtex, amígdala e cerebelo (Shimizu et al., 2003). Essa NT induz efeitos neurotróficos e neuroprotetores de longo prazo (Murer et al., 2001). Atua como modulador da plasticidade sináptica do SNC e SNP, na liberação de neurotransmissores, facilitando a liberação de GLU, GABA, dopamina e serotonina (Tyler et al., 2002; Yoshii e Constantine-Paton, 2010). Regula a excitabilidade neuronal (Bimonte, 2003; Shimizu et al., 2003; Szapacs et al., 2004; Zhao et al., 2005). Tarefas de aprendizado estão associadas a um aumento dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) de BDNF em ratos (Yamada e Nabeshima, 2003) e há indícios de que o BDNF exerce um papel importante na LTP (Minichiello, 2009). Além disso, a associação positiva entre os níveis séricos de BDNF e um teste de fluência verbal em humanos foi demonstrada, reforçando a importância do BDNF em processos neurocognitivos (Dias et al., 2009).

Alterações na expressão ou no funcionamento dessas moléculas podem levar não somente a uma disfunção no desenvolvimento neural, mas também a déficits de migração, desconexões, alteração na plasticidade cerebral e anormalidades estruturais. Tais considerações conduzem à hipótese de que os fatores neurotróficos estejam envolvidos na fisiopatologia da DXB, já que os pacientes apresentam degeneração aguda e/ou crônica de estruturas cerebrais (Chuang e Shih, 2001; Schönberger et al., 2004).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre agentes oxidantes e sistemas de defesa antioxidantes, em favor da produção excessiva de espécies reativas ou em detrimento da velocidade de sua remoção (Ferreira e Matsubara, 1997). Como conceito, espécies reativas são átomos, moléculas ou íons derivados do oxigênio, com um

ou mais elétrons desemparelhados, altamente instáveis e reativos, ávidos por ganhar ou perder um elétron de outras moléculas, para tornarem-se estáveis (Ferreira e Matsubara, 1997; Asmus e Bonifačić, 2000). A produção de espécies reativas constitui-se em uma ação contínua e fisiológica, que cumpre funções biológicas essenciais, em um cenário de reações de óxido-redução, podendo ceder o elétron solitário e serem oxidados ou receber outro elétron e serem reduzidos (Ferreira e Matsubara, 1997; Schneider e Oliveira, 2004). Estas reações ocorrem no citoplasma, mitocôndrias ou membrana celular e os seus alvos celulares (proteínas, carboidratos, lipídeos ou DNA) estão relacionados com o local de formação (Anderson et al., 2000), sendo a mitocôndria, através da cadeia transportadora de elétrons, a principal fonte geradora de espécies reativas (Green et al., 2004). Constituem três classes de compostos, espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de enxofre (EREs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As EROs incluem todos os radicais do oxigênio, dentre eles o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o oxigênio singlet (1O_2). Dentre as principais ERNs estão o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O ânion superóxido é formado principalmente através da cadeia transportadora de elétrons ou por ação de células fagocitárias durante o processo de defesa. Apesar do nome, esse radical é fracamente reativo (Halliwell, 1996; Halliwell, 2001; Thomas, 2003). O radical hidroxila, formado pela reação entre o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 ou pela reação entre o H_2O_2 e metais de transição como o ferro (Reação de Fenton) é considerado um poderoso e não seletivo oxidante. Pode reagir com todos os tipos de macromoléculas biológicas, produzindo derivados que não podem ser regenerados através do metabolismo celular. É o radical com maior habilidade para iniciar a lipoperoxidação (Halliwell, 1996; Ferreira e Matsubara, 1997; Halliwell, 2001), tendo uma meia vida curta (Del Maestro, 1980; Yu, 1994). Isto torna sua configuração eletrônica mais instável e com maior agilidade para retirar elétrons de outras moléculas (Halliwell e Gutteridge, 2007). O peróxido de hidrogênio apresenta poder oxidante indireto, gerando radicais OH^{\bullet} (Halliwell, 1996; Halliwell, 2001). O óxido nítrico é um radical pouco reativo, com grande importância biológica por atuar na vasorregulação e neurotransmissão, porém, em excesso, pode ser citotóxico. A reação entre o NO^{\bullet} e o $O_2^{\bullet-}$ leva à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual representa maior reatividade, podendo oxidar lipídeos, DNA e aminoácidos (Halliwell, 1996; Halliwell, 2001).

As EROs e as ERNs, em baixos níveis, são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo comunicação intracelular, apoptose e defesa orgânica contra agentes infecciosos (Halliwell, 2001). Participam ainda de processos de sinalização celular e também estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas (Halliwell, 2001). Entretanto, a produção excessiva dessas espécies ou deficiência na remoção gera um estado pró-oxidante que pode promover a lipoperoxidação, causar a oxidação de proteínas ou reagir com os ácidos nucleicos, causando mutações ou distúrbios de transcrição (Agarwal et al., 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007; Ngô et al., 2009).

Para evitar os danos causados pelas EROs e pelas ERNs, o organismo possui mecanismos de defesa chamados antioxidantes. Essas defesas atuam contra a toxicidade dessas espécies e são responsáveis pela manutenção da homeostase entre a produção e a eliminação de espécies reativas (Halliwell e Gutteridge, 2007). O sistema de defesa antioxidante é dividido em dois grandes grupos: sistema enzimático e não enzimático. Os antioxidantes enzimáticos são importantes para desintoxicação celular das espécies reativas dentre as quais destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6) e glutaciona peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9). A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , enquanto que a CAT é a responsável pela decomposição direta do H_2O_2 formando H_2O e O_2 . A GPx catalisa a decomposição de peróxidos através da oxidação da glutaciona reduzida (GSH), formando glutaciona oxidada (GSSG). Fisiologicamente, a GPx atua acoplada à enzima glutaciona redutase (GSR; EC 1.8.1.7) que por sua vez, catalisa a redução da GSSG, usando dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fostato reduzida (NADPH) como coenzima (Figura 4) (Halliwell, 2001; Bonnefoy et al., 2002; Salvador e Henriques, 2004; Garrel et al., 2010).

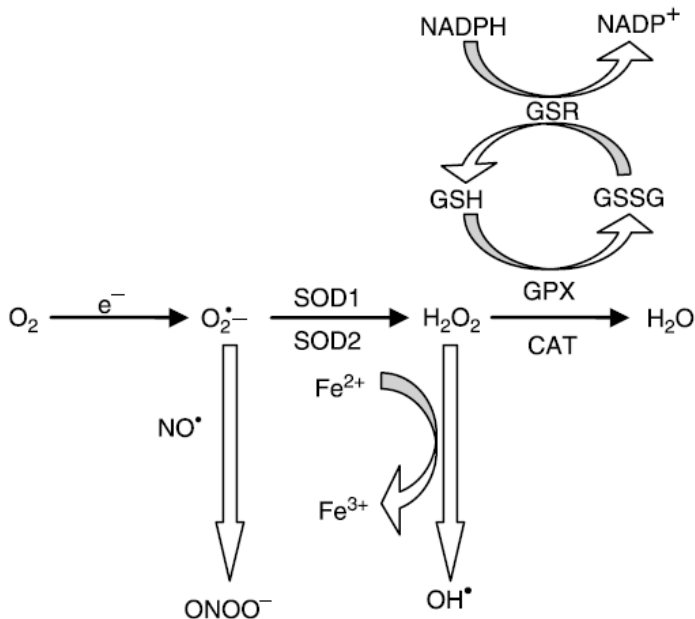


Figura 4. Esquema representativo das vias de produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e a chave do sistema antioxidante enzimático que controla sua produção. SOD1 = superóxido dismutase cobre/zinco; SOD2 = superóxido dismutase manganês; CAT = catalase; GPX = glutatona peroxidase; GSR = glutatona redutase; GSH = glutatona reduzida; GSSG = glutatona oxidada. Garrel et al., (2010).

Há ainda compostos não enzimáticos, sintetizados pelo organismo e que apresentam alta capacidade antioxidante. Dentre eles estão a bilirrubina, a melatonina, o ácido lipoico, a coenzima Q, o ácido úrico e a GSH que atuam de diferentes maneiras combatendo as espécies reativas (Halliwell e Gutteridge, 2007). Além dos antioxidantes endógenos, há importantes antioxidantes exógenos, não enzimáticos, obtidos através da dieta. Dentre estes estão ácido ascórbico, β -caroteno, α -tocoferol e os polifenóis (Salvador e Henriques, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Em determinadas condições patológicas, pode haver um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes, favorecendo a ocorrência do estresse oxidativo. Assim, o termo estresse oxidativo é usado para se referir à situação na qual a geração de espécies

reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis, que pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a combinação de quaisquer desses fatores (Halliwell e Whiteman, 2004; Sies et al., 2005). Esse processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (Halliwell e Whiteman, 2004). A cronicidade deste processo tem relevantes implicações sobre a etiologia de inúmeras doenças crônicas não transmissíveis, como a aterosclerose, a obesidade, os transtornos neurodegenerativos e o câncer (Bagchi e Puri, 1998; Green et al., 2004).

Diversos estudos evidenciam a relação do estresse oxidativo com a patogênese de doenças metabólicas, neoplásicas e neurodegenerativas (Reznick e Packer, 1993; Przedborski et al., 1996; Ben-Manachem et al., 2000). Além disso, demonstrou-se a atuação do estresse oxidativo em vários EIM, dentre eles em algumas acidemias orgânicas (Kölker et al., 2001; Latini et al., 2005; Latini et al., 2007), em aminoacidopatias como a homocistinúria (Streck et al., 2003; Stefanello et al., 2005), tirosinemia tipo I (Bird et al., 1995) e fenilcetonúria (Sierra et al., 1998; Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2006). Na DXB, há suposições de que alterações nos marcadores de lipídeos, proteínas e lesões oxidativas no DNA possam decorrer da produção excessiva de espécies reativas (Sitta et al., 2014).

1.5 JUSTIFICATIVA

O acúmulo de AACR e de seus α -cetoácidos decorrentes de defeitos na atividade do CDCCR interfere no metabolismo astrocítico e neuronal, sendo que concentrações elevadas de LEU e CIC são consideradas particularmente tóxicas ao cérebro, por estarem associadas a disfunções neurológicas, deficiência de neurotransmissores, desmielinização cerebral, distúrbios neurocomportamentais, prejuízo das funções executivas e de memória. Acredita-se que o CIC seja o mais tóxico dos cetoácidos. Entretanto, até o momento não se tem uma explicação completamente satisfatória para esclarecer a fisiopatologia do dano cerebral na DXB. Considerando que a viabilidade neuronal possa ser afetada pela redução dos fatores neurotróficos e pelo estresse oxidativo, o propósito do presente estudo foi avaliar os efeitos neuroquímicos da administração intracerebroventricular aguda de CIC sobre estruturas cerebrais de ratos com 30 dias de idade. Para tanto analisaram-se os níveis proteicos das neurotrofinas (BDNF, pró-BDNF e NGF), marcadores de estresse oxidativo, atividade de enzimas

antioxidantes e dano ao DNA, no hipocampo, estriado e córtex cerebral dos animais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito agudo da administração ICV do CIC sobre os níveis de NTs, parâmetros de estresse oxidativo e dano ao DNA em cérebro de ratos com 30 dias de vida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis proteicos de BDNF, pró-BDNF e NGF em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de idade, 1 hora após a administração ICV de CIC;
- Quantificar os níveis de TBA-RS e proteínas carboniladas em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de idade, 1 hora após a administração ICV de CIC;
- Avaliar a atividade das enzimas SOD e CAT em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de idade, 1 hora após a administração ICV de CIC;
- Avaliar o dano ao DNA através do teste cometa em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de idade, 1 hora após a administração ICV de CIC.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

O presente estudo foi realizado seguindo-se as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, bem como as recomendações para o uso de animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O experimento foi previamente aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob Protocolo nº 05-2014 (Anexo A).

Foram utilizados 36 (trinta e seis) ratos machos jovens com 30 dias de idade, pesando entre 90 e 120 g, da linhagem Wistar. Os animais, fornecidos pelo biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense, foram acondicionados em gaiolas, em grupos de seis. Foram mantidos com iluminação e temperatura controladas, ciclo claro-escuro de 12 horas (07:00 às 19:00, ciclo claro) temperatura de 23 ± 1 °C, sem privação de água e alimento, exceto durante o desenvolvimento dos protocolos experimentais. Para menor desconforto ambiental, a higiene da caixa moradia foi realizada diariamente.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Para este estudo, foi utilizado o modelo de infusão proposto por de Castro Vasques e colaboradores (2004), através da administração ICV de CIC (8 μmol em um volume final de 2 μL) via cirurgia estereotáxica, em ventrículo lateral direito. Foi utilizado como controle, líquido cerebroespinhal artificial (aCSF: NaCl 140 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, Na₂HPO₄ 1,2 mM e NaH₂PO₄ 0,27 mM, pH 7,4) no mesmo volume (2 μL).

Para tal, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/kg) associado a cloridrato de xilasina (10 mg/kg), por via intraperitoneal, com posterior fixação de suas cabeças ao aparelho estereotáxico (*Insight*[®] Equipamentos, Brasil) e tricotomização da região entre os pavilhões auditivos e olhos. A região tricotomizada foi submetida à assepsia e lavada com tampão fosfato salina (PBS). A torre do estereotáxico foi angulada na posição zero, ajustando-se as coordenadas em direção ao ventrículo lateral direito: 0,6 mm posterior ao bregma (ântero-posterior) 1,1 mm a partir da linha mediana (látero-lateral) e 3,2 mm ventral a partir da dura máter, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1986). Na sequência, um pequeno orifício foi perfurado no

crânio para microinjeção das infusões (CIC ou aCSF), através de uma agulha conectada por um tubo de polietileno à uma microseringa Hamilton 10,0 μL , através da qual, as soluções foram administradas, a uma velocidade de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Uma hora após a administração, os animais sofreram eutanásia por decapitação, sendo o cérebro removido, isolando-se o hipocampo, o estriado e o córtex cerebral para as análises dos níveis de neurotrofinas ($n = 6$ por grupo), estresse oxidativo ($n = 6$ por grupo) e dano ao DNA ($n = 6$ por grupo), conforme mostra a figura 5.

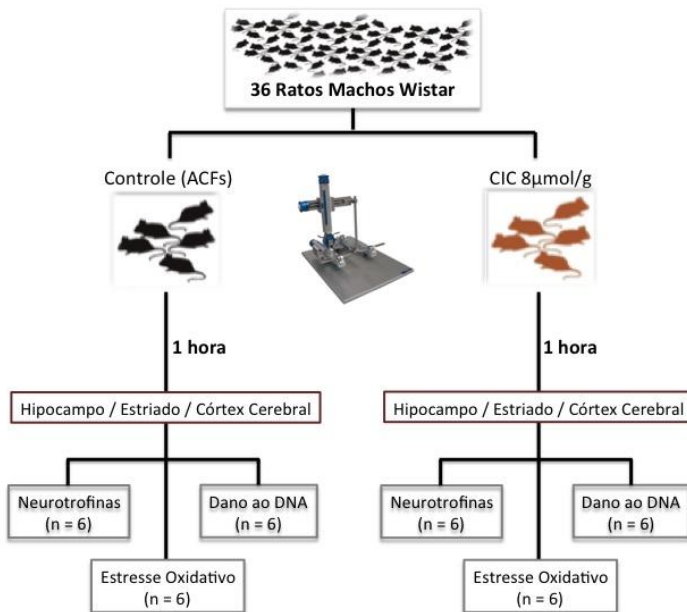


Figura 5. Protocolo experimental da administração intracerebroventricular de CIC, bem como das análises neuroquímicas. ACFs = líquido cerebrospinal artificial; CIC = ácido α -cetoisocaproico. Elaborado pela autora (2015).

3.3 AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS

3.3.1 Níveis proteicos de BDNF e NGF

Os níveis proteicos de BDNF e NGF nos tecidos cerebrais homogeneizados em tampão PBS (LaborClin, PR, Brasil), com um coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram determinados através de kits comerciais de ensaio de

imunoabsorção ligado à enzima (ELISA) com anticorpos monoclonais específicos para BDNF e NGF (Millipore, EUA e Canadá). Resumidamente, placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram incubadas durante 12 horas com as amostras diluídas (1:2 em diluente de amostra) e uma curva padrão (variando 7,8 a 500 pg/mL de BDNF e 15,6 a 1000 pg/mL de NGF). As placas foram então lavadas quatro vezes com o tampão de lavagem. Após a lavagem, o anticorpo monoclonal de rato anti-BDNF ou anti-NGF (diluído a 1:1000 em diluente da amostra) foi adicionado a cada poço e incubado durante 2 horas à temperatura ambiente. Ao término deste período, mais uma série de lavagens foi aplicada. Posteriormente, um anticorpo de coelho conjugado com peroxidase (diluído a 1:1000) foi adicionado a cada poço e incubou-se à temperatura ambiente durante 2 horas. Após, foi adicionada uma solução de estreptavidina (enzima-substrato) e uma solução de parada. A quantidade de BDNF e NGF foi determinada através da medida da absorbância em espectrofotômetro a 450 nm. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica (DO) e a concentração de BDNF e NGF.

Immunoblotting

As dosagens dos níveis proteicos de pró-BDNF foram realizadas por *Immunoblotting*. Inicialmente, córtex cerebral, hipocampo e estriado foram homogeneizados mecanicamente em tampão de amostra (Tris 200 mM, ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) 40 mM, dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS) 4 %, pH 6,8) e imediatamente fervidas durante 5 min. Em seguida, a solução de diluição da amostra (1:4 vol/vol, 40 % de glicerol, Tris 50 mM e azul de bromofenol) e β -mercaptoetanol foram adicionados a cada amostra para uma concentração final de 5 %. As concentrações de proteínas foram analisadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951) e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína. Para a eletroforese em gel monodimensional de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando gel 10-15 %, foram utilizadas 30 μ g de proteínas. As proteínas separadas foram, em seguida, transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando tampão contendo Tris 20 mmol/L, glicina 150 mmol/L, metanol 20 % (v/v) (pH 8,2) em uma unidade de transferência Bio-Rad® (Califórnia/EUA) resfriada. A carga de proteína e a eficiência da transferência foram verificadas com coloração Ponceau S. Após, os sítios de proteínas inespecíficos foram bloqueados com tampão Tween-Tris-Salina (TTBS: Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,9 % e Tween-

20 0,1 %) contendo 5 % de leite desnatado. Posteriormente, as membranas foram incubadas durante a noite, a 4 °C com o anticorpo primário anti-pró-BDNF (Abcam - ab72440). Após a incubação, o anticorpo primário foi removido e as membranas lavadas 4 vezes com TTBS durante 15 minutos. Após a lavagem, os anticorpos secundários IgG conjugados com peroxidase (anti-coelho e anti-camundongo; diluição 1:10.000) foram aplicados à membrana e uma incubação por 2 horas à temperatura ambiente foi realizada. Após esse período, as membranas foram lavadas novamente. Finalmente, as bandas imunorreativas foram detectadas utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Pierce) através de fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS – Bio-Rad). Após a exposição, a membrana foi submetida ao processo de “stripping” e foi incubada com um anticorpo anti-β-actina. Após a lavagem, o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-camundongo; diluição 1:10.000) foi aplicado à membrana e uma incubação por 2 horas à temperatura ambiente foi realizada e as membranas foram lavadas novamente. Os demais passos foram semelhantes aos processos realizados para detecção de pró-BDNF. A densitometria das bandas foi avaliada utilizando-se o programa Image Lab. SeeBlue® Plus2 Prestained Standard (Invitrogen). Foi utilizado um marcador de peso molecular para certificar-se de que as bandas corretas dos anticorpos descritos anteriormente foram analisadas.

3.3.2 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

Determinação de Peroxidação Lipídica (TBA-RS)

Para determinação dos níveis de TBA-RS, hipocampo, estriado e córtex cerebral foram homogeneizados em tampão PBS gelado (pH 7,4). Logo após o homogeneizado foi precipitado por meio de uma reação ácida com ácido tricloroacético (TCA, Vetec®) a 10 % com sulfato de sódio adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich®) 0,67 % na proporção de 1:1(v/v). A mistura foi levada a um banho fervente durante 25 min e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3-tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBA-RS/mg de proteína⁻¹ (Esterbauer e Cheeseman, 1990).

Determinação do dano oxidativo a proteínas

O conteúdo de proteínas carboniladas foi avaliado pela medida de grupos carbonila conforme descrito por Levine e colaboradores (1994). Para tal, hipocampo, estriado e córtex cerebral foram homogeneizadas em tampão PBS gelado (pH 7,4). Logo após, as amostras obtidas foram precipitadas pela adição de ácido clorídrico (Vetec[®]) e as proteínas dissolvidas com 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH, Sigma-Aldrich[®]). Os grupos carbonila formados pela reação foram medidos em espectrofotômetro pela absorbância a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

Atividade da SOD

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Bannister e Calabrese (1987). Primeiramente, foram realizadas leituras da auto-oxidação da adrenalina. Após, foram adicionados à amostra CAT 10 mM, tampão glicina 50 mM e adrenalina 60 mM, e ao branco foi adicionada adrenalina 60 mM. A atividade enzimática foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente em 480 nm à temperatura ambiente. A atividade da enzima foi expressa em U/mg de proteína (unidade de atividade da SOD por mg de proteína).

Atividade da CAT

As amostras foram suspensas em tampão PBS (cloreto de sódio 137 mM, cloreto de potássio 2,7 mM, fosfato de potássio monobásico 1,4 mM, fosfato de sódio dibásico 4,3 mM, pH 7,4) e uma alíquota desta suspensão foi diluída em PBS. Posteriormente uma alíquota desta diluição foi novamente diluída em tampão PBS. Após centrifugação da solução resultante, o meio reacional foi preparado com a adição de peróxido de hidrogênio 8,8 M e tampão CAT. O branco foi preparado sem a adição de H₂O₂ e a atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do H₂O₂ em 240 nm à temperatura ambiente nos tempos 0, 30, 60 e 90 segundos. A atividade da CAT foi expressa em U/mg de proteína (unidade de atividade da CAT por mg de proteína) (Aebi,1984).

3.3.3 Dano ao DNA

O dano ao DNA foi avaliado através do teste cometa, de acordo como protocolo proposto por Tice e colaboradores (2000). Os esfregaços de hipocampo, estriado ou córtex cerebral foram preparados pela mistura de 5 μL de homogeneizado em tampão PBS com 90 μL de agarose de baixo peso de fusão (LMP) (0,75%). A mistura (células/agarose) foi adicionada a uma lâmina revestida com uma camada de 300 μL de agarose NMP. Após a solidificação, as lâminas foram postas em soluções de lise (NaCl 2.5M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM, pH 10,0 – 10,5), adicionadas a Triton X-100 1 % e dimetilsulfóxido (DMSO) 10 %. Subsequentemente, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH 12,6) por 30 minutos. O DNA foi electrofosforisado por 30 minutos em 25 V (0,90 V/cm) e 300 mA e o tampão foi neutralizado com Tris 0,4 M (pH 7,5). Finalmente, o DNA foi corado com brometo de etídio e as lâminas coradas foram analisadas em microscópio óptico de fluorescência com aumento de 200 a 400 x. A extensão dos danos ao DNA foi avaliada usando o método de classificação visual de Collins (Collins, 2004). As células foram avaliadas visualmente em cinco classes, de acordo com o tamanho e forma da cauda (sem danos - classe 0 até danos máximos - classe 4). Para cada amostra, foram calculados dois parâmetros de avaliação: índice de dano (ID), definido como o dano total sofrido e a frequência de dano (FD), definida como o número de células que sofreram algum tipo de dano expresso em forma de percentagem.

3.3.4 Dosagem de proteínas

A proteína total foi avaliada pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises neuroquímicas, os resultados foram apresentados como a média \pm desvio padrão da média. Os testes para determinar a normalidade e igualdade de variância foram realizados para verificar se os dados estavam qualificados para a realização de testes estatísticos paramétricos. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) com variâncias iguais entre as amostras (teste de igualdade de variâncias, $p > 0,05$). Portanto, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes para a comparação de duas médias e as diferenças

entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas em um computador compatível com IBM usando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (Armonk, New York, USA).

4 RESULTADOS

No presente trabalho, inicialmente analisou-se os níveis proteicos de BDNF, pró-BDNF e NGF em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de idade, 1 hora após a administração ICV de CIC. Observou-se que a administração aguda de CIC diminuiu os níveis de BDNF total em todas as estruturas cerebrais estudadas, quando comparados com os animais do grupo controle (Figura 6).

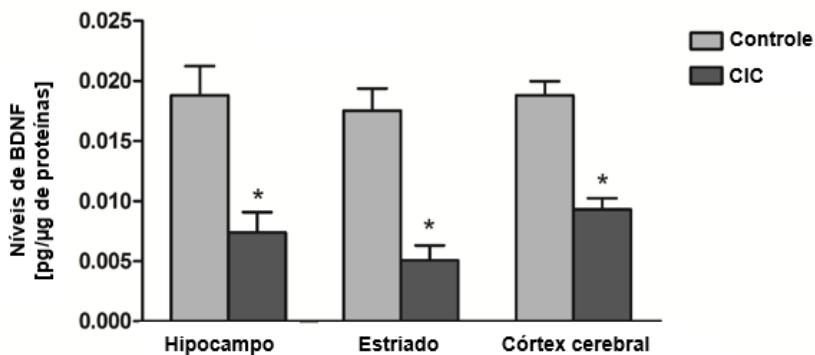


Figura 6. Efeito da administração ICV aguda de CIC sobre os níveis proteicos de BDNF em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida. Dados expressos como média \pm desvio padrão da média para 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

Na sequência, analisaram-se os níveis proteicos de pró-BDNF, uma vez, que através do teste de ELISA, não há como distinguir o pró-BDNF de BDNF maduro (mBDNF), visto serem igualmente reconhecidos pelo anticorpo utilizado. Os resultados demonstraram que os níveis proteicos de pró-BDNF não foram alterados em hipocampo, estriado e córtex cerebral após a administração aguda de CIC em ratos com 30 dias de idade, quando comparados ao grupo controle (Figura 7).

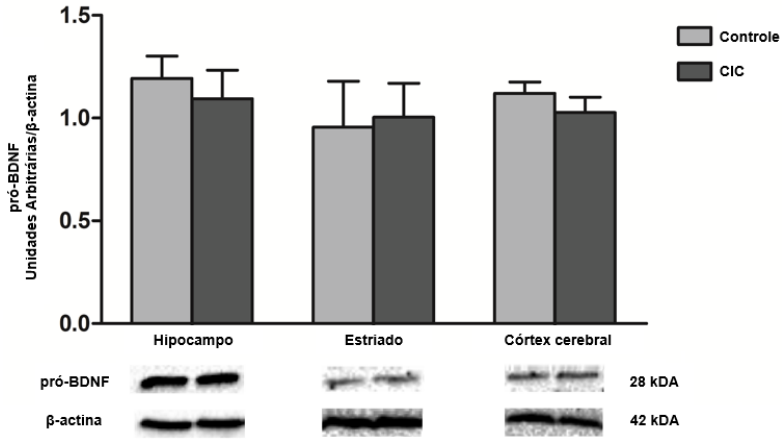


Figura 7. Efeito da administração ICV aguda de CIC sobre os níveis proteicos de pró-BDNF em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida. A figura mostra bandas representativas de *immunoblotting* dos diferentes grupos. A razão entre a densidade óptica integrada (DOI) da proteína de interesse e da β -actina foi utilizada para análise estatística. Dados estão expressos como média \pm desvio padrão da média para 6 animais por grupo. Não foi identificada nenhuma diferença significativa entre os grupos (teste *t* de Student).

Analisou-se também os efeitos da administração de CIC sobre os níveis proteicos de NGF em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos. Os resultados demonstraram uma redução estatisticamente significativa dos níveis de NGF em hipocampo quando comparados ao grupo controle. No entanto, os níveis de NGF não foram afetados em estriado e córtex cerebral dos animais que receberam CIC (Figura 8).

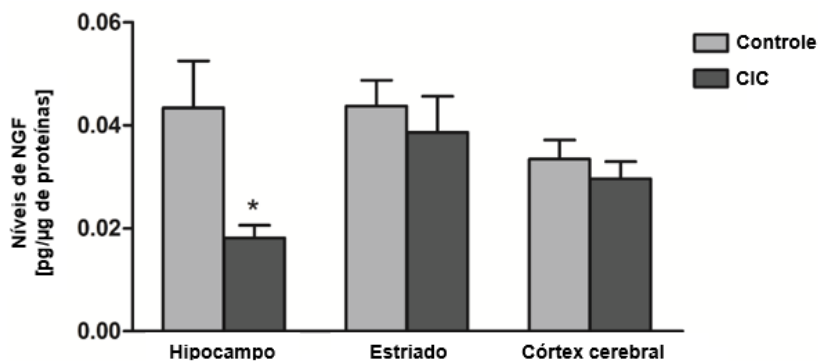


Figura 8. Efeito da administração ICV aguda de CIC sobre os níveis proteicos do fator de crescimento neural (NGF) em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida. Dados expressos estão como média \pm desvio padrão da média para 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

O próximo passo do estudo foi avaliar o efeito da administração ICV do CIC sobre parâmetros de estresse oxidativo em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos 1 hora após a administração. Os resultados demonstraram um aumento significativo nos níveis de TBA-RS em hipocampo, estriado e córtex cerebral, quando comparados ao grupo controle (Figura 9A). Da mesma forma, um aumento significativo na quantidade de proteínas carboniladas em todas as estruturas analisadas foi observado (Figura 9B).

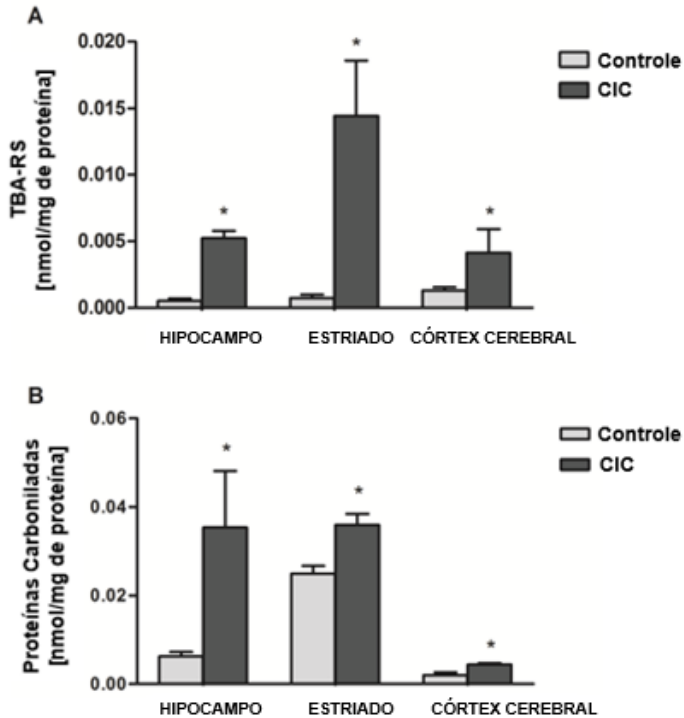


Figura 9. Efeito da administração intracerebroventricular de CIC sobre níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (A) e proteínas carboniladas (B) em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida. Os dados expressos como média \pm desvio padrão da média para 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

Analisou-se também os efeitos do CIC sobre a atividade das enzimas CAT e SOD, observando-se diminuição estatisticamente significativa da atividade da CAT apenas em estriado de ratos, quando comparados ao grupo controle (Figura 10A). Por outro lado, observou-se um aumento estatisticamente significativo da atividade da SOD em hipocampo e estriado de ratos, quando comparados ao grupo controle (Figura 10B).

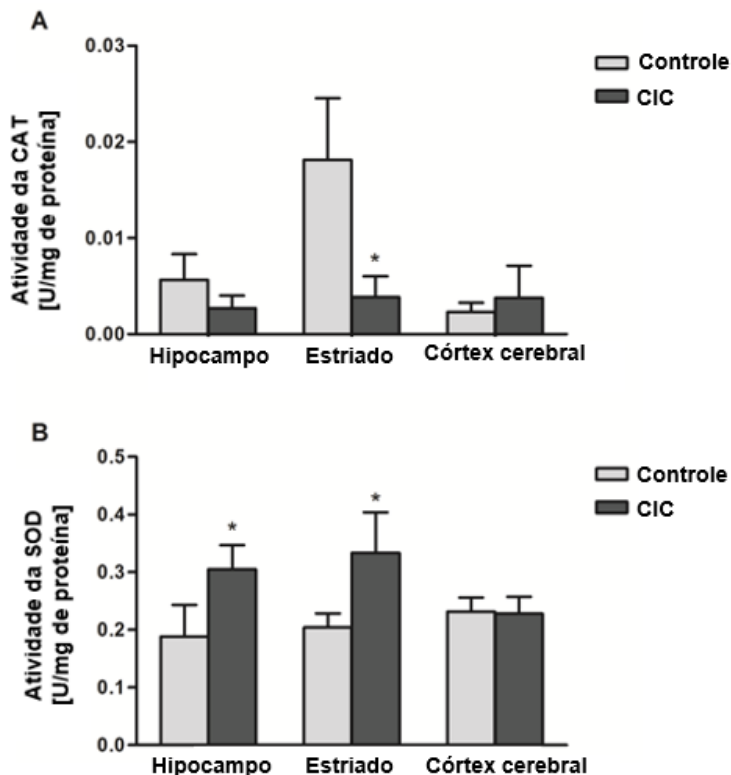


Figura 10. Efeito da administração intracerebroventricular de CIC sobre a atividade da catalase (CAT) (A) e superóxido dismutase (SOD) (B) em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida. Dados expressos como média \pm desvio padrão da média para 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste *t* de Student).

Por fim, avaliaram-se os efeitos da administração ICV de CIC sobre o dano ao DNA. A figura 11A demonstra um aumento significativo do ID após a administração, em hipocampo, estriado e córtex cerebral, quando comparados ao grupo controle. Além disso, verificou-se também um aumento significativo na FD após a administração de CIC em todas as estruturas analisadas (Figura 11B).

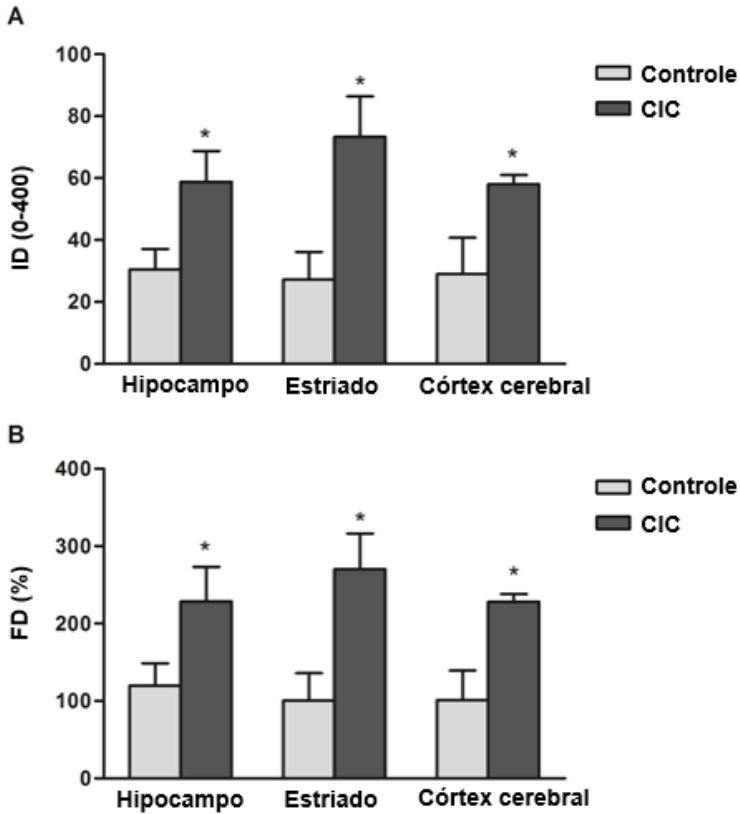


Figura 11. Efeito da administração intracerebroventricular de CIC sobre o índice de dano (ID) (A) e a frequência de dano (FD) (B) em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida. Dados expressos como média \pm desvio padrão da média para 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

5 DISCUSSÃO

Estudos prévios demonstraram que a administração aguda de AACR em ratos jovens aumentou os níveis de pró-BDNF, BDNF total e tPA em estriado e diminuiu os níveis de NGF em hipocampo (Scaini et al., 2013b; Scaini et al., 2015). Entretanto, não há estudos na literatura que relatam os efeitos dos CACR sobre os níveis de BDNF e NGF. Assim, no presente estudo, foram investigados os efeitos da administração ICV de CIC sobre os níveis de BDNF, pró-BDNF e NGF em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos jovens. Os resultados demonstraram que a administração aguda de CIC provocou uma diminuição dos níveis de BDNF em todas as estruturas cerebrais estudadas e um efeito semelhante sobre os níveis de NGF, cujos níveis encontraram-se reduzidos em hipocampo.

As NTs têm importância significativa para o desenvolvimento neuronal, controle do crescimento dos neuritos, diferenciação e sobrevivência celular, plasticidade sináptica e regulação funcional, através da sua ligação aos receptores TrkA e TrkB, levando a dimerização do receptor, autofosforilação de tirosinas intracelulares específicas e a ativação de três cascatas de transdução de sinais diferentes, incluindo MAPK/ERK, PI3K e fosfolipase C, levando assim à regulação do fator de transcrição CREB (Huang e Reichardt, 2001). Durante o desenvolvimento, as NTs estão expressas em regiões invadidas por axônios sensoriais que se encontram na rota final dos órgãos alvos, podendo prover suporte trófico aos neurônios que não se encontram ainda, conectados com estes órgãos (Fariñas et al., 1996, Fariñas et al., 1998; Huang et al., 1999, Ringstedt et al., 1999). Estudos demonstraram que o NGF é sintetizado e secretado por órgãos alvo simpáticos e sensoriais (Korsching, 1993). A partir destes locais, é captado pelos receptores mediados pela endocitose das terminações nervosas, sendo então transportado através dos axônios para o corpo neuronal, no qual atua como promotor da sobrevivência e diferenciação neuronal (Huang e Reichardt, 2001). Estudos subsequentes, demonstraram que em neurônios periféricos lesados, em que há infiltrado de macrófagos como parte de uma resposta anti-inflamatória e liberação de citocinas, há indução de síntese de NGF a partir das células de Schwann e dos fibroblastos das próprias células lesadas (Korsching, 1993). Estudos realizados por Mannion et al., (1999) e Brady et al., (1999) demonstraram que vários neurônios sensoriais sintetizam BDNF. Embora evidências tenham sugerido que o BDNF possa atuar como suporte trófico autócrino ou parácrino para neurônios sensoriais dos gânglios da raiz dorsal (Acheson

et al., 1995; Robison et al., 1996), em outra instância o BDNF pode ser transportado de modo anterógrado e agir trans-sinápticamente sobre alvos aferentes de neurônios cerebrais (von Bartheld et al., 1996; Altar et al., 1997; Fawcett et al., 1998; Brady et al., 1999). Assim, em algumas circunstâncias, uma NT não fornece suporte trófico apenas para neurônios localizados na vizinhança, mas também pode promover suporte trófico para neurônios distantes, através de transporte transcelular (Huang e Reichardt, 2001).

Além disso, as NTs influenciam a complexa e dinâmica sinalização que ocorre entre neurônios e células gliais que regulam a mielinização. Walsh e colaboradores (1999) demonstraram que a suplementação de NGF induziu o crescimento de axônios simpáticos cerebrais de mamíferos adultos, em ambiente mielinizado. Estudos também tem demonstrado que, em baixas concentrações, o NGF aumenta a sobrevivência de oligodendrócitos (Cohen et al., 1996), a regeneração e proliferação da fibra (Althaus et al., 1992), enquanto que concentrações elevadas (100 ng/mL) induz a apoptose de oligodendrócitos corticais maduros (Casaccia-Bonnet et al., 1996). Demonstrou-se também que o NGF regulou a expressão da proteína básica de mielina MBP e da proteolipoproteína PLP em oligodendrócitos através da interação com os receptores $p75^{NTR}$ e TrkA (Du et al., 2006). No entanto, Chan e colaboradores (2004) demonstraram que a sinalização axonal regulada pelo NGF tem efeitos opostos sobre a mielinização periférica e central, sendo que a sinalização das células de Schwann é promovida, enquanto que a mielinização pelos oligodendrócitos é reduzida. Por outro lado, estudos têm demonstrado que o aumento da expressão do NGF no SNC é um importante passo para a migração das células de Schwann para fora do gânglio da raiz dorsal, com fins de reparo de áreas desmielinizadas (Anton et al., 1994; Carroll e Jennings, 1994).

Estudos também evidenciaram efeitos do BDNF sobre o processo de mielinização. Cellerino e colaboradores (1997) mostraram que o BDNF controlou a mielinização em camundongos deficientes de BDNF que exibiram hipomielinização do nervo óptico, sugerindo que o BDNF influencia a sinalização axonal que direciona a mielinização dos axônios das células ganglionares da retina que expressam o receptor TrkB. Esses mesmos autores mostraram que análises em hipocampo e córtex cerebral apresentaram reduções significativas dos níveis de mRNA da MBP, PLP e glicoproteína associada à mielina (MAG). Estudos *in vitro* identificaram que o BDNF exerce efeitos diretos sobre oligodendrócitos, promovendo a proliferação e diferenciação de células progenitoras de oligodendrócitos, bem como a mielinização através da ativação dos

receptores TrkB endógenos em oligodendrócitos (Xiao et al., 2010). Um estudo publicado por Du e colaboradores (2003) demonstrou que o BDNF pode aumentar os níveis de MBP em oligodendrócitos em cultura derivadas do prosencéfalo basal de ratos, demonstrando que o BDNF aumenta o número de células MBP⁺, sem afetar o número total de células, sugerindo que o BDNF pode promover a progressão da linhagem de oligodendrócitos, influenciando não só a sobrevivência de neurônios, mas também a comunicação do neurônio com estruturas alvo de regiões cerebrais críticas. Adicionalmente, camundongos BDNF^{+/-} exibiram déficits em células de linhagem de oligodendrócitos do prosencéfalo basal, através de uma redução dos níveis de MBP, MAG e PLP, sugerindo que as células progenitoras e a mielina podem ser afetadas *in vivo* por uma redução nos níveis de BDNF (Vondran et al., 2010). Utilizando mielinização *in vitro* e coculturas compartimentalizadas, Xiao e colaboradores (2010) indicaram que o BDNF melhora a mielinização via ação direta sobre os oligodendrócitos. Cosgaya e colaboradores (2002) demonstraram que o BDNF, através da ativação do receptor p75^{NTR}, aumenta a mielinização periférica. Além disso, estudos demonstraram a importância da relação sinérgica recíproca entre NGF e BDNF e o reconhecimento de suas potenciais implicações na formação e reparo da mielina (Reichardt 2006; Canossa et al., 1997; Michael et al., 1997).

O NGF e BDNF também desempenham um papel chave no ajuste fino dos desempenhos de aprendizagem e memória. De fato, a depleção de BDNF cerebral endógeno através da utilização de um anticorpo específico resultou em uma deficiência significativa de aprendizagem espacial e memória de curto prazo, sugerindo que o BDNF pode ser necessário para a aquisição destes processos em animais adultos (Mu et al., 1999). Dias e colaboradores (2009) descreveram uma associação positiva entre os níveis séricos de BDNF e um teste de fluência verbal em humanos, sugerindo mais uma vez a importância do BDNF em processos neurocognitivos. Adicionalmente, a deficiência do gene *Bdnf* (*Bdnf*^{+/-}) está associada à aprendizagem espacial deficiente tanto em camundongos ApdE9 (modelo animal de doença de Alzheimer), quanto em camundongos duplo-mutantes gerados pelo cruzamento de deficientes de BDNF e camundongos APdE9 (Rantamäki et al., 2013). Estudos também têm demonstrado a importância do BDNF na consolidação da LTP precoce e tardia, visto que a deleção do gene *bdnf* em camundongos *knockout* prejudica a indução normal da LTP precoce na região CA1 em fatias hipocâmpais (Korte et al., 1995), assim como estimula a síntese e o rápido transporte para os dentritos de moléculas de mRNA do gene *Arc* (proteína associada ao citoesqueleto regulado pela atividade de moléculas

de genes de expressão imediata), que apresenta função na LTP tardia (Bramhan, 2008). Confirmando tal hipótese, estudos têm demonstrado que a expressão gênica de BDNF aumenta no hipocampo de ratos após o treino do labirinto aquático de Morris, labirinto radial, esQUIVA passiva e condicionamento ao medo contextual (Kesslak et al., 1998; Ma et al., 1998; Hall et al., 2000; Mizuno et al., 2000).

Com relação ao NGF, Conner e colaboradores (2009) demonstraram que o bloqueio de NGF endógeno por infusão anti-NGF reduz a LTP em hipocampo e prejudica a retenção da memória, assim como uma infusão intracerebroventricular contínua de NGF aumenta o aprendizado e a retenção de memória na esQUIVA passiva em camundongos em desenvolvimento (Ricceri et al., 1996). Bergado e colaboradores (1998) relataram que a administração crônica de NGF intracerebroventricular em ratos velhos melhora a LTP no giro denteado. Este resultado é consistente com um estudo prévio que relatou que a infusão de NGF localizada na região CA1 do hipocampo aumentou a atividade da MAPK, bem como forma a retenção da memória no teste de esQUIVA inibitória, dependente da dose (Walz et al., 2000). Confirmando esses dados, estudos também têm demonstrado que os níveis proteicos e de mRNA de BDNF e NGF estão diminuídos em tecido cerebral *post-mortem* de pacientes com doença de Alzheimer, e essas reduções nos níveis de BDNF e NGF se correlacionam com o grau de comprometimento cognitivo (Hock et al., 2000; Garzon et al., 2002; Mufson et al., 2003; Peng et al., 2005; Gelfo et al., 2011).

Apesar de se desconhecer o exato mecanismo através do qual o CIC induz a redução nos níveis de BDNF e NGF quando administrado de forma aguda, evidências a partir da literatura demonstraram que o estresse oxidativo provoca alterações seletivas nas cascatas de sinalização ativadas por BDNF e NGF através de vários mecanismos, incluindo a fosforilação da proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p38MAPK), diminuição da fosforilação da proteína de ligação dos elementos responsivos ao cAMP (CREB) ou aumento da atividade da ligação ao DNA do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B) (Iwata et al., 1997; Haddad e Land, 2002; Zou e Crews, 2006). Além disso, Jean e colaboradores (2008) demonstraram que o GLU, através de seus receptores metabotrópicos promoveram a síntese e a secreção de BDNF em cultura de astrócitos cerebrais. Estudos também demonstraram que o GLU aumentou a secreção de BDNF em neurônios hipocampais e em células gliais, bem como em células de Schwann e em células de Müller (Canossa et al., 2001; Taylor et al., 2003; Verderio et al., 2006). Assim, o decréscimo dos níveis de GLU e o estresse oxidativo previamente

demonstrado em modelos animais de DXB e em pacientes (Yudkoff e Daikhin, 2005; Zinnanti et al., 2009; Sitta et al., 2014) podem apresentar uma estreita relação com o decréscimo dos níveis de BDNF e NGF provocados pelo CIC neste estudo.

Como sugerido anteriormente, a diminuição dos níveis de BDNF e NGF pode ser causada pela indução do estresse oxidativo. Sendo assim, o próximo passo deste estudo foi analisar os parâmetros de estresse oxidativo após a administração aguda de CIC, bem como sobre a atividade das enzimas CAT e SOD em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos com 30 dias. Estudos realizados por Mescka e colaboradores (2011), em modelos animais DXB quimicamente induzidos, demonstraram lipoperoxidação e dano a proteínas em córtex cerebral de ratos, ao passo que a atividade da CAT e da GPx foi diminuída. Estudos *in vitro* também demonstraram lipoperoxidação lipídica e redução da reatividade antioxidante cerebral estimuladas pela administração de LEU e CIC em homogeneizados cerebrais de ratos jovens (Fontanella et al., 2002; Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005a). Além disso, o plasma de pacientes com DXB apresenta um aumento significativo dos níveis das TBA-RS, bem como uma diminuição da reatividade antioxidante total, o que reflete uma deficiente capacidade para lidar rapidamente com o aumento de espécies reativas (Barschak et al., 2008; Barschak et al., 2009; Mescka et al., 2013). Reforçando a hipótese do envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da DXB, estudos em modelos animais e em pacientes com DXB têm demonstrado o efeito benéfico do tratamento com L-carnitina, um possível antioxidante, sobre o dano lipídico, proteico e ao DNA, bem como sobre a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (Mescka et al., 2011; Mescka et al., 2013; Mescka et al., 2014; Mescka et al., 2015). Corroborando estes resultados, verificou-se no presente estudo que o conteúdo de proteínas carboniladas, um índice útil de oxidação de proteínas, foi significativamente aumentado em todas as estruturas estudadas, indicando dano oxidativo, bem como um aumento dos níveis das TBA-RS, indicando lipoperoxidação. Tais alterações foram acompanhadas por uma diminuição da atividade da CAT em estriado e um aumento da atividade da SOD em hipocampo e estriado. A CAT é uma enzima que catalisa diretamente a decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 , sendo responsável juntamente com a GPx pela desintoxicação dos peróxidos (Halliwell e Gutteridge, 2007). A inibição de ambas ou, no caso deste estudo, da CAT, pode levar a um prejuízo na eliminação deste substrato (Muthuswamy et al., 2006). Em contraste, o aumento na atividade da SOD, enzima responsável por dismutar o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 pode

sugerir um aumento de radicais hidroxila, visto que a alteração das atividades da SOD e da CAT demonstrada nesse estudo leva a um desequilíbrio na relação SOD/CAT. Assim, um aumento da atividade de SOD ocorrendo simultaneamente com diminuição da atividade de CAT pode resultar em um aumento na concentração de H_2O_2 no seu sítio de produção, em decorrência de sua produção a partir de $O_2^{\bullet-}$. Havendo atividade de SOD aumentada e consequente aumento na concentração de H_2O_2 , e redução na atividade de CAT que dismuta H_2O_2 à H_2O , isto pode favorecer a produção de OH^{\bullet} através da reação de Fenton (Halliwell e Gutteridge, 2007). Além disso, o H_2O_2 é relativamente estável e capaz de se difundir para o núcleo, onde pode reagir com metais de transição associados ao DNA e formar então o radical OH^{\bullet} (Halliwell, 1996; Ferreira e Matsubara, 1997; Halliwell e Gutteridge, 2007).

O estresse oxidativo tem sido apontado como um importante causador de danos cerebrais em distúrbios neurodegenerativos, convulsões e desmielinização (Halliwell, 2001; Karelson et al., 2001; Méndez-Alvarez et al., 2002), provavelmente pelo cérebro apresentar níveis relativamente baixos de defesas antioxidantes. Ainda, a nível cerebral há elevado consumo de oxigênio, membranas neuronais com grande quantidade de lipídeos poli-insaturados (altamente suscetíveis à lipoperoxidação) e autooxidação de neurotransmissores (dopamina e noradrenalina). Estes geram espécies reativas e podem aumentar a autooxidação pela presença do ferro, metal amplamente distribuído no tecido cerebral e que estimula a reação de Fenton (Halliwell e Gutteridge, 2007). Além disso, as EROs especialmente o OH^{\bullet} , pode induzir danos ao DNA (Culmsee e Mattson, 2005; Cooke et al., 2006) que, sob certas condições, podem levar a mutações no DNA. Por exemplo, o OH^{\bullet} pode se ligar à guanina na posição 8 do anel purínico, levando à formação da 8-oxo-7,8-di-hidroguanina (Halliwell e Gutteridge, 2007). A modificação oxidativa do DNA pode ter outros efeitos de grande alcance na função celular, impactando telômeros, promotores, sequências de microssatélites e sítios de metilação (Halliwell e Gutteridge, 2007; Gros et al., 2012). Neste contexto, os resultados do presente estudo corroboram tal hipótese, que a administração ICV aguda de CIC induziu estresse oxidativo e ocasionou dano ao DNA em todas as estruturas estudadas. Além disso, as EROs podem interagir com receptores de neurotransmissores e com proteínas de transporte, assim como a peroxidação dos lipídeos da membrana também pode levar a uma menor densidade do receptor devido a perturbações na integridade e fluidez da membrana, o que diminui a mobilidade e acessibilidade de receptores de superfície celular (Halliwell, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2007). Assim, os efeitos observados em

sistemas de neurotransmissores excitatórios previamente demonstrado em pacientes com DXB e modelos animais (Prensky e Moser, 1967; Dodd et al., 1992; Tavares et al., 2000; Chuang e Shih, 2001) pode ser mediado por alterações nos transportadores de GABA e GLU causada por EROs (Danbolt, 2001; Sah et al., 2002).

Outros estudos também têm demonstrado que o estresse oxidativo pode contruibuir para os processos de desmielização e lesão axonal (Back et al., 1998; Fern e Möller, 2000; Baud et al., 2004; Folkerth et al., 2004) através de vários mecanismos, incluindo o comprometimento da função mitocondrial devido ao acúmulo de mutações no DNA mitocondrial (mtDNA), conduzindo à deficiência energética, oxidação de proteínas e lipídeos, e degradação dos microtúbulos, prejudicando assim o transporte axonal e o apoio estrutural (Beal, 2005; Coleman, 2005; Counterman et al., 2006). Além disso, estudos têm implicado o estresse oxidativo como o mecanismo principal para a lesão da substância branca (Back et al., 1998; Back et al., 2002; Mekki-Dauriac et al., 2002). Reid e colaboradores (2012) trataram *in vitro* precursores de oligodendrócitos com agentes que induzem estresse oxidativo e observaram um aumento da sinalização da proteína morfogenética óssea (BMP) que, por sua vez, inibe a diferenciação de precursores de oligodendrócitos, conduzindo à mielinização prejudicada. Além disso, os mesmos autores observaram que os defeitos de diferenciação e mielinização podem ser prevenidos pelo bloqueio da sinalização de BMP, mesmo na presença de estresse oxidativo. French e colaboradores (2009) demonstraram que o estresse oxidativo perturba a maturação dos oligodendrócitos por diminuir a expressão de fatores de transcrição e proteínas nucleares necessárias para a diferenciação, tais como fatores de transcrição específicos para oligodendrócitos (Olig 1 e Olig 2) e SOX10, e aumenta a expressão de Id2 e Id4 e histonas acetiladas H3 e H4, inibidores da diferenciação oligodendrocítica.

No que se refere ao mecanismo pelo qual o CIC possa induzir o estresse oxidativo, deve-se considerar que o aumento na produção de EROs pode estar associado ao metabolismo energético cerebral prejudicado. De fato, os CACR causam uma redução na produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de [^{14}C] acetato, estimulam a produção de lactato e a absorção de glucose e provocam uma inibição significativa na atividade do complexo I-III, aproximadamente 50-60 %, sem alterar a atividade dos complexos II, II-III, III, IV e succinato desidrogenase. Com base nesses resultados, os autores presumiram que a atividade do complexo I foi bloqueada pelo CACR (Sgaravatti et al., 2003). Além disso, o CIC também atua como um desacoplador da fosforilação oxidativa e como um

inibidor metabólico, através do seu efeito inibitório sobre a atividade da α -cetoglutarato desidrogenase (Amaral et al., 2010). Adicionalmente, Strand e colaboradores (2014) demonstraram danos no DNA mitocondrial (mtDNA) e ao DNA nuclear, com uma redução correspondente na transcrição mitocondrial, no número de cópias do mtDNA e da piruvato desidrogenase, bem como uma diminuição na razão NAD^+/NADH em fibroblastos de pacientes com DXB e um aumento do nível de dano ao DNA foi observado em fibroblastos de controles saudáveis após a exposição aos CACR. Sabe-se que a atividade alterada de um complexo mitocondrial pode aumentar a produção de EROs, uma vez que a formação de radicais superóxido pode ocorrer através do vazamento de elétrons da cadeia transportadora de elétrons e redução incompleta do oxigênio molecular (Boveris e Chance, 1973; Turrens e Boveris, 1980). Assim, é possível que a disfunção mitocondrial descrita possa ser um dos mecanismos pelo qual o CIC induz o estresse oxidativo. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que a inibição do complexo I por estes compostos pode ter ocorrido por oxidação de subunidades essenciais do presente complexo, visto que a atividade do complexo I é muito sensível às EROs, onde estes podem causar uma oxidação reversível de grupos sulfidrílo ou uma modificação oxidativa de irreversível de centros ativos da enzima, alterando assim a atividade da enzima (Zhang et al., 1990; Dupius et al., 1991; Kudin et al., 2002).

Foi demonstrado nesse trabalho que a administração ICV aguda de CIC induziu uma diminuição nos níveis de BDNF e NGF, assim como um aumento do dano lipídico, proteico e ao DNA em cérebro de ratos, acompanhado por uma diminuição da atividade da CAT e um aumento da atividade da SOD. Considerando que o estresse oxidativo pode causar diferentes modulações em vias de sinalização envolvidas com essas NTs, pode-se sugerir que o estresse oxidativo possa ser o responsável por essas modulações. Além disso, como previamente descrito, tem-se relatado que os AACR podem causar desmielinização e prejuízos à performance da memória. Pode-se portanto especular que efeitos do CIC sobre a desmielinização e os processos de memória podem ser mediados pela redução do suporte trófico de BDNF e NGF e pelo estresse oxidativo. Além disso, os baixos níveis de BDNF e NGF são consistentes com a hipótese que um déficit nestes fatores neurotróficos pode contribuir para alterações estruturais e funcionais do cérebro subjacentes à fisiopatologia da DXB, apoiando a hipótese do processo neurodegenerativo na DXB.

6 CONCLUSÃO

Frente aos objetivos iniciais propostos por esta tese, conclui-se que a administração ICV aguda de CIC:

- Reduziu os níveis proteicos de BDNF em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos jovens;
- Diminuiu os níveis proteicos de NGF em hipocampo;
- Induziu dano oxidativo lipídico, proteico e ao DNA em hipocampo, estriado e córtex cerebral dos animais com 30 dias de vida;
- Ocasinou uma diminuição da atividade enzimática da CAT em estriado e um aumento da atividade enzimática da SOD em hipocampo e estriado.

—

REFERÊNCIAS

- Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*. 1995; 374:450–53.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105:121–126.
- Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006; 18:325:32.
- Aloe L. Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. *Trends Cell Biol*. 2004; 14:395-9.
- Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*. 1997; 389:856–60.
- Althaus HH, Klöppner S, Schmidt-Schultz T, Schwartz P. Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain. *Neurosci Lett*. 1992; 135(2):219-23.
- 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.
- Anderson JW, Davidson MH, Blonde L, Brown WV, Howard WJ, Ginsberg H, Allgood LD, Weingand KW. Long-term cholesterol-lowering effects of psyllium as an adjunct to diet therapy in the treatment of hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71:1433-8.
- Anton ES, Weskamp G, Reichardt LF, Matthew WD. Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad of Sci USA*. 1994; 91:2795-9.
- Asmus K-D, Bonifačić M. Free radical chemistry. In: Sen CK, Packer L, Hänninen OP. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. Amsterdam: Elsevier, 2000. p. 3-54.
- Back SA, Gan X, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci*. 1998; 18(16):6241–53.
- Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S, Tam J, Arvin KL, Holtzman DM. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci*. 2002; 22(2):455–63.
- Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease: a review. *East Mediterr Health J*. 1998; 4(2):350-60.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987; 32:279–312.

- Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1995; 7(2):148-55.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982; 1(5):549-53.
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, Barden AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment *Metab Brain Dis.* 2008; 23(1):71-80.
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, Busanello ENB, Coelho DM, Cipriani F, Dutra-Filho CS, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Amino acids levels and lipid peroxidation in maple syrup urine disease patients. *Clin Biochem.* 2009; 42(6):462-6.
- Baud O, Li J, Zhang Y, Neve RL, Volpe JJ, Rosenberg PA. Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *Eur J Neurosci.* 2004; 20(7):1713-26.
- Beal MF. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol.* 2005; 58(4): 495–505.
- Benedetti M, Levi A, Chao MV. Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90(16):7859-63.
- Ben-Menachem E, Kyllerman R, Marklund S. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. *Epilepsy Res.* 2000; 40(1):33-9.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Bioquímica*. 6ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2010.
- Bergado JA, Gomez-Soria AA, Cruz R, Fernandez CI. Nerve growth factor improves evoked potentials and long-term potentiation in the dentate gyrus of presenile rats. *European Journal of Pharmacology.* 1998; 345:181-4.
- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A. Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trkA and trkB. *Neuron.* 1991; 7(5):857-66.
- Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 2000; 14(23):2919–37.
- Bibel M, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75^{NTR}. *EMBO J.* 1999; 18(3):616-22.
- Bimonte HA, Nelson ME, Granholm AC. Age-related deficits as working memory load increases: relationships with growth factors. *Neurobiol Aging.* 2003; 24(1):37-48.

- Bird S, Miller NJ, Collins JE, Rice-Evans CA. Plasma antioxidant capacity in two cases of tyrosinaemia type 1: one case treated with NTBC. *J Inher Metab Dis*. 1995; 18(2):123-6.
- Bonnefoy M, Draï J, Kostka T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med*. 2002; 31(25):1174-84.
- Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 1973; 134(3):707-16.
- Brady R, Zaidi SI, Mayer C, Katz DM. BDNF is a target-derived survival factor for arterial baroreceptor and chemoafferent primary sensory neurons. *J Neurosci*. 1999; 19:2131-42.
- Bramham CR. Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr Opin Neurobiol*. 2008; 18(5):524-31.
- 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(6):327-32.
- 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(2):155-67.
- Bridi R, Latini A, Braum CA, Zorzi GK, Wajner M, 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(1):71-9.
- Buse MG, Biggers JF, Friderici KH, Buse JF: Oxidation of branched chain amino acids by isolated hearts and diaphragms of the rat. The effect of fatty acids, glucose, and pyruvate respiration. *J Biol Chem*. 1972; 247(24):8085-96.
- Calvo M, Artuch R, Macià 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(6):405-8.
- Canossa M, Gärtner A, Campana G, Inagaki N, Thoenen H. Regulated secretion of neurotrophins by metabotropic glutamate group I (mGluRI) and Trk receptor activation is mediated via phospholipase C signalling pathways. *EMBO J*. 2001; 20(7):1640-50.
- Canossa M, Griesbeck O, Berninger B, Campana G, Kolbeck R, Thoenen H. Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:13279-86.

- Carroll WM, Jennings AR. Early recruitment of oligodendrocyte precursors in CNS demyelination. *Brain*. 1994; 117(3):563-78.
- Casaccia-Bonnel P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature*. 1996; 383:716-9.
- Castellano S, Macchi F, Scali M, Huang JZ, Bozzi Y. Cytosolic branched chain aminotransferase (BCATc) mRNA is up-regulated in restricted brain areas of BDNF transgenic mice. *Brain Res*. 2006; 1108(1):12-8.
- Cellerino A, Carroll P, Thoenen H, Barde YA. Reduced size of retinal ganglion cell axons and hypomyelination in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci*. 1997; 9(5-6):397-408.
- Chan JR, Watkins TA, Cosgaya JM, Zhang C, Chen L, Reichardt LF, Shooter Em, Barres BA. NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron*. 2004; 43(2):183-91.
- Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(4):299-309.
- Chaplin ER, Goldberg AL, Diamond I. Leucine oxidation in brain slices and nerve endings. *J Neurochem*. 1976; 26(4):701-7.
- Chuang DT, Shih VE. Disorders of branched-chain amino and a-keto acid metabolism. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York, McGraw-Hill, 1995, p 1239.
- Chuang DT, Shih VE. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1971–2005.
- Chuang DT, Wynn RM, Shih VE. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudt AL, Sly WL, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2008. p. 1971-2005.
- Chuang JL, Cox RP, Chuang DT. E2 transacylase-deficient (type II) maple syrup urine disease: Aberrant splicing of E2 mRNA caused by internal intronic deletions and association with thiamine-responsive phenotype. *J Clin Invest*. 1997; 100(3):736-44.
- Chuang JL, Wynn RM, Moss CC, Song JL, Li J, Awad N, Mandel H, Chuang DT. Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients: a proposed mechanism for the thiamine-responsive phenotype. *J Biol Chem*. 2004; 279(17):17792-800.
- Cohen RI, Marmur R, Norton WT, Mehler MF, Kessler JA. Nerve growth factor and neurotrophin-3 differentially regulate the proliferation and

- survival of developing rat brain oligodendrocytes. *J Neurosci.* 1996; 16:6433–42
- Coitinho AS, de Mello CF, Lima TT, de Bastiani J, Figuera MR, Wajner M. Pharmacological evidence that alpha-ketoisovaleric acid induces convulsions through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *Brain Res.* 2001; 894:68-73.
- Coleman M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(11):889–98.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004; 26(3):249-61.
- Conner JM, Franks KM, Titterness AK, Russell K, Merrill DA, Christie BR, Sejnowski TJ, Tuszynski MH. NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. *J Neurosci.* 2009; 29(35):10883-9.
- Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta.* 2006; 365(1-2):30-49.
- Couce Pico ML, Castiñeiras Ramos DE, Bóveda Fontán MD, Iglesias Rodrigues AJ, Cocho de Juan JA, Fraga Bermúdez JM. Advances in the diagnosis and treatment of maple syrup urine disease: experience in Galicia (Spain). *An Pediatr (Barc).* 2007; 67(4):337:43.
- Counterman AE, D’Onofrio TG, Andrews AM, Weiss PS. A physical model of axonal damage due to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(14):5262–6.
- Culmsee C, Mattson MP. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 331(3):761-77.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001; 65(1):1–105.
- Dancis J, Hutzler J, Levitz M. Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine disease. *Biochim Biophys Acta.* 1960; 43:342-3.
- Danner DJ, Lemmon SK, Besharse JC, Elsas LJ. Purification and characterization of branched chain a-ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1979; 254(12):5522-6.
- de Baulny HO, Dionisi-Vici C, Wendel U. Branched-Chain Organic Acidurias/Acidaemias. In: Saudubray J-M, Berghe GVD, Walter JH, editors. *Inborn Metabolic Diseases: diagnosis and treatment.* 3th. 2012. p. 277-96.
- de Castro Vasques V, de Boer MA, Diligenti F, Brinco F, Mallmann F, Mello CF, Wajner M. Intrahippocampal administration of the alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease provokes learning deficits in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004; 77(1):183-90.

- de Luis Román DA, Izaola Jáuregui O. [Maple syrup urine disease; a rare entity that we must know. Review of its dietetic management. *An Med Interna*. 2005; 22(10):493-7.
- Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1980; 492:153-68.
- DeSantiago S, Torres N, Suryawan A, Tovar AR, Hutson SM. Regulation of branched-chain amino acid metabolism in the lactating rat. *J Nutr*. 1998; 128(7):1165-71.
- Dias VV, Brissos S, Frey BN, Andreazza AC, Cardoso C, Kapczinski F. Cognitive function and serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2009; 11(6):663-71.
- 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(2):582-90.
- Du J, Gould TD, Manji HK. Neurotrophic signaling in mood disorders. In: Gutkind JS, editor. *Signal transduction and human disease*. John Wiley & Sons; 2003. p. 411-46.
- Du Y, Fischer TZ, Clinton-Luke P, Lercher LD, Dreyfus CF. Distinct effects of p75 in mediating actions of neurotrophins on basal forebrain oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci*. 2006; 31(2):366-75.
- Du Y, Fischer TZ, Lee LN, Lercher LD, Dreyfus CF. Regionally specific effects of BDNF on oligodendrocytes. *Dev Neurosci*. 2003; 25:116-26.
- Dupius A, Skehel JM, Walker JM. NADH: ubiquinone oxidoreductase from bovine mitochondria. *Biochem J*. 1991; 277:11-5.
- Duran M, Tielens AG, Wadman SK, Stigter JC, Kleijer WJ. Effects of thiamine in a patient with a variant form of branched-chain ketoaciduria. *Acta Paediatr Scand*. 1978; 67(3):367-72.
- 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.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 407-21.
- Fariñas I, Wilkinson GA, Backus C, Reichardt LF, Patapoutian A. Characterization of neurotrophin and Trk receptor functions in developing sensory ganglia: direct NT-3 activation of TrkB neurons in vivo. *Neuron*. 1998; 21:325-34.

- Fariñas I, Yoshida CK, Backus C, Reichardt LF. Lack of neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors. *Neuron*. 1996; 17:1065–78.
- Fawcett JP, Bamji SX, Causing CG, Aloyz R, Ase AR. Functional evidence that BDNF is an anterograde neuronal trophic factor in the CNS. *J Neurosci*. 1998; 18:2808–21.
- Fern R, Möller T. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop. *J Neurosci*. 2000; 20(1):34–42.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*. 1997; 43(1):61-8.
- Fingerhut R. Recall rate and positive predictive value of MSUD screening is not influenced by hydroxyproline. *Eur J Pediatr*. 2009; 168(5):599-604.
- Fischer MH, Gerritsen T. Biochemical studies on a variant of branched chain ketoaciduria in a 19-year-old female. *Pediatrics*. 1971; 48(5):795-801.
- Fischer W, Victorin K, Björklund A, Williams LR, Varon S, Gage FH. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature*. 1987; 329(6134):65-8.
- Fisher CW, Chuang JL, Griffin TA, Lau KS, Cox RP, Chuang DT. Molecular phenotypes in cultured maple syrup urine disease cells. Complete E1 alpha cDNA sequence and mRNA and subunit contents of the human branched chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *J Biol Chem*. 1989; 264(6):3448-53.
- Folkerth RD, Haynes RL, Borenstein NS, Belliveau RA, Trachtenberg F, Rosenberg PA, Volpe JJ, Kinney HC. Developmental lag in superoxide dismutases relative to other antioxidant enzymes in premyelinated human telencephalic white matter. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004; 63(9):990-9.
- Fontella FU, Gassen E, Pulrolnik V, Wannmacher CM, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*. 2002; 17(1):47-54.
- French HM, Reid M, Mamontov P, Simmons RA, Grinspan JB. Oxidative stress disrupts oligodendrocyte maturation. *J Neurosci Res*. 2009; 87(14):3076–87.
- 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.* 2004b; 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, Gottfried C, De Almeida LM, Wajner M, Pessoa-Pureur R. Evidence that the branched-chain α -ceto acids accumulating in maple syrup urine disease induce morphological alterations and death in cultured astrocytes from rat cerebral cortex. *Glia.* 2004a; 48(3):230-40.
- 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.* 2004c; 29:747-753.
- Gargano N, Levi A, Alema S. Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and trkA receptors. *J Neurosci Res.* 1997; 50(1):1-12.
- Garrel C, Fowler PA, Al-Gubory KH. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. *J Endocrinol.* 2010; 205(1):107-16.
- Garrod AG. *Inborn Errors of Metabolism.* Oxford: Oxford University Press; 1909.
- Garzon D, Yu G, Fahnestock M. A new brain-derived neurotrophic factor transcript and decrease in brain-derived neurotrophic factor transcripts 1, 2 and 3 in Alzheimer's disease parietal cortex. *J Neurochem.* 2002; 82(5):1058-64.
- Gelfo F, Tirassa P, De Bartolo P, Caltagirone C, Petrosini L, Angelucci F. Brain and serum levels of nerve growth factor in a rat model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2011; 25(2):213-7.
- Gibson GE, Blass JP. Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohydrate utilization by maple syrup urine disease metabolites. *J Neurochem.* 1976; 26(6):1073-8.
- Glaser V, Carlini VP, Gabach L, Ghersi M, de Barioglio SR, Ramirez OA, Perez MF, Latini A. The intra-hippocampal leucine administration impairs memory consolidation and LTP generation in rats. *Cell Mol Neurobiol.* 2010; 30(7):1067-75.
- Gnahn H, Hefti F, Heumann R, Schwab ME, Thoenen H. NGF-mediated increase of choline acetyltransferase (ChAT) in the neonatal rat forebrain: evidence for a physiological role of NGF in the brain? *Brain Res.* 1983; 285(1):45-52.

- Goldberg AL, Odessey R. Oxidation of amino acids by diaphragms from fed and fasted rats. *Am J Physiol.* 1972; 223(6):1384-91.
- Gonzalez-Rios MC, Chuang DT, Cox RP, Schmidt K, Knopf K, Packman S. A distinct variant of intermediate maple syrup urine disease. *Clin Genet.* 1985; 27(2):153-9.
- Goodman HM. Site of action of insulin in promoting leucine utilization in adipose tissue. *Am J Physiol.* 1977; 233(2):E97-103.
- Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 2004; 53(Suppl 1):S110-8.
- Gros C, Fahy J, Halby L, Dufau I, Erdmann A, Gregoire JM, Ausseil F, Vispé S, Arimondo PB. DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie.* 2012; 94(11):2280–96.
- Haddad JJ, Land SC. Redox/ROS regulation of lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation and MAPK-mediated TNF-alpha biosynthesis *Br J Pharmacol.* 2002; 135(2):520-36.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nature Neuroscience.* 2000; 3:533–5.
- Hallböök F, Ayer-Lelièvre C, Ebendal T, Persson H. Expression of nerve growth factor receptor mRNA during early development of the chicken embryo: emphasis on cranial ganglia. *Development.* 1990; 108(4):693-704.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* New York: Oxford University Press Inc.: 2007.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2):231-55.
- Halliwell B. Antioxidant in human health and disease. *Annu Rev Nutr.* 1996; 16:33-50.
- Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs aging.* 2001; 18(9):685-716.
- Hamburger V, Levi-Montalcini R. Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool.* 1949; 111(3):457–501.
- Hefti F, Knusel B, Lapchak PA. Protective effects of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor on basal forebrain cholinergic neurons in adult rats with partial fimbrial transections. *Prog Brain Res.* 1993; 98:257–63.

- Hennigan A, Callaghan CK, Kealy J, Rouine J, Kelly AM. Deficits in LTP and recognition memory in the genetically hypertensive rat are associated with decreased expression of neurotrophic factors and their receptors in the dentate gyrus. *Behav Brain Res.* 2009; 197(2):371-7.
- Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol.* 2000; 57(6):846-51.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature.* 1990; 344(6264):339-41.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24:677-736.
- Huang EJ, Wilkinson GA, Fariñas I, Backus C, Zang K, et al. Expression of Trk receptors in the developing mouse trigeminal ganglion: In vivo evidence for NT-3 activation of TrkA and TrkB in addition to TrkC. *Development.* 1999; 126:2191–2203.
- Hutson SM, Cree TC, Harper AE. Regulation of leucine and α -ketoisocaproate metabolism in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1978; 253(22):8126-33.
- Hutson SM, Lieth E, LaNoue KF. Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system. *J Nutr.* 2001; 131(3):846S-50S.
- Hutson SM, Rannels SL. Characterization of a mitochondrial transport system for branched chain α -keto acids. *J Biol Chem.* 1985; 260(26):14189-93.
- Ikeda Y, Tanaka K. 2-methyl branched-chain acyl-CoA dehydrogenase from rat liver. *Methods Enzymol.* 1988b; 166:360-73.
- Ikeda Y, Tanaka K. Isovaleryl-CoA dehydrogenase from rat liver. *Methods Enzymol.* 1988a; 166:374-89.
- Iwata E, Asanuma M, Nishibayashi S, Kondo Y, Ogawa N. Different effects of oxidative stress on activation of transcription factors in primary cultured rat neuronal and glial cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997; 50(1-2):213-20.
- Jean YY, Lercher LD, Dreyfus CF. Glutamate elicits release of BDNF from basal forebrain astrocytes in a process dependent on metabotropic receptors and the PLC pathway. *Neuron Glia Biol.* 2008; 4(1):35-42.
- Jimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D. The effect of Mendelian disease on human health. In: Scriver CR, Beaudet AR, Sly W, Valle D, editors. *New York: McGraw-Hill; 2001. p. 167-74.*

- 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.* 2000; 926:116-21.
- Kalyanaraman K, Chamukuttan S, Arjundas G, Gajanan N, Ramamurthi B. Maple syrup urine disease (branched-chain keto-aciduria) variant type manifesting as hyperkinetic behaviour and mental retardation. Report of two cases. *J Neurol Sci.* 1972; 15(2):209-17.
- Kaplan DR, Miller FD: Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 2000; 10(3):381-91.
- Karelson E, Bogdanovic N, Garlind A, Winblad B, Zilmer K, Kullisaar T, Vihalemm T, Kairane C, Zilmer M. The cerebrocortical areas in normal brain aging and in the Alzheimer's disease: Noticeable difference in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem Res.* 2001; 26(4):353–61.
- Kessler JP, So V, Choi J, Cotman CW, Gomez-Pinilla F. Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav Neurosci.* 1998; 112:1012-9.
- Knipper M, Leung LS, Zhao D, Rylett RJ. Short-term modulation of glutamatergic synapses in adult rat hippocampus by NGF. *Neuroreport.* 1994; 5(18):2433–6.
- Kölker S, Ahlemeyer B, Kriegelstein J, Hoffmann GF. Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr Res.* 2001; 50(1):76-82.
- Korsching S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci.* 1993; 13:2739–48.
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(19):8856-60.
- Kudin AP, Kudina TA, Seyfried J, Vielhaber S, Beck H, Elger CE, Kunz WS. Seizure- dependent modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2002; 15:1105-14.
- Latini A, Ferreira GC, Scussiato K, Schuck PF, Solano AF, Dutra-Filho CS, Vargas CR, Wajner M. Induction of oxidative stress by chronic and acute glutaric acid administration to rats. *Cell Mol Neurobiol.* 2007; 27(4):423-38.

- Latini A, Scussiato K, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Wajner M. Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. *J Inherit Metab Dis.* 2005; 28(1):57-67.
- Le Roux C, Murphy E, Lilburn M, Lee PJ. The longest-surviving patient with classical maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis.* 2006; 29(1):190-4.
- Lepage N, McDonald N, Dallaire L, Lambert M. Age-specific distribution of plasma aminoacid concentration in healthy pediatric population. *Clin Chem.* 1997; 43(12):2397-402.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool.* 1951; 116(2):321-61.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994; 233:346-57.
- Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 1996; 19:289-317.
- Lie IE, Haugstad S, Holm H. Tailoring of the diet for the individual in maple syrup urine disease Long-term home dietary treatment of an adult patient with MSUD by monitoring of daily intake with a personal computer. A case report. *Hum Nutr Appl Nutr.* 1985; 39(2):130-6.
- Lim KC, Lim ST, Federoff HJ. Neurotrophin secretory pathways and synaptic plasticity. *Neurobiol Aging.* 2003; 24(8):1135-45.
- Louis J, Elsas II. Aminoacidúrias de Cadeia Ramificada. In: Goldman LMD, Ansiello D (Coord.). *Cecil medicina.* 23^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
- Love-Gregory LD, Grasela J, Hillman RE, Phillips CL. Evidence of common ancestry for the maple syrup urine disease (MSUD) Y438N allele in non-Mennonite MSUD patients. *Mol Genet Metab.* 2002; 75(1):79-90.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.
- Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(8):603-14.
- Ma YL, Wang HL, Wu HC, Wei CL, Lee EH. Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. *Neuroscience.* 1998; 82:957-67.
- Mackenzie DY, Woolf LI. Maple Syrup Urine Disease: an inborn error of the metabolism of valine, leucine, and isoleucine associated with gross mental deficiency. *Br Med J.* 1959; 1(5114):90-1.

- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*. 1990; 247(4949 Pt 1):1446-51.
- Mannion RJ, Costigan M, Decosterd I, Amaya F, Ma QP. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:9385-90.
- Martins AM. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. *Sao Paulo Med J*. 1999; 117(6):251-65.
- Mazariegos GV, Morton DH, Sindhi R, Soltys K, Nayyar N, Bond G, Shellmer D, Shneider B, Vockley J, Strauss KA. Liver transplantation for classical maple syrup urine disease: long-term follow-up in 37 patients and comparative United Network for Organ Sharing experience. *J Pediatr*. 2012; 160(1):116-21.
- Meister A. *Biochemistry of the Amino Acids*. 2a. ed. New York: Academic Press; 1965.
- Mekki-Dauriac S, Agius E, Kan P, Cochard P. Bone morphogenetic proteins negatively control oligodendrocyte precursor specification in the chick spinal cord. *Development*. 2002; 129(22):5117-30.
- Mello CF, Feksa L, Brusque AM, Wannmacher CM, Wajner M. Chronic early leucine administration induces behavioral deficits in rats. *Life Sci*. 1999; 65(8):747-55.
- Méndez-Alvarez E, Soto-Otero R, Hermida-Ameijeiras A, López-Real AM, Labandeira-García JL. Effects of aluminium and zinc on the oxidative stress caused by 6-hydroxydopamine autoxidation: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1586(2):155-68.
- Menkes JH, Hurst PL, Craig JM. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics*. 1954; 14(5):462-7.
- Menkes JH. Maple syrup disease and other disorders of keto acid metabolism. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*. 1962; 40:69-93.
- Menkes JH. Maple syrup urine disease. Isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics*. 1959; 23(2):348-53.
- Mescka C, Moraes T, Rosa A, Mazzola P, Piccoli B, Jacques C, Dalazen G, Coelho J, Cortes M, Terra M, Regla Vargas C, Dutra-Filho CS. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*. 2011; 26(1):21-8.
- Mescka CP, Wayhs CA, Guerreiro G, Manfredini V, Dutra-Filho CS, Vargas CR. Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by

metabolites accumulated in maple syrup urinedisease in human peripheral leukocytes in vitro. *Gene*. 2014; 548(2):294-8.

Mescka CP, Wayhs CA, Vanzin CS, Biancini GB, Guerreiro G, Manfredini V, Souza C, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas CR. Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: l-carnitine effect. *Int J Dev Neurosci*. 2013; 31(1):21-4.

Michael GJ, Averill S, Nitkunan A, Rattray M, Bennett DL, Yan Q, Priestley JV. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1997; 17:8476-90.

Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10(12):850-60.

Mitsubuchi H, Matsuda I, Nobukuni Y, Heidenreich R, Indo Y, Endo F, Mallee J, Segal S. Gene analysis of Mennonites maple syrup urine disease kindred using primer-specified map modification. *J Inherit Metab Dis*. 1992; 15(2):181-7.

Mizuno M, Yamada K, Olariu A, Nawa H, Nabeshima T. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *Journal of Neuroscience*. 2000; 20:7116-21.

Mobley WC, Rutkowski JL, Tennekoon GI, Buchanan K, Johnston MV. Choline acetyltransferase activity in striatum of neonatal rats increased by nerve growth factor. *Science*. 1985; 229(4710):284-7.

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(6):999-1008.

Mu JS, Li WP, Yao ZB, Zhou XF. Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res*. 1999; 835(2):259-65.

Muelly ER, Moore GJ, Bunce SC, Mack J, Bigler DC, Morton DH, Strauss KA. Biochemical correlates of neuropsychiatric illness in maple syrup urine disease. *J Clin Invest*. 2013; 123(4):1809-20.

Mufson EJ, Ikonomic MD, Styren SD, Counts SE, Wu J, Leurgans S, Bennett DA, Cochran EJ, DeKosky ST. Preservation of brain nerve growth factor in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2003; 60(8):1143-8.

Müller H, Bickel H, Feist D, Lutz P. Maple syrup urine disease with an intermittent relatively benign course. *Dtsch Med Wochenschr*. 1971; 96(40):1552-7.

- Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001; 63(1):71-124.
- Muthuswamy AD, Vedagiri K, Ganesan M, Chinnakannu P. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: role of L-carnitine and DL-alpha-lipoic acid. *Clin Chim Acta.* 2006; 368(1-2):84-92.
- Nabeshima T, Ogawa S, Yamada K, Ishimaru H, Fuji K, Kameyama T, Fukuta T, Takeuchi R, Hayashi K. Memory impairment and morphological changes in rats after continuous infusion of active fragment of anti-nerve growth factor-antibody. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1991; 74(2):141-52.
- Nellis MM, Danner DJ. Gene preference in maple syrup urine disease. *Am J Hum Genet.* 2001; 68(1):232-7.
- Ng VL, Fecteau A, Shepherd R, Magee J, Bucuvalas J, Alonso E, McDiarmid S, Cohen G, Anand R. Outcomes of 5-year survivors of pediatric liver transplantation: report on 461 children from a North American multicenter registry. *Pediatrics.* 2008; 122(6):e1128-35.
- Ngô C, Chéreau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol.* 2009; 175(1):225-34.
- Nitta A, Nishioka H, Fukumitsu H, Furukawa Y, Sugiura H, Shen L, Furukawa S. Hydrophobic dipeptide LeuIle protects against neuronal death by inducing brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis. *J Neurosci Res.* 2004; 78(2):250-8.
- Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Ohta K, Akaboshi I, Indo Y, Endo F, Matsuda I. Molecular diagnosis of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis.* 1992; 15(5):827-33.
- Odessey R, Goldberg AL. Oxidation of leucine by rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1972; 223(6):1376-83.
- Oldendorf WH. Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol.* 1971; 221(6):1629-39.
- Oxender DL, Christensen HN. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *J Biol Chem.* 1963; 238:3686-99.
- Panten U, Kriegstein E, Poser W, Schönborn J, Hasselblatt A. Effects of L-leucine and alpha-ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS Lett.* 1972; 20:225-8.
- 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.
- Pasternak JJ. Uma introdução à Genética Molecular Humana: Mecanismos das Doenças Hereditárias. 2a ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2007.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinate. Orlando: Academic Elsevier; 1986.
- Peinemann F, Danner DJ. Maple syrup urine disease 1954-1993. *J Inherit Metab Dis.* 1994; 17:3-15.
- Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnestock M. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2005; 93(6):1412-21.
- Pettit FH, Yeaman SJ, Reed LJ. Purification and characterization of branched chain a-keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978; 75(10):4881-5.
- Pilla C, Cardozo RF, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem Res.* 2003; 28:675-679.
- Pinto ALR, Raymond KM, Bruck I, Antoniuk SA. Neonatal screening for biotinidase deficiency. *Rev Saúde Pública.* 1998; 32(2):148-52.
- Prensky AL, Moser HW. Changes in the amino acid composition of proteolipids of white matter during maturation of the human nervous system. *J Neurochem.* 1967; 14(1): 117-21.
- Prentki M, Renold AE. Neutral amino acid transport in isolated rat pancreatic islets. *J Biol Chem.* 1983; 258(23):14239-44.
- Przedborski S, Donaldson D, Jakowec M, Kish SJ, Guttman M, Rosoklija G, Hays AP. Brain Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1996; 39(2):158-65.
- Puffenberger EG. Genetic heritage of the Old Order Mennonites of southeastern Pennsylvania. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2003; 121C(1):18-31.
- Quental S, Vilarinho L, Martins E, Teles EL, Rodrigues E, Diogo L, Garcia P, Eusébio F, Gaspar A, Sequeira S, Amorim A, Prata MJ. Incidence of maple syrup urine disease in Portugal. *Mol Genet Metab.* 2010; 100(4):385-7.
- Rantamäki T, Kempainen S, Autio H, Stavén S, Koivisto H, Kojima M, Antila H, Miettinen PO, Kärkkäinen E, Karpova N, Vesa L, Lindemann L, Hoener MC, Tanila H, Castrén E. The impact of Bdnf gene deficiency

- to the memory impairment and brain pathology of APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2013; 8(7):e68722
- Reed LJ, Hackert ML. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *J Biol Chem*. 1990; 265(16):8971-4.
- Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci*. 2006; 361:1545–64.
- Reid MV, Murray KA, Marsh ED, Golden JA, Simmons RA, Grinspan JB. Delayed myelination in an intrauterine growth retardation model is mediated by oxidative stress upregulating bone morphogenetic protein 4. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012; 71(7):640-53.
- Reznick AZ, Packer L. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU, editores. *Free radicals: from basic science to medicine*. Birkhäuser: Verlag, Basel; 1993. p.425–37.
- Ribeiro CA, Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Grando V, Schmidt AL, Ferreira GC, Perry ML, Dutra-Filho CS, Wajner M. Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease *Neurochem Res*. 2008; 33(1):114-24.
- Ricceri L, Alleva E, Chiarotti F, Calamandrei G. Nerve growth factors affects passive avoidance learning and retention in developing mice. *Brain Res Bull*. 1996; 39(4):219-26.
- Ringstedt T, Ibáñez CF, Nosrat CA. Role of brain-derived neurotrophic factor in target invasion in the gustatory system. *J Neurosci*. 1999; 19:3507–18.
- Rittinger O, Bachmann C, Irnberger T, Pilz P, Walter GF, Wendel U, Plöchl E. The intermediate form of maple syrup disease. *Klin Padiatr*. 1986; 198(1):37-43.
- Robinson M, Buj-Bello A, Davies AM. Paracrine interactions of BDNF involving NGF-dependent embryonic sensory neurons. *Mol Cell Neurosci*. 1996; 7:143–51.
- Rybakowski JK, Borkowska A, Skibinska M, Hauser J. Illness-specific association of val66met BDNF polymorphism with performance on Wisconsin Card Sorting Test in bipolar mood disorder. *Mol Psychiatry*. 2006; 11(2):122-4.
- Sah R, Galeffi F, Ahrens R, Jordan G, Schwartz-Bloom RD. Modulation of the GABAA-gated chloride channel by reactive oxygen species. *J Neurochem*. 2002; 80(3):383-91.
- Salvador M, Henriques JAP. *Radicaís livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. Canoas: Editora da Ulbra; 2004.

- Sans RM, Jolly WW, Harris RA. Studies on the regulation of leucine catabolism. III. Effects of dichloroacetate and 2-chloropropionate on leucine oxidation by the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1980; 12(1):1-16.
- Scaini G, Comim CM, Oliveira GM, Pasquali MA, Quevedo J, Gelain DP, Moreira JC, Schuck PF, Ferreira GC, Bogo MR, Streck EL. Chronic administration of branched-chain amino acids impairs spatial memory and increases brain-derived neurotrophic factor in a rat model *J Inherit Metab Dis.* 2013a; 36(5):721-30.
- 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(2):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, Mello-Santos LM, Furlanetto CB, Jeremias IC, Mina F, Schuck PF, Ferreira GC, Kist LW, Pereira TC, Bogo MR, Streck EL. Acute and Chronic Administration of the Branched-Chain Amino Acids Decreases Nerve Growth Factor in Rat Hippocampus. *Mol Neurobiol.* 2013b; 48(3):581-9.
- Scaini G, Morais MO, Furlanetto CB, Kist LW, Pereira TC, Schuck PF, Ferreira GC, Pasquali MA, Gelain DP, Moreira JC, Bogo MR, Streck EL. Acute Administration of Branched-Chain Amino Acids Increases the Pro-BDNF/Total-BDNF Ratio in the Rat Brain. *Neurochem Res.* 2015; 40(5):885-93.
- Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U. Significance of L-alloisoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease. *Clin Chem.* 1999; 45(10):1734-40.
- Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U. Whole-body L-leucine oxidation in patients with variant form of maple syrup urine disease. *Pediatr Res.* 2001; 49(5):627-35.
- Schadewaldt PL, Wendel U. Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr.* 1997; 156 Suppl 1:S62-6.
- Schechter LE, Ring RH, Beyer CE, Hughes ZA, Khawaja X, Malberg JE, Rosenzweig-Lipson S. Innovative approaches for the development of antidepressant drugs: current and future strategies. *NeuroRx.* 2005; 2(4):590-611.
- Schneider C, Oliveira A. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte.* 2004; 10:308-13.

- Schönberger S, Schweiger B, Schwahn B, Schwarz M, Wendel U. Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab.* 2004; 82(1):69-75.
- Scriber CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8^a ed. New York: MCGraw-Hill Inc; 2001.
- Scriber CR. Garrod's Croonian Lectures (1908) and the charter 'Inborn Errors of Metabolism': Albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008. *J Inherit Metab Dis.* 2008; 31(5):580-98.
- Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chrétien M, Murphy RA. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J.* 1996; 314(Pt3):951-60.
- Serra JD, Sánchez FA, Visus FSV. Enfermedades de orina de jarabe arce. In: Sanjurjo P, Balbellou A. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. Madrid: Eddiciones Ergon; 2010. p. 487-495.
- Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Ribeiro CA, Wannmacher CM, Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wajner M. Inhibition of brain energy metabolism by the α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1639(3):232-8.
- Shaltiel G, Chen G, Manji HK. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7(1):22-6.
- Shimizu E, Hashimoto K, Watanabe H, Komatsu N, Okamura N, Koike K, Shinoda N, Nakazato M, Kumakiri C, Okada S, Iyo M. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in schizophrenia are indistinguishable from controls. *Neurosci Lett.* 2003; 351(2):111-4.
- Sierra C, Vilaseca MA, Moyano D, Brandi N, Campistol J, Lambruschini N, Cambra FJ, Deulofeu R, Mira A. Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin Chim Acta.* 1998; 276(1):1-9.
- Sies H, Sthäl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr.* 2005; 135(5):969-72.
- Simon E, Fingerhut R, Baumkötter J, Konstantopoulou V, Ratschmann R, Wendel U. Maple syrup urine disease: favorable effect of early diagnosis by newborn screening on the neonatal course of the disease. *J Inherit Metab Dis.* 2006; 29(4):532-7.
- Sinclair L. A new look of the inborn errors of metabolism. *Ann Clin Biochem.* 1982; 19(Pt4):314-21.
- Sirtori LR, Dutra-Filho CS, Fitarelli D, Sitta A, Haeser A, Barschak AG, Wajner M, Coelho DM, Llesuy S, Belló-Klein A, Giugliani R, Deon M,

- Vargas CR. Oxidative stress in patient with phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1740(1):68-73.
- Sitta A, Barschak AG, Deon M, Terroso T, Pires R, Giugliani R, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab Brain Dis*. 2006; 21(4):287-96.
- Sitta A, Ribas GS, Mescka CP, Barschak AG, Wajner M, Vargas CR. Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. *Cell Mol Neurobiol*. 2014; 34(2):157-65.
- Snyderman SE, Norton PM, Roitman E, Holt Le Jr. Maple Syrup Urine Disease with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics*. 1964; 34:452-72.
- Snyderman SE. Treatment outcome of maple syrup urine disease. *Acta Paediatr Jpn*. 1988; 30(4):417-24.
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24:1217-81.
- Souza CFM, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2002; 7(1):129-37.
- Stefanello FM, Franzon R, Tagliari B, Wannmacher C, Wajner M, Wyse AT. Reduction of butyrylcholinesterase activity in rat serum subjected to hyperhomocysteinemia. *Metab Brain Dis*. 2005; 20(2):97-103.
- Stoppoloni G, Santinelli R, Prisco F, Tolone C, D'Ambrosio M. Maple syrup urine disease: report of a mild variant case and results of dietary treatment. *Pediatrics (Napoli)*. 1978; 86(3):409-20.
- Strand JM, Skinnis R, Scheffler K, Rootvelt T, Woldseth B, Bjørås M, Eide L. Genome instability in Maple Syrup Urine Disease correlates with impaired mitochondrial biogenesis. *Metabolism*. 2014; 63(8):1063-70.
- Strauss KA, Mazariegos GV, Sindhi R, Squires R, Finegold DN, Vockley G, Robinson DL, Hendrickson C, Virji M, Cropcho L, Puffenberger EG, McGhee W, Seward LM, Morton DH. Elective liver transplantation for the treatment of classical maple syrup urine disease. *Am J Transplant*. 2006b; 6(3):557-64.
- Strauss KA, Puffenberger EG, Morton DH. Maple syrup urine disease. In: Pagon R, Bird T, Dolan C, Stephens K, Adam M, editors. *GeneReviews*. Seattle, Washington, USA: University of Washington, 2006a.
- Strauss KA, Wardley B, Robinson D, Hendrickson C, Rider NL, Puffenberger EG, Shellmer D, Moser AB, Morton DH. Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design. *Mol Genet Metab*. 2010; 99(4):333-45.

- Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis.* 2003; 18(2):147-54.
- Szapacs ME, Mathews TA, Tessarollo L, Ernest Lyons W, Mamounas LA, Andrews AM. Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. *J Neurosci Methods.* 2004; 140(1-2):81-92.
- 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(1-20):44-9.
- Taylor S, Srinivasan B, Wordinger RJ, Roque RS. Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Müller cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003; 111(1-2):189-97
- Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science.* 1995; 270(5236):593-8.
- Thomas JA. Estresse oxidativo e defesa contra oxidantes. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Roos AC. *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.* São Paulo: Manole, 2003.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35(5):206-21.
- Treacy E, Clow CL, Reade TR, Chitayat D, Mamer OA, Scriver CR. Maple syrup urine disease: interrelationship between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *J Inherit Metab Dis.* 1992; 15(1):121-35.
- Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 1980; 191(2):421-7.
- Tyler WJ, Perrett SP, Pozzo-Miller LD. The role of neurotrophins in neurotransmitter release. *Neuroscientist.* 2002; 8(6):524-31.
- van der Horst JL, Wadman SK. A variant form of branched-chain keto aciduria. *Acta Paediatr Scand.* 1971; 60(5):594-9.
- Vasques Vde C, Brinco F, Wajner M. Intrahippocampal administration of the branched-chain alpha-hydroxy acids accumulating in maple syrup urine disease compromises rat performance in aversive and non-aversive behavioral tasks. *J Neurol Sci.* 2005; 232:11-21.

- Velázquez A, Montiel F, Sahw KN, Carnevale A, del Castillo V. Maple syrup urine disease. Genetic heterogeneity, heterozygote diagnosis and new therapeutic approach. *Rev Invest Clin.* 1981; 33(3):273-9.
- Verderio C, Bianco F, Blanchard MP, Bergami M, Canossa M, Scarfone E, Matteoli M. Cross talk between vestibular neurons and Schwann cells mediates BDNF release and neuronal regeneration. *Brain Cell Biol.* 2006; 35(2-3):187-201.
- Verdu A, Lopez-Herce J, Pascual-Castroviejo I, Martinez-Bermejo A, Ugarte M, Garcia MJ. Maple syrup urine disease variant form Presentation with psychomotor retardation and CT scan abnormalities. *Acta Paediatr Scand.* 1985; 74(5):815-8.
- Von Bartheld CS, Byers MR, Williams R, Bothwell M. Anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system. *Nature.* 1996; 379:830-33.
- Vondran MW, Clinton-Luke P, Honeywell JZ, Dreyfus CF. BDNF^{+/+}-mice exhibit deficits in oligodendrocyte lineage cells of the basal forebrain. *Glia.* 2010; 58(7):848-56.
- Wahren J, Felig P, Hagenfeldt L. Effect of protein ingestion on splanchnic and leg metabolism in normal man and in patients with diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1976; 57(4):987-99.
- Wajner M, Vargas CR. Aminoacidopatias e Acidemias Orgânicas. In: Fonseca LF, Piaretti G, Xavier C. *Compêndio de Neurologia Infantil.* Rio de Janeiro: Medsi; 2002. p. 589-604.
- Walsh GS, Krol KM, Crutcher KA, Kawaja MD. Enhanced neurotrophin-induced axon growth in myelinated portions of the CNS in mice lacking the p75 neurotrophin receptor *J Neurosci.* 1999; 19(10):4155-68.
- Walsh KS, Scott MN. Neurocognitive profile in a case of maple syrup urine disease. *Clin Neuropsychol.* 2010; 24(4):689-700.
- Walterfang M, Bonnot O, Mocellin R, Velakoulis D. The neuropsychiatry of inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2013; 36(4):687-702.
- Walz R, Lenz G, Roesler R, Vianna MM, Martins V, Brentani R, Rodnight R, Izquierdo I. Time-dependent enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post training infusion of nerve growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats. *Eur J Neurosci.* 2000; 12(6):2185-9.
- Wannmacher CMD, Wajner M, Giugliani R, Giugliani ERJ, Costa MG, Giugliani MCK. Detection of metabolic disorders among high risk patients. *Rev Bras Genet.* 1982; 1:187-94.
- Weiss L, Noonan SN, Hyde T. An unusual variant of maple syrup urine disease. *Am J Hum Genet.* 1975; 27:93A.

- Westall RG, Dancis J, Miller S. Maple syrup urine disease. *Am J Dis Child.* 1957; 94:571-2.
- Xiao J, Wong AW, Willingham MM, van den Buuse M, Kilpatrick TJ, Murray SS. Brain-derived neurotrophic factor promotes central nervous system myelination via a direct effect upon oligodendrocytes. *Neurosignals.* 2010; 18(3):186-202.
- Yamada K, Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci.* 2003; 91(4):267-70.
- Yeaman SJ. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem J.* 1989; 257(3):625-32.
- Yeaman SJ. The mammalian 2-oxo acid dehydrogenases: a complex family. *Trends Biochem Sci.* 1986; 11(7):293-6.
- Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol.* 2010; 70(5):304-22.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994; 74(1):139-62.
- Yudkoff M, Nissim I, Daikhin Y, Lin ZP, Nelson D, Pleasure D, Erecinska M. Brain glutamate metabolism: neuronal-astroglial relationships. *Dev. Neurosci.* 1993; 15, 343-50.
- Yudkoff M. Brain metabolism of branched-chain amino acids. *Glia.* 1997; 21(1):92-8.
- Zhang B, Edenberg HJ, Crabb DW, Harris RA. Evidence for both a regulatory mutation and a structural mutation in a family with maple syrup urine disease. *J Clin Invest.* 1989; 83(4):1425-9.
- Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster I, Davies KJ. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.* 1990; 265:16330-6.
- Zhao LY, Ye TH, Zhang YZ, Zhao H. Combination of morphine with lowdose naloxone for intravenous patient-controlled analgesia. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2005; 27(2):228-31.
- 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(5-6):420-5.
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Griffin K, Skvorak KJ, Paul HS, Homanics GE, Bewley MC, Cheng KC, Lanoue KF, Flanagan JM. Dual mechanism of brain injury and novel treatment strategy in maple syrup urine disease. *Brain.* 2009; 132(Pt 4):903-18.

Zou J, Crews F. CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell Mol Neurobiol.* 2006; 26(4-6):385-405.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer da Comissão Ética no Uso de Animais



Resolução

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

Protocolo: 05/2014

Professor Responsável: Emílio Luiz Streck.

Equipe: Giselli Scaini, Milena Carvalho Silva e Lara Mezari Gomes.

Título: “Avaliação dos efeitos neuroquímicos e comportamentais após a administração intracerebroventricular do α -cetoisocaproíco em cérebro de ratos jovens.”

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada o total de 42 Ratos Wistar de 7 a 30 dias com 15 a 120g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

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

Protocol number: 05/2014

Principal Investigator: Emílio Luiz Streck.

Researchers: Giselli Scaini, Milena Carvalho Silva e Lara Mezari Gomes.

Project title: “Evaluation of neurochemical and behavioral effects after intracerebroventricular administration of α -cetoisocaproíco in young rat brain.”

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

Criciúma, 18 de fevereiro de 2014.

Patrícia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA