

ALESSANDRA ROSA BLAUTH

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM
ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 EM TRATAMENTOS PRÉ E PÓS-
NATAL SOBRE PARÂMETROS DE METABOLISMO
ENERGÉTICO EM ANIMAIS SUBMETIDOS A UM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOENÇA DA URINA DO XAROPE DE
BORDO**

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

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz
Streck

**CRICIÚMA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B645a Blauth, Alessandra Rosa.

Avaliação do efeito da suplementação com ácidos graxos ômega-3 em tratamentos pré e pós-natal sobre parâmetros de metabolismo energético em animais submetidos a um modelo experimental de doença da Urina do Xarope de Bordo / Alessandra Rosa Blauth ; orientador: Emilio Luiz Streck. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

90 p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Ácidos graxos ômega-3 – Uso terapêutico. 2. Doença da Urina do Xarope do Bordo – Tratamento. 3. Aminoácidos de cadeia ramificada. 4. Creatina quinase. 5. Transporte de elétrons. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

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

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 262

Com início às 13h30 (treze horas e trinta minutos) do dia vinte e um do mês de outubro de 2016 (dois mil e dezesseis), realizou-se, no bloco R2, sala 18 na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Alessandra Rosa Blauth**, sob a orientação do Prof. Dr. Emílio Luiz Streck, intitulada "**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 EM TRATAMENTOS PRÉ E PÓS-NATAL SOBRE PARÂMETROS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EM ANIMAIS SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DA URINA DO XAROPE DE BORDO**". A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof.^a Dra. Samira da Silva Valvassori (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof.^a Dra. Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 14h30 (quatorze horas e trinta minutos), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza Coordenador do Programa. Criciúma, 21 (vinte e um) de outubro de 2016 (dois mil e dezesseis).

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador PPGCS

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

Diana Ghisi Daniel
Auxiliar Administrativo PPGCS

Diana Ghisi
Diana Ghisi Daniel
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

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

Dedico este trabalho à minha família, por ter sido um alicerce em minha vida e me empurrado à frente sempre que pensei em parar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir vivenciar grandes coisas.

Aos meus pais, por aguentarem os momentos de tensão.

Aos meus amigos, que me apoiaram em todas as situações e que cansaram de me ouvir dizer que tinha que terminar esse trabalho.

Ao meu orientador Dr. Emílio Luiz Streck, pelo apoio durante toda essa caminhada.

À professora Dr^a. Patrícia Fernanda Schuck, que se prontificou a me ajudar no desenvolvimento desse trabalho, quando necessário.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por todo o conhecimento que me proporcionaram.

Às “meninas do laboratório”, Meline, Milena, Lara e Fernanda, por toda a paciência e auxílio durante essa trajetória.

RESUMO

A doença da Urina do Xarope de Bordo (DXB) é uma doença hereditária associada a uma alteração no metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada, acarretando um acúmulo desses aminoácidos (leucina, valina e isoleucina) e seus derivados, α -cetoisocaproico, α -cetometilvalérico e α -cetoisovalérico. Esse acúmulo é prejudicial ao desenvolvimento do tecido nervoso. A aparência da doença se dá, normalmente, logo após o nascimento, sendo de difícil diagnóstico e muitas vezes fatal. Os pacientes que sobrevivem, normalmente apresentam danos no neurodesenvolvimento. O tratamento da DXB consiste, basicamente, em uma dieta restritiva de aminoácidos de cadeia ramificada, muitas vezes complementada com fórmulas dietéticas pobres em ácidos graxos ω -3. A suplementação do ácido graxo ω -3 vem sendo amplamente discutida de forma terapêutica, pois minimizaria os danos neurológicos ao atuar no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da suplementação com ω -3 sobre a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons e da enzima creatina quinase (CK) em cérebro (córtex cerebral, estriado e hipocampo) de animais submetidos a um modelo experimental de DXB, mediante dois protocolos de administração. O primeiro protocolo baseou-se na suplementação materna com ω -3 (0,8 g/kg peso corporal) durante o período pré-natal e seus efeitos sobre os ratos infantis. No segundo protocolo, foi investigado a suplementação da prole com ω -3 (0,1 g/kg peso corporal) no período pós-natal. O modelo crônico de DXB aplicado à prole foi induzido quimicamente pelo *pool* de AACR (15,8 μ L/g peso corporal). Os resultados mostraram que a suplementação materna com ω -3 durante o período pré-natal não modificou de forma estatisticamente significativa as atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons e a atividade da enzima creatina quinase (CK) no cérebro da prole com DXB. Além disso, a suplementação dos ratos infantis, também não provocou alterações significativas nas atividades dos complexos da cadeia de transporte de elétrons nas estruturas cerebrais avaliadas. Entretanto, a suplementação com ω -3 nos ratos infantis apresentou alterações estatisticamente significativas na atividade da CK no córtex cerebral dos animais. Esses resultados reforçam a necessidade de estudos adicionais para se avaliar a efetividade da suplementação com ácidos graxos ω 3, nos períodos pré e pós-natal e determinar sua eficácia sobre os complexos da cadeia de transporte de elétrons e sobre a enzima CK.

Palavras chave: ácidos graxos ômega-3; aminoácidos de cadeia ramificada; doença da urina do xarope do bordo; creatina quinase; cadeia respiratória mitocondrial

ABSTRACT

Maple Syrup Urine Disease (MSUD) is a inherited disease associated with an alteration in the metabolism of branched chain amino acids, leading to an accumulation of these amino acids (leucine, valine and isoleucine) and its derivatives, α -ketoisocaproic, α -ketometilvaleric and α -ketoisovaleric. This accumulation is harmful to the nervous tissue development. The onset of the disease occurs usually shortly after birth and is difficult to diagnose and often fatal. Patients who survive usually have damage to the neurodevelopment. MSUD treatment of basically consists on a restricted diet of branched chain amino acids, often supplemented with dietary formulas poor in omega 3 fatty acids. Omega-3 fatty acid supplementation has been widely discussed as a therapeutic strategy because would minimize neurological damage by acting in the development and maintenance of the central nervous system. The aim of this study was to investigate the effects of omega-3 supplementation on the activity of the electron transport chain complex and the enzyme creatine kinase (CK) in the brain (cerebral cortex, striatum and hippocampus) of animals submitted to an experimental model of MUD, by two administration protocols. The first protocol was based on maternal supplementation with omega 3 (0.8 g / kg body weight) during the prenatal period and its effects on infant rats. In the second protocol, it was investigated the offspring supplementation with omega 3 (0.1 g / kg body weight) in the postnatal period. The chronic MSUD model applied to offspring was chemically induced by the BCAA *pool* (15.8 μ L/g body weight). The results showed that maternal supplementation with omega-3 during the prenatal period did not change statistically significantly the activities of the electron transport chain complexes and activity of the enzyme creatine kinase (CK) in the offspring brain with MSUD. In addition, supplementation of infants rats also did not cause significant changes in the activities of the complexes of the electron transport chain in the assessed brain structures. However, supplementation with omega-3 in mice infants showed statistically significant changes in CK activity in the cerebral cortex of the animals. These results reinforce the need for further studies to evaluate the effectiveness of supplementation with omega-3 fatty acids, pre and postnatal and determine its effectiveness on the complexes of the electron transport chain and the CK enzyme.

Keywords: omega-3 fatty acids; branched-chain amino acids; maple syrup urine disease; creatine kinase; mitochondrial respiratory chain.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada na doença da urina do xarope do bordo. O número 1 na via metabólica identifica a aminotransferase dos ácidos graxos de cadeia ramificada. O X identifica o bloqueio na via metabólica. Adaptado de Chuang e Shih (2001). 38
- Figura 2: Representação esquemática da administração de ômega-3 em ratas gestantes e indução do modelo da doença da urina do xarope do bordo (DXB) na prole. Ratas gestantes (n=3 animais por grupo) receberam ômega-3 ou água por gavagem durante o período gestacional. Na sequência, a prole recebeu administração subcutânea do *pool* de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) (7^o ao 28^o dia de vida) para indução de DXB..... 57
- Figura 3: Representação esquemática do modelo da doença da urina do xarope do bordo (DXB) em ratos infantis e tratamento pós-natal com ômega-3. A figura mostra a administração do *pool* de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) para indução de DXB ou salina (controle) por 21 dias (7^o ao 28^o dia) em ratos Wistar e tratamento com ômega-3 ou água por via orogástrica também por 21 dias (n= 6 animais por grupo). 58
- Figura 4 - Efeito da suplementação materna com ômega-3 durante o período gestacional (pré-natal) sobre o dano as atividades dos complexos I (A), complexo II (B), complexo II-III (C) e complexo IV (D), em estruturas cerebrais da prole com doença da urina do xarope do bordo (DXB). *Método Estatístico Empregado:* Teste *t de Student* para amostras independentes expressos por média±DP. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$). 63
- Figura 5 - Efeito da suplementação materna com ômega-3 durante o período gestacional (pré-natal) sobre a atividade da Creatina Quinase (CK) em estruturas cerebrais da prole com doença da urina do xarope do bordo (DXB). *Método Estatístico Empregado:* Teste *t de Student* para amostras independentes expressos por média±DP. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$). 64
- Figura 6 - Efeito da suplementação do ômega-3 no período puerperal (pós-natal) sobre o dano a atividade dos complexos I (A), complexo II (B), complexo II-III (C) e complexo IV (D), em estruturas cerebrais da prole com doença da urina do xarope do bordo (DXB). *Método Estatístico Empregado:* Teste *One Way Anova* para amostras emparelhadas expressos por média±DP. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$). 65

Figura 7 - Efeito da suplementação do ômega-3 no período puerperal (pós-natal) sobre o dano a atividade da Creatina Quinase (CK) em estruturas cerebrais da prole com doença da urina do xarope do bordo (DXB). *Método Estatístico Empregado:* Teste *One Way Anova* para amostras emparelhadas expressos por média±DP. Houve diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$)..... 66

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Manifestações clínicas de cada fenótipo clínico..	42
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido Araquidônico
AACR – Aminoácido de cadeia ramificada
 α CGDH – α -cetoglutarato desidrogenase
ADP – Difosfato de adenosina (do inglês *adenosine diphosphate*).
ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*).
ATACR – Aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada
Bad – do inglês *Bcl-2-associated death promoter*
Bax – do inglês *Bcl-2 associated X protein*
Bcl-2 – do inglês *B-cell lymphoma 2*
Bcl-x – do inglês *B-cell lymphoma-extra-large*
CDCCR – Complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada
CEUA – Comissão de ética no uso de animais
CIC – Ácido -cetoisocapróico
CIV – Ácido-cetoisovalérico.
CK – Creatina quinase (do inglês *creatine kinase*).
CMV – Ácido-ceto-metilvalérico
CoA – Coenzima A
CoQ – Coenzima Q
Cr – Creatina
DHA – Ácido docosahexaenóico (do inglês *docosahexaenoic acid*)
DPA – Ácido docosapentaenóico (do inglês *docosapentaenoic acid*)
DXB – Doença da urina do xarope de bordo
E1 – acetóácido descarboxilase de cadeia ramificada.
E2 – Dihidrolipoil transacetilase.
E3 – Dihidrolipoamida desidrogenase.
EPA – Ácido eicosapentaenoico (do inglês *eicosapentaenoic acid*)
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FAD – Dinucleótido de adenina e flavina, (do inglês *flavin adenine dinucleotide*.)
FADH₂ - Dinucleótido de adenina e flavina reduzido (do inglês *flavin adenine dinucleotide reduced*)
Fe²⁺ - Ferro
HUFA – Ácidos graxos altamente insaturados
IDH – Isocitrato desidrogenase
Ileu – Isoleucina
Leu – Leucina
MDH – Malato desidrogenase
Na⁺ - Sódio

NAD⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotideo oxidado (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*)

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

NPD-1 - Neuroprotetina D1

OMIM – Herança Mendeliana do Homem Online (do inglês *online mendelian inheritance in man*)

PCr – Fosfocreatina

Pi – Fosfato Inorgânico

PUFA – Ácidos graxos poli-insaturados

SDH – Succinato desidrogenase

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

TPP – Tiamina Pirofosfato (do inglês *thiamine pyrophosphate*)

Val – Valina

ω-3 – Ácido graxo ômega 3

ω-6 – Ácido graxo ômega 6

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	33
1.1 AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA (AACR)	33
1.2 METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA	33
1.2.1 Regulação do complexo <i>α-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada</i>	35
1.3 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DE BORDO	37
1.3.1 Histórico da Doença	38
1.3.2 Epidemiologia	39
1.3.3 Etiologia	39
1.3.4 Fenótipos Clínicos	40
1.3.5 Manifestações Clínicas	41
1.3.6 Diagnóstico	42
1.3.7 Tratamento	43
1.3.8 Fisiopatologia	43
1.4 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 (Ω -3)	45
1.4.1 Metabolismo dos ácidos graxos ômega-3 (EPA, DPA e DHA)	47
1.5 METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL	48
1.5.1. Ciclo do ácido cítrico (Krebs)	48
1.5.2 Cadeia transportadora de elétrons	49
1.6 CREATINA QUINASE (CK)	51
2 JUSTIFICATIVA	53
3 OBJETIVOS	54
3.1 OBJETIVO GERAL	54
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4 MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 ANIMAIS	55
4.2 <i>POOL</i> DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA	55
4.3 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3	55
4.4 DESENHO EXPERIMENTAL	56
4.4.1 Protocolo Pré-natal - Administração crônica do pool de aminoácidos de cadeia ramificada e tratamento com ácidos graxos ômega-3 no período pré-natal.	56
4.4.2 Protocolo Pós-natal - Administração crônica do pool de aminoácidos de cadeia ramificada e tratamento com ácidos graxos ômega-3 no período pós-natal.	57
4.5 PREPARO DA AMOSTRA	58

4.6 Determinação da Atividade dos Complexos da Cadeia Respiratória.....	59
4.6.1 Determinação da atividade do Complexo I (NADH desidrogenase)	59
4.6.2 Determinação da atividade do Complexo II (succinato:ubiquinona oxirredutase).....	59
4.6.3 Determinação da atividade do Complexo II+CoQ+III (succinato: citocromo c oxirredutase).....	59
4.6.4 Determinação da atividade do Complexo IV (citocromo c oxidase).....	60
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CREATINA QUINASE (CK).....	60
4.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	60
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5 RESULTADOS.....	62
5.1 1º EXPERIMENTO – PRÉ-NATAL	62
5.2 2º EXPERIMENTO – PÓS-NATAL	64
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA (AACR)

Os aminoácidos essenciais leucina, isoleucina e valina são classificados como aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e constituem aproximadamente 35% dos aminoácidos essenciais nos músculos e 40% dos aminoácidos pré-formados necessários por mamíferos (Chuang e Shih, 2001). Os AACR não podem ser sintetizados no corpo e devem, portanto, ser obtidos na dieta, para a síntese de proteínas (Harris et al., 2005). Os AACR são poderosos sinais metabólicos com consequências graves na privação e acumulação (Zinnanti et al., 2012).

Foi observado que após a ingestão de proteínas, os AACR contribuem com mais de 60% do aumento da concentração de aminoácidos no sangue humano (Chuang & Shih, 2001). A leucina é de especial interesse, pois promove a síntese proteica, inibe a degradação de proteínas e estimula a liberação de insulina. Como resultado dessas ações da leucina, os AACR têm potencial terapêutico, por que poupam a massa corporal magra durante a perda de peso, promovem a cicatrização de feridas e diminuem a perda muscular com a idade (Harris et al., 2005). Esses AACR participam direta e indiretamente de uma variedade de funções bioquímicas importantes no cérebro, que incluem a síntese proteica, produção de ATP, compartimentalização de glutamato e síntese de neurotransmissores, como a serotonina e as catecolaminas (Fernstrom, 2005).

Mas seus efeitos positivos são auto limitantes, pois os AACR promovem a sua própria eliminação pela degradação oxidativa. Isso é necessário porque o excesso de AACR é tóxico. As células corporais não armazenam moléculas para controlar as concentrações de AACR. Os aminoácidos não são conhecidos por ser convertidos em proteínas para posterior uso e, portanto, as vias catabólicas fornecem o único caminho para lidar com os excessos de AACR (Harris et al., 2005).

1.2 METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA

Os 3 AACR apresentam vias biossintéticas complexas e interconectadas e são catabolizados como combustível primariamente no músculo, coração, tecido adiposo, rins e tecido nervoso, além do fígado (Murray et al., 2006; Nelson e Cox, 2013). Os tecidos extrahepáticos

contém aminotransferase, ausente no fígado, que age sobre os AACR para produzir seu α -cetoácidos correspondentes (Nelson e Cox, 2013). Esses AACR possuem uma rota metabólica oxidativa em comum e o sistema enzimático mais eficiente para sua oxidação está localizado no músculo esquelético (Roger e Tirapegui, 2008). O metabolismo dos AACR começa com o transporte desses para as células através do um sistema transportador L independente de Na^+ , presente na membrana plasmática. Na célula, os AACR sofrem 3 passos iniciais em comum: transaminação, descarboxilação oxidativa e desidrogenação (Chuang e Shih, 2001). A primeira etapa do catabolismo dos AACR é uma transaminação reversa desencadeada pela aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (ATACR; EC 2.6.1.42), que é citosólica ou mitocondrial (Chuang e Shih, 2001). A remoção dos grupos amino de todos os três aminoácidos e a transferência desse para o α -cetogluturato, produz os α -cetoácidos correspondentes, ácido α -cetoisocaproico (CIC), ácido α -ceto- β -metilvalérico (CMV) e ácido α -cetoisovalérico (CIV), derivados da leucina, isoleucina e valina, respectivamente (Chuang e Shih, 2001; Champe et al., 2012; Frazier et al., 2014; Roger e Tirapegui, 2008). Concomitantemente, verifica-se que na reação catalisada pela ATACR há a conversão de α -cetogluturato – aceptor de nitrogênio oriundo dos AACR – em glutamato (Roger e Tirapegui, 2008). A reação é reversível e, portanto, não compromete a degradação dos AACR, pois os α -cetoácidos correspondentes podem substituir os seus AACR na dieta (Harris et al., 2005; Murray et al., 2006).

Os α -cetoácidos de cadeia ramificada são translocados para dentro da mitocôndria por um transportador específico, onde sofrem a descarboxilação oxidativa, catalisada pelo complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR; E.C. 1.2.4.4), produzindo os respectivos acil-CoAs de cadeia ramificada ao liberar o grupo carboxila como CO_2 . (Harris et al., 2005; Nelson e Cox, 2013).

O nível mais alto de atividade dessa desidrogenase (CDCCR) é encontrado também no tecido muscular (Smith et al., 2007). Esta reação é irreversível e portanto, encaminha os AACR para a degradação. Acredita-se que este seja o sítio mais importante de regulação, sendo considerada a etapa controladora do fluxo do catabolismo desses aminoácidos pois a CDCCR é a principal enzima regulatória na via catabólica dos AACR (Harris et al., 2005; Roger e Tirapegui, 2008). A CDCCR dos mamíferos pertence a uma família de complexos α -cetoácido desidrogenase mitocondriais altamente conservados (Voet et al., 2014; Yeaman, 1989). As suas subunidades são uma α -cetoácido

descarboxilase, uma transclase e uma dihidroprolil desidrogenase (Murray et al., 2006). É similar em estrutura e divide o mesmo mecanismo de reação com o complexo piruvato desidrogenase e o complexo α -cetogluturato desidrogenase (Nelson e Cox, 2013). Os 3 complexos multienzimáticos têm a subunidade E3 (diidrolipoamina-desidrogenase) em comum e empregam as coenzimas TPP, lipoamina e FAD, além do NAD^+ como agente oxidante terminal (Voet et al., 2014).

A partir da descarboxilação oxidativa, as vias para a degradação dos 3 AACRs divergem em passos catalisadas por diferentes enzimas, que eventualmente levam para o ciclo do ácido cítrico. Ocorre uma bifurcação, e cada AACR segue por uma via própria até os seus intermediários anfíóxicos, cujas estruturas determinam que a Valina é glicogênica, a Leucina é cetogênica e a Isoleucina é tanto glicogênica quanto cetogênica (Murray et al., 2006). Leucina e valina possuem rotas complexas, onde seus esqueletos carbonados são degradados por vias que produzem propionil-CoA, que é convertida em succinil CoA por uma série de reações (Harris et al., 2005; Nelson e Cox, 2013; Voet et al., 2014). O carbono proveniente de leucina entra como acetil-CoA para a eliminação completa como CO_2 (Harris et al., 2005). A isovaleril CoA derivada da leucina é desidrogenada, gerando β -metil crotonil CoA, catalisada pela isovaleril CoA desidrogenase (EC 1.3.99.10). Forma-se então β -metil glutaconil CoA pela carboxilação da β -metil crotonil CoA à custa da hidrólise de uma molécula de ATP. A β -metil glutaconil CoA é então hidratada, formando 3-hidroxi-3-metil glutaril CoA, que é clivada a acetil-CoA e acetoacetato (Berg et al., 2011). Após a isoleucina sofrer transaminação e descarboxilação oxidativa, seu esqueleto restante, de cinco carbonos, é ainda mais oxidado, produzindo acetil-CoA e propionil-CoA. Na degradação da valina, que contém um carbono a menos que a isoleucina, após a transaminação e descarboxilação oxidativa, seguem-se uma série de reações de oxidação que convertem os quatro carbonos restantes em CO_2 e propionil-CoA, que é, então, convertido em succinil-CoA (Nelson e Cox, 2013; Voet et al., 2014).

1.2.1 Regulação do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada

O complexo CDCCR é um membro de complexos α -cetoácido desidrogenase altamente conservados, que compreendem o complexo piruvato desidrogenase, o complexo α -cetogluturato desidrogenase e o próprio CDCCR, com estrutura e função semelhantes (Chuang & Shih,

2001). Cada complexo consiste de múltiplas cópias de 3 enzimas, denominadas E1, E2 e E3 (Yeaman, 1989). A atividade do CDCCR é regulada pela inibição do produto final (NADH e ésteres de acil-CoA de cadeia ramificada), modificações covalentes por fosforilação, e a expressão alterada dos montantes das suas enzimas componentes (Shimomura et al., 2001). O CDCCR é regulado por uma modificação covalente em resposta ao conteúdo de AACR na dieta. Com pouca ou ingestão normal de AACR, o complexo enzimático é fosforilado e assim inativado por uma proteína quinase. O excesso de AACR resulta na desfosforilação e conseqüente ativação da enzima (Nelson e Cox, 2013).

O complexo CDCCR consiste de 3 componentes catalíticos: uma descaboxilase de acetoácidos de cadeia ramificada dependente de tiamina pirofosfato (TPP) ou E1, consistindo de duas subunidades α e duas subunidades β ; uma di-hidrolipoamina transiclase compreendendo 24 subunidades de ácido lipóico (E2) que facilita a transferência do grupo acil de cadeia ramificada de E1 para a CoA para formar acil-CoA de cadeia ramificada; e uma di-hidrolipoamina-desidrogenase, que é uma flavoproteína homodimérica (E3), que redefine a porção lipoil à forma oxidada ativa, com NAD⁺ como o último acceptor de elétrons (Chuang et al., 1995; Chuang, 1998; Harris et al., 2005; Murray et al., 2014). O complexo enzimático também contém duas enzimas reguladoras, uma quinase e uma fosfatase específicas, que regulam a atividade de E1 através de um ciclo de fosforilação (inativação) / desfosforilação (ativação) (Chuang et al., 1995).

O componente E2 dos respectivos complexos é a chave de sua estrutura e função. Três domínios de E2 estão ligados por regiões articulares flexíveis que são sensíveis à digestão de protease (Chuang, 1998; Yeaman, 1989). Ele apresenta 3 funções principais: forma um núcleo central simétrico em volta do qual estão arrançados múltiplas cópias dos componentes E1 e E3; é uma aciltransferase, catalisando a formação de acil-CoA; fornece o local de ligação para o cofator ácido lipóico que interage com os diferentes locais ativos nos complexos (Yeaman, 1989). Os componentes E1 e E2 são específicos do complexo CDCCR, enquanto E3 é comum entre o 3 complexos α -cetoácido desidrogenase (Chuang & Shih, 2001). Uma deficiência nos componentes E1 e E2 pode causar a Doença da Urina do Xarope de Bordo (DXB) (Couce et al., 2015).

1.3 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DE BORDO

A doença da urina do xarope do bordo (DXB; OMIM # 248600) é uma doença genética de herança autossômica recessiva causada pela deficiência da atividade do CDCCR (Chuang et al., 2001; Strauss e Morton, 2003; Frazier et al., 2014; Herber et al., 2014). A deficiência desse complexo resulta em um acúmulo de leucina, isoleucina e valina e seus α -cetoácidos correspondentes (Figura 2) (Chuang e Shih, 2001; Frazier et al., 2014). No plasma, há elevações nos níveis desses aminoácidos 5 a 10 vezes acima do normal. A presença de aloisoleucina no plasma é patognomônica da doença (Strauss e Morton, 2003). A leucina e seu α -cetoácido correspondente (CIC) são consideradas as substâncias neurotóxicas mais importantes na DXB, mas o mecanismo do dano cerebral nessa doença ainda é pouco conhecido (Chuang e Shih, 2001).

Dentro de 48 horas após o parto, os bebês não tratados desenvolvem cetonúria, tornam-se irritados e se alimentam mal. Em 4 a 5 dias, os sinais neurológicos progridem para letargia, apnéia intermitente, distonia, e movimentos estereotipados, como “andar de bicicleta” e logo após aparece o odor de xarope de bordo na urina (Strauss e Morton, 2003). A DXB, quando não tratada, resulta em desenvolvimento cerebral anormal, retardo mental e morte precoce na infância. Crianças sobreviventes normalmente apresentam graus variáveis de dano cerebral, caracterizado por retardo mental, dificuldades neurológicas para caminhar e falar, e convulsões (Chuang e Shih, 2001).

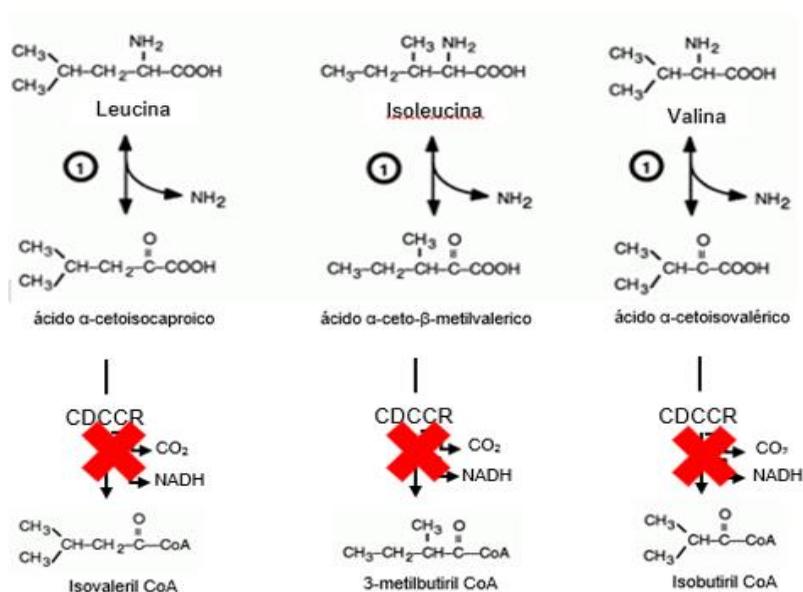


Figura 1. Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada na doença da urina do xarope do bordo. O número 1 na via metabólica identifica a aminotransferase dos ácidos graxos de cadeia ramificada. O X identifica o bloqueio na via metabólica. Adaptado de Chuang e Shih (2001).

1.3.1 Histórico da Doença

A primeira descrição da doença aconteceu em 1954, quando Menkes, Hurst e Craig descreveram 4 crianças com doença degenerativa cerebral de uma família de seis crianças. Das quatro crianças afetadas, uma sobreviveu por 3 meses e as outras morreram dentro de 14 dias (Dent e Westall, 1960). Esses pacientes apresentavam edema cerebral, convulsões, espasticidade, e irregularidades levando à parada respiratória (Chuang, 1998). A urina desses pacientes apresentava um odor adocicado, que lembrava xarope de bordo, o que resultou no nome da doença (Chung e Shih, 2001).

Em um estudo subsequente, realizados por Westall et al., em 1957, outro paciente apresentou níveis elevados de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), leucina (Leu), isoleucina (Ileu) e valina (Val) (Dent e Westall, 1960). Na mesma época, amostras de plasma e urina de um paciente que morreu aos 20 meses, com a mesma característica de odor de xarope de bordo na urina foram recolhidos e

analisados. Os resultados apresentavam elevações nos aminoácidos leucina, isoleucina e valina, indicando fortemente um bloqueio no metabolismo destes aminoácidos. Nesse mesmo estudo, a atividade da transaminase para os aminoácidos de cadeia ramificada foi demonstrada nos tecidos de pacientes obtidos na necropsia, indicando que o bloqueio estava em algum lugar abaixo do nível de formação dos respectivos cetoácidos (Dancis et al., 1959).

1.3.2 Epidemiologia

A DXB é considerada uma doença metabólica rara, com uma incidência entre 1:185.000 nascidos vivos (Murray et al., 2006; Strauss e Morton, 2003) e 1:200.000 nascidos vivos (Trintinalia et al., 2014). Na Alemanha, a incidência é estimada em 1:133.000 nascidos vivos e, em algumas comunidades Menonitas e alemãs nos Estados Unidos, pode ser de até 1:200 nascidos vivos (Morton et al., 2002; Simon et al., 2006). No Brasil, considera-se uma incidência média de 1:100.000 (Herber et al., 2015).

1.3.3 Etiologia

A leucina e seu α -cetoácido correspondente, ácido α -cetoisocapróico (CIC), são consideradas as substâncias neurotóxicas mais importantes na DXB, mas o mecanismo do dano cerebral nessa doença ainda é pouco conhecido (Chuang e Shih, 2001). Os genes que codificam as várias subunidade/componentes catalíticos da doença foram mapeados nos cromossomos 19q13.1–13.2; 6q14; 1p31; 7q31–32, 16p11.2 e 4q22.1 (Chuang et al., 2004). A DXB também é geneticamente heterogênea como mostrado pelas mutações nos diferentes *loci*, que são denominados fenótipos moleculares (Chuang et al., 1995).

A hiperleucinemia inibe o transporte de tirosina, triptofano e outros aminoácidos essenciais através da barreira hematoencefálica, limitando a disponibilidade de substrato para as catecolaminas cerebrais, serotonina e síntese proteica (Muelly et al., 2013). Se os níveis de α -cetoisocapróico estiverem altos, como na DXB, há um aumento do consumo de glutamato e da formação de leucina e α -cetoglutarato. (Yudkoff et al., 2005). *In vitro*, concentrações levemente elevadas do ácido α -cetoisocapróico (0,5 mM) desacoplam a mitocôndria e maiores concentrações (2 mM) inibem a α -cetoglutarato desidrogenase e a piruvato desidrogenase (Jackson e Singer, 1983).

1.3.4 Fenótipos Clínicos

Os pacientes com DXB podem ser divididos em cinco fenótipos clínicos e bioquímicos: clássica, intermediária, intermitente, responsiva à tiamina e por deficiência de di-hidrolipoil desidrogenase (E3; EC 1.8.1.4)) (Chuang e Shih, 2001).

A DXB na forma clássica tem início neonatal de encefalopatia e representa a forma mais severa e mais comum, apresentando um acúmulo tanto do amino quanto do α -cetoácido em até uma semana do nascimento (Axler e Holmquist, 2014; Chuang e Shih, 2001). Aproximadamente 75% dos pacientes com DXB apresentam a forma clássica, com pouca ou nenhuma atividade detectável do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR), cerca de (2%) (Chuang et al., 1995; Champe et al., 2012; Axler e Holmquist, 2014). Dados recentes sugerem que as formas mais leves de DXB pode representar até 50% dos casos diagnosticados (Fingerhut et al., 2008). Os sintomas clínicos são causados, principalmente pela leucina, que é rapidamente transportada através da barreira hematoencefálica e é neurotóxica em altas concentrações e 50% ou mais dos α -cetoácidos de cadeia ramificada também são derivados da leucina (Chuang e Shih, 2001; Yudkoff et al., 2005). Muitos pacientes morrem durante a descompensação metabólica causada por infecção ou estresse (Chuang et al., 1995).

Pacientes com a forma intermediária de DXB apresentam elevações persistentes de AACR e comprometimento neurológico (Axler e Holmquist, 2014). Entretanto, não apresentam a doença com gravidade no período neonatal. Muitos não apresentam episódios de descompensação metabólica aguda (Chuang e Shih, 2001).

Na forma intermitente de DXB, os pacientes apresentam desenvolvimento normal, com crescimento e inteligência normal (Axler e Holmquist, 2014). Apresenta início tardio de cetoacidose associado ao estresse e apresentam risco de descompensação metabólica aguda durante situações de estresse metabólico (Axler e Holmquist, 2014; Chuang et al., 1995). Enquanto assintomáticos, seus dados laboratoriais, incluindo níveis de AACR plasmáticos, são normais (Chuang e Shih, 2001). Os sintomas normalmente aparecem entre os cinco meses e dois anos, quando uma infecção trivial como otite ou gastroenterite viral desencadeiam o catabolismo de proteína muscular (Axler e Holmquist, 2014). Esses pacientes apresentam níveis mais elevados de atividade enzimática (Champe et al., 2012). Deve-se suspeitar de DXB intermitente em casos de infecções comuns com um curso clínico

atípico, especialmente em crianças que demonstram ataxia ou sonolência acentuada (Axler e Holmquist, 2014).

Os pacientes com o fenótipo responsivo à tiamina se parecem com o fenótipo intermediário, mas mostram uma considerável resposta a doses farmacológicas de tiamina. O mecanismo da resposta de tiamina não é clara (Chuang et al., 1995). Em geral, esses pacientes não apresentavam doença aguda neonatal, e seu curso clínico inicial é semelhante aos de DXB intermediária (Chuang e Shih, 2001). Nenhum paciente com DXB responsivo à tiamina foi tratado apenas com tiamina e sim, com uma combinação de tiamina (doses que variam de 10 a 1000 mg por dia) e de restrição dietética de AACR, o que torna a contribuição *in vivo* de tiamina impossível de discernir (Chuang et al., 2004).

A DXB por deficiência de di-hidrolipoil desidrogenase é um fenótipo raro, com menos de 20 pacientes descritos na literatura. O fenótipo clínico é similar à DXB intermediária, mas acompanhado por acidose láctica grave (Chuang e Shih, 2001). É a forma com manifestações clínicas mais graves dentre os fenótipos de DXB (Chuang et al., 2006). Esses pacientes apresentam uma deficiência combinada de complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR), piruvato e complexos α -cetoglutarato desidrogenase (Chuang e Shih, 2001). A morte ocorre durante a infância como resultado das ceto-acidoses e acidose láctica (Chuang et al., 1995).

1.3.5 Manifestações Clínicas

Ainda que o recém-nascido afetado pareça inicialmente normal, os sinais característicos da doença são evidentes no final da primeira semana de vida extrauterina. Além das anomalias bioquímicas já citas, os lactentes apresentam dificuldades de se alimentar e vomitam, além de um grau significativo de letargia (Murray et al., 2006). As manifestações clínicas incluem início precoce da cetoacidose grave, convulsões e retardo mental. (Chuang et al., 1995). Podem ser desencadeadas por alterações do estado catabólico (febre, infecções virais ou ingestão alimentar reduzida) (Schwartz, 2008). As manifestações clínicas de cada fenótipo clínico apresentam algumas variações, conforme a tabela 1 abaixo.

Fenótipo Clínico	Características clínicas proeminentes
Clássica	Início neonatal, má alimentação, letargia, aumento/diminuição do tônus, cetoacidose e convulsões.
Intermediária	Insuficiência no crescimento, normalmente sem cetoacidose, atraso no desenvolvimento
Intermitente	Desenvolvimento normal cedo, ataxia episódica/cetoacidose precipitada por infecção ou estresse; episódios podem ser fatais, intelecto geralmente normal
Responsiva à Tiamina	Similar à intermediária
Deficiência de E3	Normalmente sem sintomas neonatais, insuficiência de crescimento, hipotonia, acidose láctica, atraso no desenvolvimento, distúrbio de movimento, deterioração progressiva.

Tabela 1 - Manifestações clínicas de cada fenótipo clínico. Adaptada de Chuang e Shih, 2001.

1.3.6 Diagnóstico

O desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sofisticados e sensíveis, muitas vezes incorporados a programas de triagem neonatal, tem permitido diagnósticos mais precoces e mais precisos, muitas vezes antes da manifestação dos sintomas da doença (Schwartz et al., 2008). O diagnóstico da DXB, antes da primeira semana de vida, é possível somente por análise enzimática (Murray et al., 2006). Quando o paciente apresenta os sintomas clássicos, esse diagnóstico pode ser facilmente feito por análise de aminoácidos. Os AACR são aumentados no sangue, fluido cerebrospinal e urina (Chuang e Shih, 2001). Hoje em dia, os níveis de AACR plasmático elevados na DXB podem ser prontamente detectados por espectrometria de massa automatizado (Chuang et al., 2006). Esse método quantifica as proporções sanguíneas de leucina para alanina, fenilalanina, e isoleucina para atingir uma sensibilidade muito alta de detecção e especificidade em amostras obtidas em 24 horas de vida (Naylor e Guthrie, 1978).

É importante o diagnóstico precoce, pois muitas vezes a ocorrência de dano neurológico está relacionada ao tempo e ao período de exposição ao metabolito tóxico. Uma intervenção adequada e imediatamente após o diagnóstico é, em muitos casos, fundamental para definir o prognóstico dessas situações (Schwartz et al., 2008).

1.3.7 Tratamento

O princípio do tratamento da DXB está na manutenção das concentrações plasmáticas dos AACR normais, no propósito de minimizar os efeitos tóxicos dos metabólitos acumulados. O tratamento ocasiona um controle rígido na dieta, limitando a ingestão de leucina, valina e isoleucina ao mínimo necessário para permitir o crescimento normal (Nelson e Cox, 2013). Quando os níveis plasmáticos desses aminoácidos caem para o normal, são restituídos pela ingestão de leite e outros alimentos, numa quantidade que nunca exceda a demanda metabólica (Murray et al., 2006). Na fase aguda, o tratamento imediato e agressivo para reduzir os níveis de leucina é necessário, e deve consistir de alta taxa de infusão de glicose para estimular a secreção de insulina e suprimir o catabolismo de proteína. (Herber et al., 2014). O tratamento de manutenção recomendado é através da dieta restritiva de AACR, prevenindo assim resultados neurológicos e morte (Mazer e Singh, 2010). Com a restrição de AACR, ocorre também a suplementação com tiamina e fórmulas livres de AACR (Schwartz et al., 2008). O transplante de fígado também é uma alternativa estudada (Herber et al., 2014). O tratamento, iniciado na primeira semana de vida previne a evolução da doença e suas graves consequências ou até mesmo reverte um quadro clínico (Murray et al., 2006; Amâncio et al., 2007).

1.3.8 Fisiopatologia

Apesar dos mecanismos tóxicos da DXB ainda não estarem bem esclarecidos, diversos estudos demonstraram associação entre o aumento nas concentrações plasmáticas de leucina e CIC com o aparecimento dos sintomas neurológicos (Chuang e Shih, 2001). O aumento de leucina e CIC pode causar encefalopatia metabólica aguda e edema cerebral grave, enquanto o desequilíbrio crônico nos níveis plasmáticos de AACRs ou restrição proteica podem levar a captação cerebral anormal de aminoácidos, com subsequente diminuição de mielinização e síntese de neurotransmissores, causando ainda mais danos cerebrais que se manifestam como encefalopatia crônica (Strauss et al., 1993).

O estresse oxidativo está associado com um grande número de doenças neurodegenerativas, incluindo a DXB (Barchak et al., 2008b). Estudos sugerem um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e uma diminuição da atividade antioxidante em pacientes com DXB, com inibição das enzimas mitocondriais e da cadeia respiratória

em modelos animais (Barchak et al., 2008b; Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005; Jackson et al., 1983; Wajner et al., 2007; Zinnanti et al., 2009).

Dentre os α -cetoácidos, o CIC é considerado o mais tóxico, pois provoca a inibição do consumo de oxigênio em cérebro de ratos e a oxidação do 3-hidroxiacetato, além de provocar deficiência na formação de mielina no cerebelo de ratos (Gibson e Blass, 1976). Seu acúmulo também favorece a síntese de leucina na reação de transaminação bidirecional, pois reverte o fluxo de nitrogênio e diminui as concentrações de glutamato cerebral (Hutson et al., 1998; Hutson et al., 2001; Muelly et al., 2013). O CIC também apresenta outro efeito tóxico adicional sobre o metabolismo cerebral, pois concentrações elevadas de CIC inibem as enzimas α -cetoglutarato desidrogenase (EC 1.2.4.2) e piruvato desidrogenase (E.C. 1.2.4.1) (Jackson et al., 1983), resultando em disfunção do ciclo de Krebs. Também foi demonstrado que os α -cetoácidos que se acumulam na DXB reduzem a atividade do ciclo de Krebs e aumentam a glicólise anaeróbica, o que indica uma alteração no metabolismo energético em córtex cerebral de ratos (Sgaravatti et al., 2003). Esse acúmulo também pode inibir o transporte de malato/aspartato e resultar em um aumento na relação NADH/NAD⁺ e comprometer a conversão de lactato em piruvato (McKenna et al., 1998).

O aumento da concentração de leucina interfere com o transporte de tirosina, triptofano e outros aminoácidos essenciais, como metionina, fenilalanina, histidina, valina e treonina através da barreira hematoencefálica, limitando a disponibilidade de substrato para síntese das catecolaminas cerebrais e serotonina, além da síntese proteica (Strauss et al., 1993; Araújo et al., 2001; Muelly et al., 2013). O acúmulo de leucina e CIC no tecido cerebral é acompanhada pela depleção de glutamato, GABA, piruvato e dopamina e pelo aumento α -cetoglutarato, alanina e lactato (Zinnanti et al., 2009). O aumento das concentrações de AACR também provocam alterações na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. O acúmulo desses aminoácidos reduz significativamente a produção de CO₂ a partir de acetato e citrato, no ciclo de Krebs, entre 20 a 55%. O aumento de leucina inibi significativamente a atividade do complexo IV da cadeia respiratória e o excesso de valina e isoleucina, os complexos II-III, III e IV em até 40% (Ribeiro et al., 2008). A deficiência do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR) compromete a produção de corpos cetônicos de leucina, que são essenciais para a síntese de mielina e isso, combinado com a síntese debilitada de proteína, leva a uma severa desmielinização (Schönberger et al., 2004).

Também foi demonstrado que os AACR inibem a atividade da enzima creatina quinase (CK; EC 2.7.3.2) em cérebro de ratos, indicando que esse acúmulo pode ser neurotóxico, alterando a homeostase energética (Pilla et al., 2003a). Também prejudicam o metabolismo energético do cérebro, possivelmente devido à inibição do complexo I da cadeia respiratória (Sgaravatti et al., 2003). Além disso, tem sido postulado que a desmielinização, a alteração em neurotransmissores, a reduzida absorção cerebral de aminoácidos essenciais, a indução do stress oxidativo, apoptose e déficit energético pode estar relacionada com as lesões na DXB (Ribeiro, 2008).

1.4 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 (Ω -3)

Dois tipos de ácidos graxos, os ácidos graxos ômega-3 (ω -3) e ácidos graxos ômega-6 (ω -6) são necessários para a síntese de eicosanoides (ácidos graxos C-20), precursores de moléculas importantes como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (Baynes e Dominiczak, 2015). No ômega-3, a primeira ligação dupla na molécula está localizada no terceiro átomo de carbono a partir da extremidade metila; no ômega-6, no sexto átomo de carbono a partir da extremidade metila (Kantha, 1987). Esses ácidos graxos também são importantes nutrientes e componentes principais das membranas celulares neuronais (Nemeth et al., 2014). Em função dessas características, as famílias dos ácidos graxos insaturados ω -6 e ω -3 na dieta são de interesse clínico (Kantha, 1987). Os ácidos graxos ω -3 e ω -6 e/ou seus precursores devem ser fornecidos através da alimentação. São obtidos pelo consumo de óleos vegetais que contêm o ácido graxo ômega-6, o ácido linoleico, que é um precursor do ácido araquidônico (AA); e o ácido graxo ômega-3, o ácido α -linolênico, precursor de outros ácidos ômega-3 importantes para o crescimento e o desenvolvimento, como o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) (Baynes e Dominiczak, 2015; Champe et al., 2012; Smith et al., 2007).

Os dados de países em desenvolvimento tem mostrado que uma ingestão maior de ácido graxo ômega-3 maior na gravidez e no início da vida afetam o crescimento e desempenho cognitivo tardio na infância. O desenvolvimento cerebral durante o terceiro trimestre de gravidez e primeiro ano de vida acontece rapidamente e um fornecimento adequado de ambos estes ácidos graxos parece ser essencial para o desenvolvimento ideal (Huffman et al., 2011). Os ácidos linoleico (ômega-6) e α -linolênico (ômega-3) são os ácidos graxos poli-

insaturados mais abundantes na dieta ocidental (Adam et al.,1986). Esses ácidos graxos podem auxiliar processos fisiológicos e de desenvolvimento importantes. Além disso, podem formar eicosanoides, podem ser esterificados e hidrolizados para e a partir de glicerolípídios teciduais, e podem ser metabolicamente alongados e desaturados a uma variedade de ácidos graxos altamente insaturados (Lands, 1992).

Existem evidências emergentes de que a ingestão de ácidos graxos ômega 3 (ômega -3) na gravidez e no início da vida pode desempenhar um papel na prevenção de doenças mediadas por eicosanóides (Huffman et al., 2011). Em 1960, pesquisadores demonstraram que o metabolismo dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) de 18 carbonos, entre eles o ácido graxo α -linolênico levam a formação e acumulação de ácidos graxos altamente insaturados (HUFA) de 20 e 22 carbonos em tecidos de ratos e humanos (Lands, 2014). Os ácidos graxos ômega-3 apresentam propriedades neuroprotetoras e representam um tratamento potencial para uma variedade de doenças neurodegenerativas e neurológicas (Dyall, 2015). Eles estão incorporados nas membranas celulares e apresentam potentes atividades anti-inflamatória, antitrombótica, antiarrítmica e de diminuição dos níveis de triacilgliceróis (Schmidt et al., 2015).

No organismo, o ácido linoleico (ômega-6) pode ser convertido a ácido araquidônico (AA), utilizado para a síntese da principal classe de prostaglandinas humanas e outros eicosanoides (Figura 2) (Smith et al., 2007; Baynes e Dominiczak, 2015). Os eicosanoides são compostos fisiológicos e farmacologicamente ativos, conhecidos como: as prostaglandinas, os tromboxanos, os leucotrienos e as lipoxinas e são potentes reguladores autócrinos e parácrinos de numerosas funções das células e dos tecidos, incluindo a agregação de trombócitos, reações inflamatórias e funções dos leucócitos, vasoconstrição e vasodilatação, pressão sanguínea, constrição dos brônquios e a contração uterina (Weber et al., 1986, Murray et al., 2006).

O ácido graxo ômega-3 (α -linolênico) produz o ácido eicosapentaenoico (EPA), que é precursor de uma classe diferente de eicosanoides (Smith et al., 2007; Baynes e Dominiczak, 2015), e o ácido docosahexaenoico (DHA) (Figura 2). Em humanos, eicosanoides formados a partir de EPA são menos trombogênicos e menos pró-inflamatórios do que aqueles derivados do ácido araquidônico (Schacky e Weber, 1985). O DHA é um componente de lípidios complexos nas membranas e participa na isolação nos nervos, bem como um precursor para a sinalização molecular, incluindo as prostaglandinas (Li et al., 2008). O DHA é, quantitativamente, o mais importante ácido graxo

ômega-3 no cérebro (Dyall, 2015). A disponibilidade de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (incluindo o DHA) além de modular o metabolismo eicosanoide, também modula a mielinização durante o pico de crescimento cerebral (Koletzko e Rodriguez-Palermo, 1999). As influências benéficas da dieta com DHA sobre o desenvolvimento cerebral são atualmente interpretadas como modificações da estrutura da membrana e as funções de proteínas associadas à membrana (Fleith e Clandinin, 2005). O aumento de EPA e DHA nas membranas celulares altera as propriedades físicas da membrana, tais como a sua fluidez, o que pode ter impacto sobre a migração do receptor e o acúmulo lipídico e alteram as vias de sinalização de células que por sua vez influenciam respostas de células tecidos ligadas ao metabolismo, sensibilidade hormonal e função imunológica (Calder, 2012). Acredita-se que a modulação da micro-organização das membranas e a regulação da expressão gênica são os mecanismos chave pelos quais os ácidos graxos ômega-3 medeiam suas funções. Essa regulação da expressão gênica via receptores nucleares e os fatores de transcrição gênica habilita os ácidos graxos ômega-3 e seus metabólitos bioativos a afetar uma miríade de vias moleculares (Mozaffarian e Wu, 2011). O DHA pode afetar a função de múltiplos alvos, que variam de canais iônicos, receptores nucleares e segundos mensageiros (Begum et al., 2013).

Crianças e adultos com DXB têm profundas deficiências de ácidos docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA) nas membranas de glóbulos vermelhos e uma elevação na proporção de ômega-6/ ômega-3 de membrana (Strauss e Morton, 2003). A deficiência cerebral de DHA pode levar a deficiência do sistema visual, disfunção sináptica, dinâmica de neurotransmissores anormais, excitabilidade patológica, a expressão genética cerebral alterada e distúrbios comportamentais (Strauss e Morton, 2003).

1.4.1 Metabolismo dos ácidos graxos ômega-3 (EPA, DPA e DHA)

Os mesmos sistemas enzimáticos que transformam o ácido linoleico em ácido araquidônico (AA) também transformam o ácido α -linolênico em ácido eicosapentaenóico (EPA) por etapas metabólicas idênticas de dessaturação e alongamento da cadeia (Adam et al., 1986). A via metabólica começa com a dessaturação do ácido α -linolênico em ácido estearidônico pela $\Delta 6$ desaturase, que é um passo limitante (Dyall, 2015). O ácido α -linolênico, pode ser convertido para ácidos graxos de cadeia longa (PUFA) mais biologicamente ativos como o EPA e DHA; este processo ocorre por uma série de reações de dessaturação e

alongamento, com ácido estearidônico sendo um intermediário na via (Calder, 2012). Isso é seguido pelo alongamento para ácido eicosatetraônico, que é dessaturado pela $\Delta 5$ desaturase, produzindo EPA, o qual é então alongado pela elongase-2, primeiro em DPA e depois em ácido tetracosapentóico (Dyall, 2015). O ácido α -linolenico é um substrato pobre para as enzimas e, *in vitro*, deprime a formação de ácido araquidônico, pela inibição da enzima de dessaturação, e a sua conversão em prostaglandinas, por inibição da ciclooxigenase. Ambos os efeitos podem contribuir para uma biosíntese deprimida de prostaglandinas durante uma dieta desse ácido (Adam et al., 1986). O ácido tetracosapentóico sofre uma segunda dessaturação $\Delta 6$ para produzir o ácido tetracosahexanóico. Esses passos iniciais ocorrem no retículo endoplasmático; entretanto, o estágio final da síntese de DHA ocorre no peroxissomo após translocação. No peroxissomo, o ácido tetracosahexanóico é encurtado para DHA por uma rodada simples de β -oxidação pela ação da acyl-coenzima-A oxidase, enzimas bifuncionais e então, thiolases (Dyall, 2015).

1.5 METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL

A principal moeda energética para os processos celulares é o ATP e seus níveis devem ser mantidos durante processos como a contração muscular e a estimulação cerebral, pois as células do sistema nervoso central têm alta demanda energética. A glicólise e a fosforilação oxidativa são as principais rotas que participam da síntese de ATP do tecido nervoso central.

1.5.1. Ciclo do ácido cítrico (Krebs)

No metabolismo dos AACR, a degradação da leucina forma acetil-Coenzima A e acetoacetato, enquanto a valina é convertida em succinil-CoA. Tanto a isoleucina quanto a valina são metabolizadas de maneira a formar succinato. Outro produto do metabolismo da isoleucina é o acetoacetato (Voet et al., 2014; Harris et al., 2005). Esses produtos são intermediários do ciclo de ácido cítrico, para onde se encaminham. Os grupos acetil entram no ciclo do ácido cítrico, que os oxida a CO_2 ; a energia liberada é conservada nos transportadores de elétrons reduzidos NADH e FADH_2 (Nelson e Cox, 2013). O ciclo do ácido cítrico (Figura 3) tem início com a condensação de acetil-CoA com o oxaloacetato, gerando citrato através da citrato sintase (EC 2.3.1.1). Em sequência, o citrato é isomerizado até isocitrato pela

enzima aconitase (E.C 4.2.1.3) que catalisa a transformação reversível do citrato a isocitrato, a fim de entregar dois elétrons para o NAD^+ , formando equivalentes reduzidos (Nelson e Cox, 2013; Riegel, 2001).

Na próxima etapa, a isocitrato desidrogenase (IDH; EC 1.1.1.42) catalisa a descarboxilação oxidativa irreversível do citrato, originando a primeira das três moléculas de NADH produzidas pelo ciclo e a primeira liberação de CO_2 , e forma α -cetogluturato (Champe et al., 2012; Nelson e Cox, 2013). O α -cetogluturato proveniente do isocitrato sofre uma nova descarboxilação oxidativa e é convertido a succinil-CoA pela enzima α -cetogluturato desidrogenase (α -CGDH; EC 1.2.4.2) (Nelson e Cox, 2013, Riegel, 2001). Nessa reação, um dos grupos carboxila do α -cetogluturato é liberado como CO_2 , ocorre a produção do segundo NADH do ciclo e o grupo carbonila adjacente é oxidado pelo nível de um ácido, o qual se combina para formar succinil-CoA (Champe et al., 2012; Smith et al., 2007). A succinil-CoA é catalisada pela enzima succinil-CoA-sintetase (EC 6.2.1.5) e forma succinato (Nelson e Cox, 2013). O succinato que se forma entrega elétrons para o dinucleotídeo de adenina e flavina (FAD), em uma reação catalisada pela enzima succinato desidrogenase (SDH; EC 1.3.99.1), produzindo a coenzima reduzida FADH_2 (Champe et al., 2012; Murray et al., 2014; Riegel, 2001; Smith et al., 2007). O fumarato resultante é convertido a malato pela fumarase (EC 4.2.1.2) que catalisa a adição de água por meio da dupla ligação do fumarato, e subsequentemente transformado em oxalacetato pela malato desidrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) (Murray et al., 2014; Riegel, 2001; Smith et al., 2007). Nessa última reação do ciclo, o malato é oxidado a um grupo carbonila pela doação de elétrons para NAD^+ , produzindo o terceiro e último NADH do ciclo (Champe et al., 2012; Smith et al., 2007). Em consequência das oxidações catalisadas pelas desidrogenases do ciclo do ácido cítrico, são produzidas três moléculas de NADH e uma de FADH_2 para cada molécula de acetil-CoA catabolizada em uma volta do ciclo, que são transferidos para a cadeia de transporte de elétrons (Murray et al., 2014).

1.5.2 Cadeia transportadora de elétrons

O passo seguinte ao ciclo do ácido cítrico é a cadeia transportadora de elétrons (Figura 4), a qual consiste de vários complexos proteicos grandes e de dois componentes pequenos e independentes – ubiquinona e citocromo c, formando uma série de carregadores que agem sequencialmente (Nelson e Cox, 2013; Baynes e Dominiczak, 2015). Cada etapa da cadeia de transporte de elétrons

envolve uma reação redox, na qual deixa os componentes com potenciais de redução mais negativos e caminha para componentes com potenciais de redução mais positivos (Baynes e Dominiczak, 2015). Todo o processo inicia-se com a doação de elétrons pelas coenzimas reduzidas NADH e FADH₂. À medida que os elétrons fluem através da cadeia transportadora de elétrons, eles perdem muito de sua energia livre, que pode ser captada e armazenada para a produção de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (P_i) (Champe et al., 2012).

Do NADH, os elétrons são transferidos através do complexo I (NADH-desidrogenase), uma grande proteína com múltiplas subunidades em forma de L, com um braço “horizontal” saindo na membrana e um braço “vertical” que se projeta para dentro da matriz mitocondrial. E o FADH₂ participa como grupo prostético do complexo II (succinato desidrogenase), uma proteína integrante da membrana mitocondrial interna (Berg et al., 2011; Murray et al., 2014; Smith et al., 2007). A partir daí, sequencialmente, os elétrons são carreados pela coenzima Q (CoQ ou ubiquinona) até o complexo II-III (citocromo *c* oxirredutase). A coenzima Q pode aceitar átomos de hidrogênio tanto do complexo I, quanto do complexo II (Champe et al., 2012; Smith et al., 2007). Do complexo II-III, os elétrons são passados ao citocromo *c* e, finalmente, chegam ao complexo IV (citocromo *c* oxidase) (Smith et al., 2007). Esse último apresenta uma afinidade muito alta pelo O₂, pois contém o sítio de ligação para o O₂, o que permite à cadeia respiratória funcionar à velocidade máxima até o tecido tornar-se virtualmente anóxico (Murray et al., 2006; Smith et al., 2007). Quando o O₂ recebe elétrons da cadeia, ele é reduzido a H₂O (Smith et al., 2007). Como essa reação é irreversível, ela orienta a direção do movimento dos equivalentes redutores na cadeia respiratória e a produção de ATP, a qual a cadeia está acoplada (Murray et al., 2006).

A transferência de elétrons entre os componentes da cadeia de transporte de elétrons faz com que os prótons sejam bombeados da matriz para o espaço intermembranas, de dentro para fora da membrana mitocondrial interna através dos complexos I, III e IV, que atuam como uma bomba de prótons (Baynes e Dominiczak, 2015; Murray et al., 2006). Para cada par de elétrons transferidos para o O₂, quatro prótons são bombeados para fora pelo complexo I, quatro pelo complexo III e dois pelo complexo IV (Nelson e Cox, 2013). O movimento transmembrana de prótons produz um gradiente eletroquímico com dois componentes: o potencial de membrana e o gradiente de prótons. Esse gradiente eletroquímico também é chamado de força próton-motriz, pois é a energia que empurra os prótons a reentrar na matriz para equilibrar

ambos os lados da membrana e que impulsiona a síntese de ATP (Smith et al., 2007). A diferença de potencial eletroquímico é utilizada para orientar a ATP-sintase (complexo V), que na presença de ADP+P_i, forma ATP (Murray et al., 2006). O complexo V está embebida na matriz interna, onde diversas subunidades de proteínas assumem uma forma semelhante a uma bola, dispostas ao redor de um eixo que se projeta para dentro da matriz e contém o mecanismo de fosforilação (Murray et al., 2014). Uma proteína ligada a esse eixo afasta a membrana e forma um canal de prótons. O fluxo de prótons por essa proteína provoca sua rotação, direcionando a produção de ATP no complexo (Murray et al., 2014).

Edema cerebral grave, deficiência na mielina, degeneração da substância branca, necrose cerebelar e considerável perda de células nervosas na substância negra e no núcleo pontino sugere que a homeostase energética cerebral está alterada na DXB (Pilla et al., 2003a).

1.6 CREATINA QUINASE (CK)

Em 1963, Cain e Davis demonstraram que o ATP era usado diretamente nos processos contráteis e deram suporte ao papel da fosfocreatina como uma reserva de fosfato 'rica em energia' que poderia ser usada para manter a concentração de ATP (Newsholme et al., 1978).

A creatina quinase (CK, EC 2.7.3.2) é uma importante enzima, cujo desenvolvimento padrão indica um rápido aumento na atividade total da CK entre os 15-20 dias de idade em ratos jovens. Antes desse período, a atividade permanece em menos de um terço dos adultos. Isso corresponde ao período em que o crescimento neuronal e o estabelecimento de sinapses está ocorrendo e logo após o desenvolvimento de enzimas do ciclo de Krebs e ao mesmo tempo do desenvolvimento da piruvato desidrogenase cerebral e do início da atividade da hexoquinase mitocondrial (Booth e Clark, 1978). A CK catalisa a transferência reversível de um grupo N-fosforil da fosfocreatina (PCr) para o difosfato de adenosina (ADP), originando trifosfato de adenosina (ATP) e creatina (Cr). Posteriormente, a fosfocreatina pode ser resintetizada na mitocôndria e transportado para exercer o seu papel na geração de trifosfato de adenosina no citosol (Campos-Ferraz et al., 2014). O grupo fosfato do ATP sintetizado na matriz mitocondrial é transferido pela enzima CK mitocondrial para a Cr, através da transferência reversível desse grupo para o grupo guanidino da Cr, com consequente liberação de ADP e PCr. A reação da

CK é de equilíbrio e, por essa razão, reversível. O ADP, liberado pela ação dessa enzima mitocondrial pode ser transportado diretamente de volta à matriz, onde é refosforilado a ATP (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000). A constância da concentração de ATP é devido à regeneração de ATP a partir do catabolismo da fosfocreatina (Newsholme et al., 1978). A PCr deixa a mitocôndria e se difunde através do citosol para os sítios de consumo de ATP, onde a enzima CK citosólica regenera o ATP e assim garantem alto potencial de fosforilação. De acordo com essa hipótese, o transporte de fosfatos de alta energia entre os sítios de produção e consumo de ATP é alcançado principalmente pela PCr e Cr (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000). Altas concentrações da atividade de fosfocreatina e CK também são encontradas no cérebro. A CK também tem função na manutenção dos gradientes iônicos no cérebro ao ser acoplada a um conjunto particularmente instável de ATP associada com adenosina trifosfatase e na estimulação da respiração mitocondrial ao sustentar concentrações locais de ADP (Booth e Clark, 1978). A creatina e a fosfocreatina têm efeitos neuroprotetores contra a privação de energia e da excitotoxicidade do glutamato, atribuível a um aumento nas reservas de fosfato de alta energia citosólicas (Brustovetsky et al., 2001).

A CK é altamente sensível às espécies reativas de oxigênio (EROs) devido à presença de resíduos de cisteína em seu sítio ativo (Kaneko et al., 1993; Gross et al., 1996). Com essa inibição causada pela oxidação dos grupos sulfidrila, pode ocorrer deficiência energética, acúmulo de ADP e excesso de cálcio intracelular (Gross et al., 1996). Sabe-se que a desestabilização da energia celular por exposição crônica a EROs pode ocorrer em muitas doenças neuromusculares (Mattson, 1992). Além disso, estudos demonstraram a relação fisiopatológica da CK com patologias cerebrais tais como doenças de Alzheimer e Pick (Aksenov et al., 1997; David et al., 1998).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando-se que os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no dano cerebral característico da DXB ainda não estão completamente estabelecidos e que o tratamento mais utilizado baseia-se na restrição dietética, o que acarreta a deficiência de ácidos graxos ômega-3, torna-se importante estudar o efeito da suplementação com ômega-3 sobre as alterações metabólicas causadas pelos AACR, na tentativa de estabelecer novas estratégias para essa doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da suplementação com ácidos graxos ômega-3 em tratamentos pré e pós-natal sobre parâmetros de metabolismo energético em animais submetidos a um modelo experimental de DXB.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito da suplementação pré e pós-natal com ácidos graxos ômega-3 sobre a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons em cérebro (córtex cerebral, estriado e hipocampo) de animais submetidos a um modelo experimental de DXB;
- b) Avaliar o efeito da suplementação pré e pós-natal com ácidos graxos ômega-3 sobre a atividade da enzima CK em cérebro (córtex cerebral, estriado e hipocampo) de animais submetidos a um modelo experimental de DXB.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados aproximadamente 30 ratos (machos e fêmeas de 7 dias de idade) e 6 fêmeas adultas (60 dias de idade) da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram mantidos em grupos de 5 animais por caixa, em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas (07h00 às 19h00), a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e com exaustão. Os animais tiveram livre acesso à água e ao alimento. Os filhotes foram mantidos com as mães até o desmame (21 dias). A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta Universidade (protocolo n° 057/2015-1; Anexo A), levando em consideração a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, aprovada por meio da Portaria do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) n° 465 (23/05/2013).

Todos os procedimentos foram realizados por pessoas treinadas e qualificadas em local específico para manipulação animal.

4.2 POOL DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA

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

4.3 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3

Para a administração de ácidos graxos ômega-3 aos animais tanto no período pré-natal quanto no pós-natal, foram utilizadas cápsulas comerciais contendo 125 mg de DHA e 188 mg de EPA dissolvidos em 1 mL de óleo de peixe, conforme descrito no rótulo do fabricante, marca Vitamed (Caxias do Sul, Brasil).

4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

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

4.4.1 Protocolo Pré-natal - Administração crônica do pool de aminoácidos de cadeia ramificada e tratamento com ácidos graxos ômega-3 no período pré-natal.

Após um período de acasalamento de aproximadamente 3 dias, os machos foram retirados das caixas e as ratas gestantes foram suplementadas com ácidos graxos ômega-3 ou água (controle), uma vez por dia, durante o período gestacional (\pm 21 dias). A dose de ômega-3 foi de 0,8 g/kg de peso corporal (Ozyurt et al., 2007) administrada por via orogástrica (gavagem). Após o nascimento dos filhotes, as ratas não foram mais suplementadas. Os ratos infantis (com 7 dias de idade) receberam duas administrações diárias de um *pool* de AACR (15,8 μ L/g de peso corporal), com intervalo de 12 horas entre as administrações, por via subcutânea, no período de 21 dias (crônico), sendo a última administração no 28º dia de vida (Bridi et al., 2006). Doze horas após a última administração do *pool* de AACR, os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina e as estruturas cerebrais hipocampo, estriado e córtex foram removidas e homogeneizadas em tampão PBS (Figura 2).

P.S. Os ratos não foram anestesiados para não alterar a bioquímica cerebral.

hipocampo, estriado e córtex foram removidas e homogeneizadas em tampão PBS (Figura 3).

P.S. Os ratos não foram anestesiados para não alterar a bioquímica cerebral.

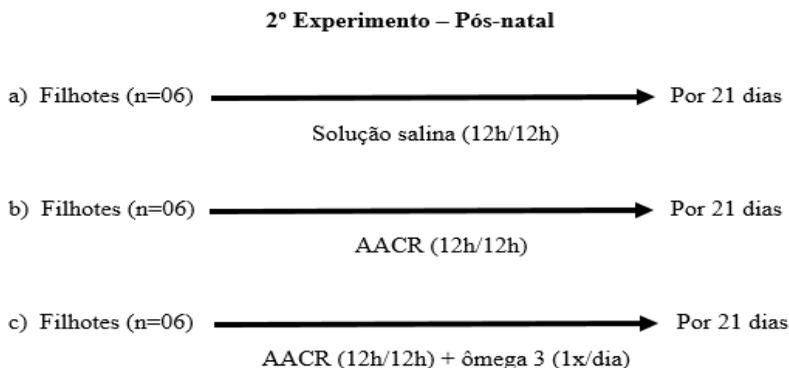


Figura 3: Representação esquemática do modelo da doença da urina do xarope do bordo (DXB) em ratos infantis e tratamento pós-natal com ômega-3. A figura mostra a administração do *pool* de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) para indução de DXB ou salina (controle) por 21 dias (7° ao 28° dia) em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

4.5 PREPARO DA AMOSTRA

Após a eutanásia, a caixa craniana foi aberta e o seu conteúdo retirado e, a partir de então, mantido sobre uma placa de vidro a aproximadamente 0 °C. O bulbo olfatório e o tronco cerebral foram desprezados. As estruturas cerebrais córtex, estriado e hipocampo foram isoladas, limpas e homogeneizadas (1:20, peso/volume) em tampão SETH (250 mM de sacarose, 2 mM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), 10 mM de trizma base e 50 UI/mL de heparina) pH 7,4. As amostras foram centrifugadas a 800 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi reservado em alíquotas e armazenado a -80 °C até o momento da determinação das atividades enzimáticas.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA

4.6.1 Determinação da atividade do Complexo I (NADH desidrogenase)

Ao meio contendo tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,4) e proteínas do homogeneizado foram adicionados 14 mM de NADH, 1 mM de rotenona e 10 mM de ferrocianeto de potássio. As absorbâncias foram registradas por 3 minutos a 420 °C. A atividade do complexo I (EC 1.6.5.3) foi medida através da taxa de redução do ferricianeto dependente de NADH (Cassina e Radi, 1996). Os resultados foram expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

4.6.2 Determinação da atividade do Complexo II (succinato:ubiquinona oxirredutase)

O meio de incubação foi constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), 16 mM de succinato de sódio e 8 μM de 2,6-dicloroindofenol (DCIP). Inicialmente, pré-incubou-se com 40-80 μg de proteínas do homogeneizado a 30°C por 20 minutos. Depois, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7 μM de rotenona e a reação iniciou com adição de 40 μM de DCIP. As absorbâncias foram registradas por 5 minutos em 600 nm. A atividade do complexo II (EC 1.3.5.1) foi medida pela diminuição da absorbância causada pela redução do DCIP (Fischer et al., 1985). Os resultados foram expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

4.6.3 Determinação da atividade do Complexo II+CoQ+III (succinato: citocromo c oxirredutase)

O meio de reação, constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4) contendo 16 mM de succinato de sódio, foi pré-incubado com 40-80 μg de proteínas do homogeneizado a 30°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7 μM de rotenona e a reação se iniciou pela adição de 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de citocromo c e as absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 550 nm. A atividade do complexo II+CoQ+III (EC 1.3.99.1) foi medida pelo aumento da absorbância causado pela redução do citocromo c (Fischer et al., 1985). Os resultados foram expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

4.6.4 Determinação da atividade do Complexo IV (citocromo c oxidase)

O meio de incubação continha tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0), N-dodecil-D-maltosídeo (0,6 mM) e 10-20 µg de proteínas (homogeneizado). A reação foi iniciada pela a adição de 0,7 µg de citocromo *c* reduzido. A atividade do complexo IV (EC 1.9.3.1) foi medida a 25°C por 10 minutos pelo decréscimo na absorbância devido à oxidação de citocromo *c* previamente reduzido. As leituras foram feitas em 550 nm (Rustin et al., 1994). Os resultados foram expressos em nmol . min⁻¹. mg de proteína⁻¹.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CREATINA QUINASE (CK)

Para a determinação da atividade da CK (EC 2.7.3.2), a reação foi iniciada pela adição de difosfato de adenosina (ADP) 3,2 mM em meio contendo 7,08 mM de fosfocreatina e de 0,8 a 1 µg de proteínas (homogeneizado). Após um período de 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de ácido *p*-hidroximercuribenzoico 50 mM e a coloração rósea foi obtida pela adição de α -naftol 20% e diacetil 20%. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 540 nm, segundo o método de Hughes (1962). Para calcular a atividade da creatina quinase nas amostras, foi feita uma curva de calibração utilizando-se creatina como padrão. Os resultados foram expressos em µmol de creatina . min⁻¹. mg de proteína⁻¹.

4.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi realizada através do método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística utilizada foi selecionada de acordo com o desenho experimental utilizado e com o tipo de distribuição apresentado pelo conjunto dos dados.

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

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

5 RESULTADOS

5.1 1º EXPERIMENTO – PRÉ-NATAL

Para verificar o efeito da suplementação de ômega-3 no período gestacional (pré-natal) em ratas mães que receberam suplementação com ômega-3 das que não receberam, foram analisadas as atividades dos Complexos I, II, II-III, IV da cadeia de transporte de elétrons e CK em estruturas cerebrais da prole com Doença da Urina de Xarope de Bordo (DXB).

Com relação aos complexos da cadeia de transporte de elétrons, pode-se observar que os resultados não indicam alterações estatisticamente significativas sobre as atividades dos complexo I, II, II-III e IV nas estruturas cerebrais hipocampo, estriado e córtex cerebral (Figura 4).

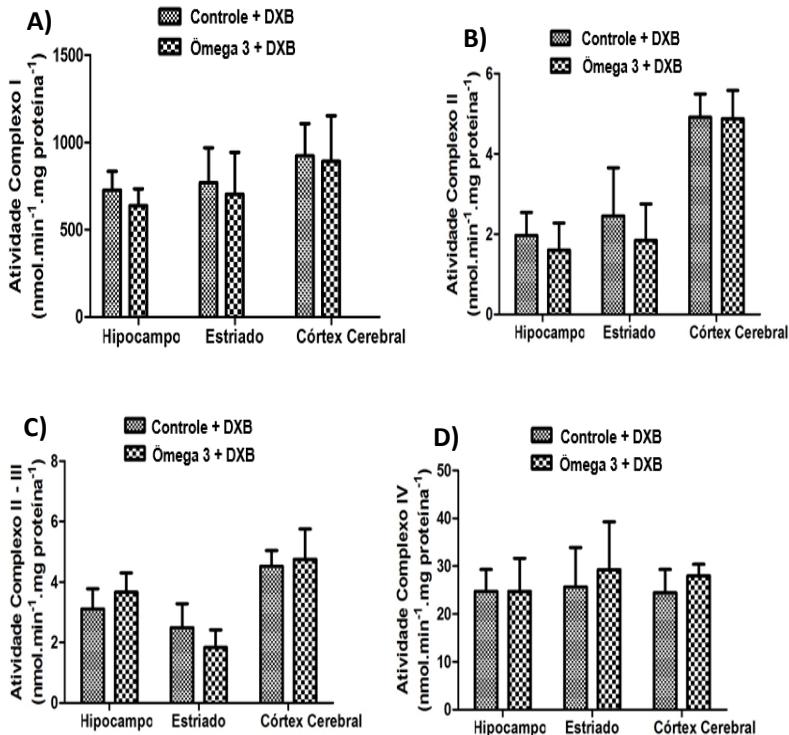


Figura 4 - Efeito da suplementa\u00e7\u00e3o materna com \u00f4mega-3 durante o per\u00edodo gestacional (pr\u00e9-natal) sobre o dano as atividades dos complexos I (A), complexo II (B), complexo II-III (C) e complexo IV (D), em estruturas cerebrais da prole com doen\u00e7a da urina do xarope do bordo (DXB). *M\u00e9todo Estat\u00edstico Empregado*: Teste *t* de Student para amostras independentes expressos por m\u00e9dia \pm DP. N\u00e3o houve diferen\u00e7a significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Com rela\u00e7\u00e3o \u00e0 CK, pode-se observar que os resultados n\u00e3o indicam altera\u00e7\u00f5es estatisticamente significativas sobre a atividade da enzima nas estruturas cerebrais hipocampo, estriado e c\u00f3rtex cerebral, conforme os dados apresentados abaixo (Figura 5), com suplementa\u00e7\u00e3o com \u00f4mega-3 durante a gesta\u00e7\u00e3o (pr\u00e9-natal)

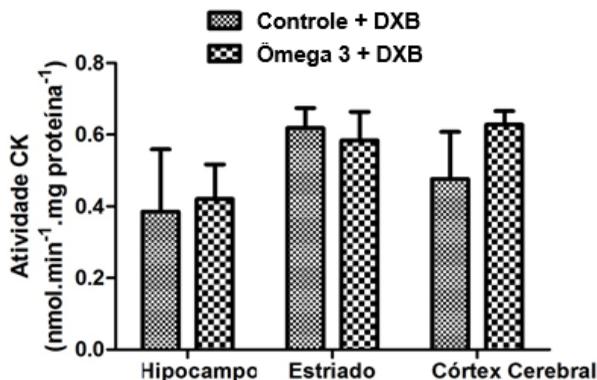


Figura 5 - Efeito da suplementação materna com ômega-3 durante o período gestacional (pré-natal) sobre a atividade da Creatina Quinase (CK) em estruturas cerebrais da prole com doença da urina do xarope do bordo (DXB). *Método Estatístico Empregado:* Teste *t de Student* para amostras independentes expressos por média±DP. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$).

5.2 2º EXPERIMENTO – PÓS-NATAL

Para verificar a suplementação de ômega-3 pós natal, foram utilizados três grupos: controle, DXB e prole de DXB suplementado com ômega-3. Assim como no período pré natal, foram analisadas as atividades dos complexos da cadeia de transporte de elétrons, Complexo I, Complexo II, Complexo II-III, Complexo IV e CK em estruturas cerebrais da prole com Doença da Urina de Xarope de Bordo (DXB).

Os resultados mostram que a suplementação com ômega-3 durante o período pós-natal não indicam relevância estatística sobre a atividade dos complexos I, II, II-III e IV nas estruturas cerebrais hipocampo, estriado e córtex cerebral (Figura 6).

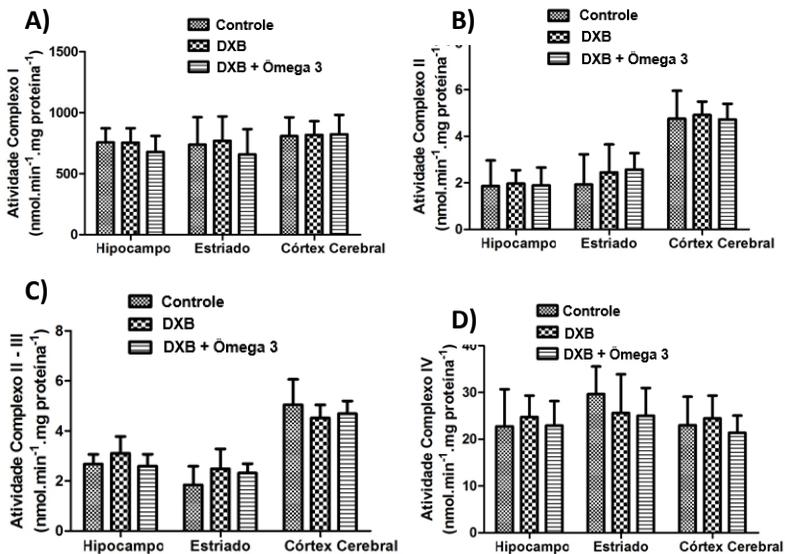


Figura 6 - Efeito da suplementação do ômega-3 no período puerperal (pós-natal) sobre o dano a atividade dos complexos I (A), complexo II (B), complexo II-III (C) e complexo IV (D), em estruturas cerebrais da prole com doença da urina do xarope do bordo (DXB). *Método Estatístico Empregado:* Teste *One Way Anova* para amostras emparelhadas expressos por média±DP. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Os resultados mostram que a suplementação com ômega-3 durante o período pós-natal não indicam relevância estatística sobre a atividade da CK nas estruturas cerebrais hipocampo e estriado. Já no córtex cerebral, os animais da prole DXB que recebeu a suplementação de ômega-3 tiveram uma diminuição estatisticamente significativa na atividade de CK quando comparado com os demais grupos, conforme os dados apresentados abaixo (Figura 7).

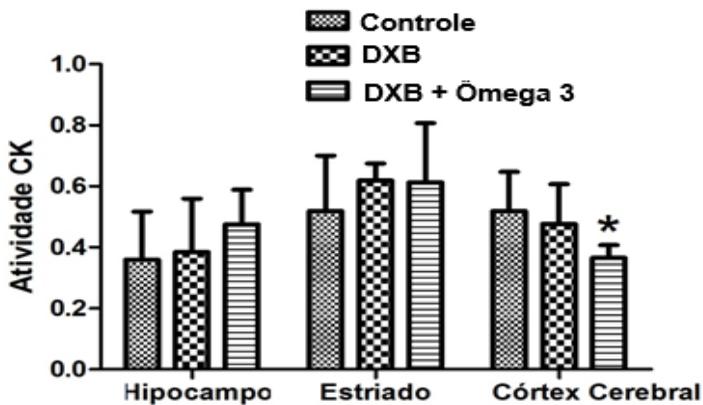


Figura 7 - Efeito da suplementação do ômega-3 no período puerperal (pós-natal) sobre o dano a atividade da Creatina Quinase (CK) em estruturas cerebrais da prole com doença da urina do xarope do bordo (DXB). *Método Estatístico Empregado:* Teste *One Way Anova* para amostras emparelhadas expressos por média \pm DP. Houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Quando o metabolismo dos AACR é prejudicado geneticamente em humanos, os níveis séricos de AACR e seus metabólitos sobem consideravelmente, causando uma disfunção neurológica grave (Wang et al., 2015). O dano neurológico que ocorre na DXB estabelece o risco associado com as concentrações elevadas de AACRs ou seus cetoácidos (Harris et al., 2005). Os ácidos graxos ômega-3 e seus derivados podem auxiliar processos fisiológicos e de desenvolvimento importantes; podem formar eicosanoides; apresentam propriedades neuroprotetoras e representam um tratamento potencial para uma variedade de doenças neurodegenerativas e neurológicas (Lands, 1992; Dyall, 2015).

Nesse estudo, foram realizados dois experimentos para investigar o efeito da suplementação com ácidos graxos ômega-3 em tratamentos pré e pós-natal sobre parâmetros de metabolismo energético em animais submetidos a um modelo experimental de DXB. No primeiro experimento, ratas grávidas foram submetidas à suplementação com ácidos graxos ômega-3 e sua prole foi submetida a um modelo experimental de DXB. No segundo experimento, as mães não foram tratadas durante o período gestacional e os filhotes foram submetidos ao modelo de DXB induzido quimicamente e tratados com ácidos graxos ômega-3. Esses dois protocolos de tratamento foram aplicados para avaliar se os ácidos graxos ômega-3 alterariam o funcionamento a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons e da enzima CK em estruturas cerebrais (córtex cerebral, estriado e hipocampo) dos filhotes submetidos a um modelo experimental de DXB.

O desenvolvimento do tecido nervoso do feto tem início durante as primeiras fases (semanas) da gestação. O processo de mielinização ocorre, principalmente, entre o 2º trimestre da gestação e final do primeiro ano pós-natal. (Hadders-Algra, 2010). A formação do sistema nervoso é mediada por processos neuroquímicos e atividade neural (Goda e Davis, 2003).

O feto tem uma necessidade de ácidos graxos ômega 6 e ômega 3 e seus derivados, o ácido dihomo gama linolênico (DGLA), ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), esse essencial para o desenvolvimento do cérebro e da retina, para suportar o crescimento e a atividade celular rápidas (Haggarty, 2004; Haggarty, 2010). O organismo do feto e do recém-nascido consegue realizar os processos de conversão dos precursores ômega-3 e ômega-6, mas os sistemas enzimáticos

envolvidos parecem ser incapazes de fornecer DHA e AA suficientes para atender às altas exigências até a 16ª semana de idade (Lauritzen et al., 2001). Isso indica que no desenvolvimento fetal, o fornecimento desses ácidos graxos depende da ingestão materna e após o nascimento, os mesmos devem ser fornecidos no leite (Green et al, 1998; Larque et al., 2002; Hadders-Algra et al., 2010).

Estudos indicam que a suplementação com esses ácidos graxos pode exercer efeitos benéficos durante a gravidez, pois exibem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, prevenindo o parto prematuro, melhora o desenvolvimento visual e cognitivo do feto (Haggarty, 2004; Carlson et al., 2013; Jones et al., 2013a; Jones et al., 2014). Durante o período da gravidez, há uma preocupação quanto à ingestão insuficiente de ômega 3 durante os períodos críticos de desenvolvimento neurológico fetal, em função da dieta pobre desses ácidos graxos na dieta ocidental (Meldrum et al., 2015). Dados demonstram que a proporção na ingestão de ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 sofreu variações ao longo da evolução, de uma proporção de 1:1 para 1:10-20, podendo isso estar associado a algumas patologias (Simopoulos, 2011)

Nos resultados do experimento, comprovou-se que a suplementação materna com ácidos graxos ômega-3 durante o período pré-natal não trouxe resultados estatísticos relevantes quanto ao funcionamento da mitocôndria e, conseqüentemente, aos complexos da cadeia de transporte de elétrons e também os dados não foram estatisticamente significativos com relação à CK, nas estruturas cerebrais hipocampo, estriado e córtex cerebral da prole de ratos submetida ao modelo de DXB quimicamente induzido. Esses resultados estão em desacordo com estudos que indicam que a suplementação materna com ácido graxo ômega 3 pode melhorar as respostas inflamatórias nos infantes pré-termo; apresentar funções importantes no desenvolvimento neurológico do feto e recém-nascido e por causa de seu papel na inflamação; aumentar a duração gestacional e reforçar o neurodesenvolvimento infantil e proporcionar uma intervenção terapêutica para limitar a inflamação da placenta e o estresse oxidativo associados com vários distúrbios de gravidez (Jensen, 2006; Grenberg et al., 2008; Valentine, 2012; Rogers et al., 2013; Jones et al., 2014).

Ressalta-se a importância dos dados do primeiro experimento, que estão em acordo com estudos que sugerem que embora o cérebro do recém-nascido tenha uma concentração relativamente elevada de DHA, a acreção absoluta durante a vida no útero é pequena (Haggarty, 2004). Um súbito acréscimo DHA e AA ocorre pela primeira vez no último

trimestre de gestação, com evidências de maior acúmulo de AA do que DHA (Martinez e Mougan, 1998; Hadders-Algra, 2010).

Muitos estudos clínicos recentes têm fornecido DHA de alguma forma para mulheres grávidas para avaliar tanto o desenvolvimento da gravidez e/ou o desenvolvimento infantil, com resultados conflitantes em ambos os casos (Carlson et al., 2013). Existem muitas variáveis entre os estudos de suplementação na gravidez que poderiam explicar a discrepância nos resultados observados, como dosagem da suplementação, o tipo de alimentação materna e até mesmo a fonte do DHA suplementado. Após o nascimento, o DHA armazenado é largamente utilizado nos primeiros 2 meses de vida pós-natal (Farquharson et al., 1993), aparentemente para manter processos como o desenvolvimento cerebral e da retina durante os primeiros meses críticos de vida pós-natal (Haggarty, 2004). Como não houve suplementação nos filhotes após o nascimento no primeiro experimento, esse fator talvez explique os resultados apresentados.

Quanto à administração de ômega-3 no período pós-natal, os resultados do estudo mostraram que também não houveram resultados estatísticos relevantes quanto ao funcionamento da mitocôndria e, portanto, aos complexos da cadeia de transporte de elétrons nas estruturas cerebrais avaliadas da prole de ratos submetida ao modelo de DXB quimicamente induzido. Com relação à CK, os dados também não resultaram em dados estatísticos importantes sobre sua atividade nas estruturas cerebrais hipocampo e estriado, sendo identificado uma diminuição estatisticamente significativa de sua ação na área do córtex cerebral, nesses mesmos ratos. No cérebro, os ácidos graxos de cadeia longa acumulam principalmente na substância cinzenta cortical, particularmente nas membranas sinápticas e, em menor medida, na substância branca (Hadders-Algra, 2010).

Está bem estabelecido que a amamentação está associada a um melhor prognóstico neurológico, cognitivo e comportamental do que a alimentação com fórmulas, a questão é se a suplementação de DHA, EPA e AA da fórmula infantil pode promover o desenvolvimento neurológico (Hadders-Algra, 2010). No caso da DXB, um dos caminhos do tratamento é através da manutenção das concentrações plasmáticas dos AACR normais, com uma dieta rígida e ingestão mínima dos AACR para evitar o seu acúmulo, limitando ao mínimo necessário para o desenvolvimento normal. As fórmulas comerciais dietéticas para o tratamento da DXB apresentam uma ausência quase que total de ácidos graxos da classe ômega-3 e um excesso de ácidos graxos ômega-6, o que leva a uma proporção ômega-6/ ômega-3 na dieta de quatro a cinco

vezes mais elevada do que a estimada para o equilíbrio dietético de ácidos graxos essenciais para os humanos (Strauss e Morton, 2003). Existe um efeito competitivo entre os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 pelas enzimas redutoras de saturação e o alto consumo de ácido linoleico interfere no alongamento das cadeias do ácido α -linolênico (Farahani et al., 2015). Tipicamente, na deficiência de ácidos graxos, o DPA, tende a acumular-se ao mesmo tempo em que o DHA diminui (Neuringer et al., 1986).

O EPA e DHA são aumentados em lipídios plasmáticos e membranas celulares do sangue em resposta à suplementação, enquanto o AA é correspondentemente diminuído (Walker et al., 2015). Uma ingestão elevada de DHA reduz a inflamação deslocando o AA, um precursor pró-inflamatório, e colesterol a partir da membrana celular, assim, diminuindo os precursores biossintéticos disponíveis para a produção de mediadores inflamatórios (Begum et al., 2013). Uma diminuição no teor de AA na membrana celular e um aumento em EPA e DHA altera o equilíbrio de eicosanóides e produção de citocinas a partir de um perfil geralmente pró-inflamatório para um perfil menos inflamatório e ainda resolver a inflamação (Calder, 2015). Devido às ações opostas de AA e de EPA e DHA na inflamação, na imunidade e na coagulação do sangue, tem sido considerável o foco na capacidade de EPA e DHA de diminuir o teor de AA de lípidos no sangue e células (Walker et al., 2015).

As implicações práticas para os estudos sobre o efeito da suplementação de os ácidos graxos de cadeia longa dependem do momento da suplementação, pois o efeito da suplementação pós-natal em pré-termos deve ser diferente daqueles a termo, em função das contínuas mudanças no desenvolvimento cerebral (Hadders-Algra, 2010). Simmer et al. (2008), concluíram que os ensaios clínicos randomizados sobre o efeito da suplementação de DHA, EPA e AA pós-natal da fórmula de leite em bebês nascidos a termo não mostraram um efeito benéfico desses ácidos graxos em resultado do desenvolvimento neurológico. Essa mesma suplementação em nascidos pré-termo e nos nascidos a termo não demonstraram evidências de um efeito positivo nos resultados de neurodesenvolvimento na infância tardia (Hadders-Algra, 2010; Hadders-Algra, 2011).

A deficiência cerebral de DHA pode levar a deficiência do sistema visual, disfunção sináptica, dinâmica de neurotransmissores anormais, excitabilidade patológica, a expressão genética cerebral alterada, e distúrbios comportamentais (Strauss e Morton, 2003). O DHA também demonstrou papéis neuroprotetores contra o estresse

oxidativo através de sua habilidade de limpar a produção de radicais livres intracelulares que são induzidos por peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radicais hidroxila em células ganglionares de retina (Shimazawa et al., 2009). O mecanismo neuroprotetor pelo qual a neuroprotetina D1 (NPD-1), um derivado do DHA, age em condições de estresse oxidativo é pelo aumento na regulação dos fatores antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-x e a consequente diminuição na regulação dos fatores pro-apoptóticos Bax and Bad (Lukiw et al., 2005).

Estudos em animais mostraram que a produção excessiva de radicais livres e a diminuição das defesas antioxidantes são induzidos por metabólitos acumulados em vários erros inatos do metabolismo (Barschak et al., 2008b). Na DXB, o aumento dos níveis de AACRs, principalmente a leucina, provoca um aumento no estresse oxidativo. O estresse oxidativo tem sido reconhecido como um risco e um fator de contribuição para várias fisiopatologias, incluindo inflamação e lesão tecidual, arteriosclerose, diabetes, doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer e doença, Parkinson, câncer e envelhecimento, entre outras (Barschak et al., 2008a; O'neil et al., 2015). Consequências indesejáveis do aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido a superprodução desregulada ou falha nos sistemas antioxidantes podem ser detectadas por mudanças nas respostas celulares, como o aumento da apoptose ou proliferação celular e até em casos de adaptação celular global pelo aparecimento de modificações oxidativas no DNA, proteínas ou lipídios. (O'neil et al., 2015; Sullivan e Chandel, 2014).

As indicações das funções neuroprotetoras dos ácidos graxos ômega 3 tem aumentado constantemente nos últimos anos, incluindo efeitos sobre memória e aprendizado e prevenção de doenças neurodegenerativas pela desaceleração do declínio cognitivo e representam um tratamento potencial para uma variedade de doenças neurodegenerativas e neurológicas (Dyall, 2015; Schmidt et al., 2015).

Os importantes progressos no entendimento das bases bioquímicas e moleculares dos erros inatos do metabolismo (EIMs) intermediários tem proporcionado um arsenal terapêutico cada vez maior para o manejo de muitas dessas condições (Schwartz et al., 2008). Dessa forma a utilização da suplementação com ácidos graxos ômega-3 deve ser melhor avaliada como uma estratégia terapêutica para diversas doenças neurodegenerativas, entre elas, a DXB.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados nos experimentos, identificou-se que a suplementação pré e pós-natal com ácidos graxos ômega-3 não apresentou dados estatísticos significativos sobre a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons em áreas cerebrais de animais submetidos a um modelo experimental de DXB. No caso da atividade da enzima creatina quinase, a suplementação materna com ácidos graxos ômega-3 também não apresentou resultados significativos estatisticamente nas mesmas estruturas cerebrais. Já a suplementação pós-natal apresentou uma tendência de diminuição na atividade dessa enzima, especificamente na região do córtex cerebral. Esses resultados sugerem que estudos adicionais são necessários para se avaliar a efetividade da suplementação com ácidos graxos ômega 3, nos períodos pré e pós-natal e determinar sua eficácia sobre os complexos da cadeia de transporte de elétrons e sobre a enzima CK.

REFERÊNCIAS

Adam O, Wolfram G, Zollner N. Effect of α -linolenic acid in the human diet on linoleic acid metabolism and prostaglandin biosynthesis. *J. Lipid Res.* 1986; 27: 421-426.

Aksenov MY, Aksenova MV, Payne RM, Smith CD, Markesbery WR, Carney JM. The expression of creatine kinase isoenzymes in neocortex of patients of with neurodegenerative disorders: Alzheimer's and Pick's disease. *Exper Neurol.* 1997; 146:458-465.

Amâncio FAM, Scalco FB, Coelho CAR. Diagnostic investigation of inborn errors of metabolism in a university hospital. *J Bras Patol Med Lab.* 2007; 43(3):169-174.

Araújo P, Wassermann GF, Tallini K, Furlanetto V, Vargas CR, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M. Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem Int.* 2001; 38(6):529-37.

Avramovic N, Dragutinovic V, Krstic D, Colovic MB, Trbovic A, De Luka S, Milovanovic I, Popovic T. The effects of omega 3 fatty acid supplementation on brain tissue oxidative status in aged wistar rats. *HIPPOKRATIA* 2012; 16(3): 241-245.

Axler O, Holmquist P. Intermittent maple syrup urine disease: two case reports. *Pediatrics.* 2014; 133:458-460.

Barschak AG, Sitta A, Deon M, Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, VARGAS CR. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with Maple Syrup Urine Disease. *Metab Brain Dis.* 2006; 21:279-286.

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.* 2008a; 23:71-80

Barschak AG, Marchesan C., Sitta A., Deon M., Giugliani, R., Wajner, M., Vargas, CR. Maple syrup urine disease in treated patients: Biochemical and oxidative stress profiles. *Clin Biochem.* 2008b; 41:317-324.

Baynes JW, Dominiczak, MH. (Org.) (). *Bioquímica médica.* 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015. 653 p.

Bazan NG, Molina MF, Gordon WC. Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annu Rev Nutr.* 2011; 21(31): 321-351.

Begum G, Harvey L, Dixon CE, Sun D. ER stress and effects of DHA as an ER stress inhibitor. *Transl Stroke Res.* 2013; 4(6).

- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Bioquímica*. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
- Booth RFG, Clark JB. Studies on the mitochondrially bound form of rat brain creatine kinase. **Biochem J.** 1978; 15; 170(1): 145–151.
- Bradbury J. Docosahexaenoic Acid (DHA): An Ancient Nutrient for the Modern Human Brain. *Nutrients*, 2011; 3:529-554.
- Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Wajner M, Dutra-Filho CS. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Dev Neurosci.* 2003; 21:327–332.
- Bridi R, Braun CA, Zorzi GK, Wannmacher CMD, Wajner M, Lissi EG, Dutra-Filho CS. Alphaketo acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defenses in cerebral cortex from young rats. *Metab Brain Dis*, 2005; 20:155–167.
- Bridi R, Fontanella FU, Pulrolnik V, Braun CA, Zorzi GK, Coelho D, Wajner M, Vargas CR, Dutra-Filho CS. A chemically-induced acute model of maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies. *J Neurosci Methods.* 2006; 155: 224–230
- Brosnan JT. The fourth workshop on the assessment of adequate intake of dietary amino acids: general discussion of sessions 1 and 2. *J. Nutr.* 2005; 135:1576S–1579S.
- Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-chain aminoacids: enzyme and substrate regulation. *J. Nutr.*2006; 136: 207S-211S.
- Brustovetsky N, Brustovetsky T, Dubinsky JM. On the mechanisms of neuroprotection by creatine and phosphocreatine. *J Neurochem.* 2001; 76 (2):425-34.
- Byelashov OA, Sinclair AJ, Kaur G. Dietary sources, current intakes, and nutritional role of omega-3 docosapentaenoic acid. *Lipid Technology.* 2015; 27(4).
- Calder, P.C. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J. Nutr.* 2012; 142: 592S–599S.
- Calder, P.C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015; 1851: 469–484.
- Campos-Ferraz PL, Andrade I, Neves W, Hangai I, Alves CRR, Lancha Jr AH. An overview of amines as nutritional supplements to counteract cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2014; 5(2): 105–110.
- Carlson SE, Colombo J, Gajewski BJ, Gustafson KM, Mundy D, Yeast J, Georgieff MK, Markley LA, Kerling EH, Shaddy DJ. DHA supplementation and pregnancy outcomes *Am J Clin Nutr.* 2013; 97:808–15.

Casella EB, Rivero MEJ, Mercado MRM, Vieira MA, Marques-Dias MJ, Vaz FAC. Acrodermatitis enteropathica-like eruption in two children with maple syrup urine disease. *An Bras Dermatol*. 2007; 82(2):159-62.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxy nitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 328: 309-16.

Chalmers RA. Branched chain amino and keto acids in health and disease. *J Med Genet*. 1986; 23: 283-284.

Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. *Bioquímica ilustrada*. 5ª ed. Porto Alegre. Artmed, 2012.

Chang PKY, Khatchadourian A, McKinney RA, Maysinger D. Docosahexaenoic acid (DHA): a modulator of microglia activity and dendritic spine morphology. *J Neuroinflammation*, 2015; 12:34.

Chuang DT, Davie JR, Wynn RM, Chuang JL, Koyata H, Cox, RP. Molecular basis of maple syrup urine disease and stable correction by retro viral gene transfer. Symposium: alpha-keto acid dehydrogenase complexes: nutrient control, gene regulation and genetic defects. *J Nutr*; 1995. 1766-1772.

Chuang, D.T. Maple syrup urine disease: it has come a long way. *J Pediatr*, 1998; 132:17-23.

Chuang DT, Shih VE. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudt AL, Sly WL, Valle D. (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited disease*. 8º ed. New York: McGraw-Hill; 2001.

Chuang DT, Chuang JL, Wynn RM. Lessons from genetic disorders of branched-chain amino acid metabolism. *Branched-chain amino acids: metabolism, physiological function, and application*. *J Nutr*; 2006. 243-249.

Chuang DT, Wynn RM, Shih VE. Maple Syrup Urine Disease (Branched-Chain Ketoaciduria). *Scriver's OMMBD - online Metab.Mol Bases Inherit Dis* 2008;1-47.

Chuang JL, Wynn RM, Moss CC, Song JL, Li J, Awad N, Mandel H, Chuang DT. Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients: a proposed mechanism for the thiamin-responsive phenotype. *J. Biol. Chem*; 2004; 279: 17792-17800.

Couce ML, Ramos F, Bueno MA, Díaz, J, Meavilla S, Bóveda MD, Fernandez-Marmiesse A, García-Cazorla A. Evolution of maple syrup urine disease in patients diagnosed by newborn screening versus late diagnosis. *European J. Paediatric Neurol*; 2015; 1-8

Dancis J, Mortimer L, Miller S, Westall RG. Maple syrup urine disease. *British Medical Journal*, 1959; 91-93.

Danner DJ, Armstrong N, Heffelfinger SC, Sewell ET, Priest JH, Elsas LJ. Absence of branched chain acyl-transferase as a cause of maple syrup urine disease. *J Clin Invest*. 1985;75(3):858-60.

David SS, Shoemaker M, Haley BE. Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: correlation of reduced enzyme activity and active site photolabelling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Mol Brain Res*. 1998; 54: 276-287.

Dent CE, Westall RG. Studies in maple syrup urine disease. *Archives of disease in childhood*, 1960: 259-268.

Diau GY, Hsieh A, Sarkadi-Nagy E, Wijendran V, Nathanielsz P, Brenna JT. The influence of long chain polyunsaturate supplementation on docosahexaenoic acid and arachidonic acid in baboon neonate central nervous system. *B.M.C. Medicine* 2005; 3:11.

Doering CB, Danner DJ. Amino acid deprivation induces translation of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000; 279: C1587–C1594.

Dyall, SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2015; 7: 1-15

El-Ansary AK, Al-Daihan SK, El-Gezeery AR. On the protective effect of omega-3 against propionic acid-induced neurotoxicity in rat pups. *Lipids in Health and Disease*. 2011; 10:142.

El Husny AS, Fernandes-Caldato MC. Erros inatos do metabolismo: revisão de literatura. *Revista Paraense de Medicina*. 2006; 20 (2): 41-45.

Elango R, Ball RO, Pencharz PB. Recent advances in determining protein and amino acid requirements in humans. *British Journal of Nutrition*, 2012; 108:S22–S30.

Elias SL, Innis SM. Infant plasma trans, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. *Am Journal of Clinical Nutr*, 2001; 73: 807– 814.

Eppenberger HM, Dawson DM, Kaplan NO. The comparative enzymology of creatine kinases isolation and characterization from chicken and rabbit tissues. *J Biologic Chem*. 1967; 242: 204-209.

Farahani S, Zarandy MM, Hassanzadeh G, Shidfar F, Jalaie S, Rahimi V. The effect of low omega-3/omega-6 ratio on auditory nerve conduction in rat pups. *Acta Medic Iranica*. 2015; 53: 346-350.

- Farquharson J, Cockburn F, Patrick WA, Jamieson EC & Logan RW. Effect of diet on infant subcutaneous tissue triglyceride fatty acids. *Arch. Dis. Child*, 1993; 69: 589–593.
- Fernstrom JD. Branched-chain amino acids and brain function. 4th Amino Acid Assessment Workshop. *J Nutr*. 2005: 1539–1546.
- Fingerhut R, Simon E, Maier EM, Hennermann JB, Wendel U. Maple syrup urine disease: newborn screening fails to discriminate between classic and variant forms. *Clin Chem*. 2008;54:1739–41.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders M, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 1985; 153: 23–36.
- Fleith E, Clandinin MT. Dietary PUFA for preterm and term infants: review of clinical studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005; 45: 205–229.
- Frazier DM, Allgeier C, Homer C, Marriage BJ, Ogata B, Rohr F, Splett PL, Stembridge A, Singh RH. Nutrition management guideline for maple syrup urine disease: An evidence- and consensus-based approach. *Mol Genetics Metabol*. 2014; 112: 210–217.
- Ghoulah IA, Khoo NKH, Knaus, UG, Griendling KK, Touyz RM, Thannickal VJ. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling. *Free Radic Biol Med*. 2011 October 1; 51(7): 1271–1288.
- Gibson GE, Blass JP. Inhibition of acetylcholine synthesis and carbohydrate utilization by maple-syrup-urine disease metabolites. *J Neurochem*. 1976; 26(6):1073-8.
- Gladine C, Zmojdzian M, Joumard-Cubizolles L, Verny A, Comte B, Mazur A. The omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid favorably modulates the inflammatory pathways and macrophage polarization within aorta of LDLR^{-/-} mice. *Genes Nutr*, 2014. 9:424.
- Goda Y, Davis GW. Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron* 2003; 40: 243- 264.
- Greenberg JA, Bell SJ, Van Ausdal W. Omega-3 fatty acid supplementation during pregnancy. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*, 2008; 1(4).
- Gross WL, Bak MI, Ingwall JS, Arstall MA, Smith TW, Balligand JL, Kelly RA. Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 1996; 93: 5604-5609.
- Green P, Yavin E. Mechanisms of docosahexaenoic acid accretion in the fetal brain. *J. Neurosci. Res*. 1998; 52: 129-136.

- Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Saturated long chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *Neurochem*. 2012; 120(6): 1060–1071.
- Güttler N, Zheleva K, Parahuleva M, Chasan R, Bilgin M, Neuhof C, Burgazli M, Niemann B, Erdogan A, Böning A. Omega-3 fatty acids and vitamin D in cardiology. *Cardiol Res Pract*. 2012; 2012: 729670.
- Hadders-Algra M. Effect of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Neurodevelopmental Outcome in Full-Term Infants. *Nutrients* 2010, 2, 790-804.
- Hadders-Algra M. Prenatal and early postnatal supplementation with long-chain polyunsaturated fatty acids: neurodevelopmental considerations. *Am J Clin Nutr*, 2011: 94(suppl): 1874S–9S.
- Haggarty P. Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy. *European Journal of Clinical Nutrition* .2004; 58: 1559–1570.
- Haggarty P. Fatty acid supply to the human fetus. *Annual Review of Nutrition*. 2010; 30: 237–255.
- Halliwell B, Gutteridge JC. Free radicals in biology and medicine. 3th ed. New York: Oxford; 2001.
- Harper AE, Miller RH, Block KP. Branched chain amino acid metabolism. *Annu. Rev. Nutr*.1984; 4: 409-454.
- Harris RA, Joshi M, Jeoung NH, Obayashi M. Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. 4th Amino Acid Assessment Workshop. *J Nutr*, 2005: 1527-1530.
- Harris WS, Connor WE, Inkeles SB, Illingworth DR: Dietary omega-3 fatty acids prevent carbohydrate-induced hypertriglyceridemia. *Metabolism*, 1984; 33:1016-1019.
- Haymond MW, Bem-Galim E, Strobel KE. Glucose and Alanine Metabolism in Children with Maple Syrup Urine Disease. *J. Clin. Invest*. 1978.62(2):398-405.
- Hemmer W, Hallimann T. Functional aspects of creatine kinase in brain. *Develop Neurosc*. 1993; 15: 249-260.
- Herber S, Schwartz, IVD, Nalin T, Netto CBO, Camelo Junior JS, Santos ML, Ribeiro EM, Schüler-Faccini L, Souza CFM. Maple syrup urine disease in brazil: a panorama of the last two decades. *J. Pediatr (Rio J)*. 2014; 234.
- Hou JW. Maple syrup urine disease complicated with kyphoscoliosis and myelopathy. *Pediatrics and Neonatology*, 2014; xx, 1-5.
- Huffman SL, Harika RK, Eilander A, Osendarp SJM. Essential fats: how do they affect growth and development of infants and young

- children in developing countries? A literature review. *Maternal and Child Nutrition*. 2011; 7 (Suppl. 3): 44–65.
- Hughes BP. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. *Clin Chem Acta*. 1962; 7:597-604.
- Hutson SM, Berkich D, Drown P, Xu B, Aschner M, LaNoue KF. Role of branched-chain aminotransferase isoenzymes and gabapentin in neurotransmitter metabolism. *J Neurochem*. 1998; 71(2):863–874.
- Hutson SM, Lieth E, Lanoue KF. Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system. *J Nutr*. 2001; 131(3):846S–850S.
- Hutson SM, Sweatt AJ, Lanoue KF. Branched-chain amino acid metabolism: Implications for establishing safe intakes. 4th Amino Acid Assessment Workshop. *J Nutr*. 2005 Jun; 135 (6 Suppl):1557S-64S
- Jackson RH, Singer TP. Inactivation of the 2-ketoglutarate and pyruvate dehydrogenase complexes of beef heart by branched chain keto acids. *J Biol Chem*. 1983; 258(3):1857–1865.
- Jardim LB, Ashton-Prolla P. Inborn errors of metabolism: practical guidelines for clinical diagnosis in acutely ill children and infants. *J Pediatr* 1996; 72(2):63-70.
- Jensen CL. Effects of n₃ fatty acids during pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr*, 2006; 83(suppl):1452S–7S
- Jones ML, Mark PJ, Mori TA, Keelan JA & Waddell BJ. Maternal dietary omega-3 fatty acid supplementation reduces placental oxidative stress and increases fetal and placental growth in the rat. *Biology of Reproduction*, 2013a; 88:37.
- Jones ML, Mark PJ, Keelan JA, Barden A, Mas E, Mori TA & Waddell BJ. Maternal dietary omega-3 fatty acid intake increases resolving and protectin levels in the rat placenta. *Journal of Lipid Research*. 2013b; 54: 2247–2254.
- Jones ML, Mark PJ, Waddell BJ. Maternal dietary omega-3 fatty acids and placental function. *Reproduction*. 2014; 147:143–152
- Kamei A, Takashima S, Fanny C, Becker L. Abnormal dendritic development in maple syrup urine disease. *Pediatr Neurol*. 1992 Mar-Apr;8(2):145-7.
- Kaneko M, Masuda H, Suzuki H, Matsumoto Y, Kobayashi A, Yamazaki N. Modification of contractile proteins by oxygen free radicals in rat heart. *Mol Cell Biochem*. 1993; 125: 163-169.
- Kantha SS. **Dietary effects of fish oils on human health: a review of recent studies**. *Yale J Biol Med*. 1987; 60: 37-44.

- Koletzko B. Fatty acids and early human growth. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:671–2.
- Koletzko B, Rodriguez-Palmero M. Polyunsaturated fatty acids in human milk and their role in early infant development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1999; 4: 269–284.
- Kitto GB. Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenase from chicken and tuna heart. *Meth Enzymol*. 1969; 13:106–116.
- Lands WEM. Biochemistry and physiology of n-3 fatty acids. *The FASEB Journal*. 1992; 6: 2530–2536.
- Lands WEM. Consequences of Essential Fatty Acids. *Nutrients* 2012; 4: 1338–1357.
- Lands WEM. Historical perspectives on the impact of n-3 and n-6 nutrients on health. *Progress in Lipid Research*. 2014;55: 17–29.
- Larque E, Demmelmair H, Koletzko B. Perinatal supply and metabolism of long-chain polyunsaturated fatty acids: importance for the early development of the nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002; 967: 299–310.
- Lauritzen L, Hansen HS, Jørgensen MH, Michaelsen KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progr. Lipid Res.* 2001; 40: 1–94.
- Leckie RL, Manuck SB, Bhattacharee N, Muldoon MF, Flory JM, Erickson KI. Omega-3 fatty acids moderate effects of physical activity on cognitive function. *Neuropsychologia*. 2014; 59: 103–111.
- Lee JH. Polyunsaturated fatty acids in children. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition* 2013.16(3):153–161.
- Li P, Kim SW, Li X, Datta S, Pond WG, Wu G. Dietary supplementation with cholesterol and docosahexaenoic acid affects concentrations of amino acids in tissues of young pigs. *Amino Acids*. 2009; 37(4): 709–716.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275, 1951.
- Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, Serhan CN, Bazan NG. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2005; 115:2774–2783.
- Mackenzie DY, Woolf LI. Maple syrup urine disease: an inborn error of the metabolism of valine, leucine, and isoleucine associated with gross mental deficiency. *British Medical Journal*, 1959. 90–91.
- Martinez M, Mougan I. Fatty acid composition of human brain phospholipids during normal development. *J. Neurochem.* 1998; 71: 2528–2533.

- Martins AM. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. *São Paulo Med J/Rev Paul Med* 1999; 117(6):251-65.
- Mattson MP. Calcium as sculptor and destroyer of neural circuit. *Experiment Gerontol.* 1992; 27: 29-49.
- Mayurasakorn K, Williams JJ, Tem VS, Deckelbaum RJ. Docosahexaenoic acid: brain accretion and roles in neuroprotection after brain hypoxia and ischemia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011; 14(2): 158–167.
- Mazer LM, Yi SHL, Singh RH. Docosahexaenoic acid status in females of reproductive age with maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33:121–127
- McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Johnsen SF, Sande LM, Zielke HR. Alpha-ketoisocaproate alters the production of both lactate and aspartate from [U-13C]glutamate in astrocytes: a 13C NMR study. *J Neurochem.* 1998; 70(3):1001-8.
- Meldrum S, Dunstan JA, Foster JK, Simmer K, Prescott SL. Maternal Fish Oil Supplementation in Pregnancy: A 12 Year Follow-Up of a Randomised Controlled Trial. *Nutrients*, 2015; 7:2061-2067
- Menkes JH, Hurst PL, Craig JM. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics*, 1954; 14:462-467.
- Mescka CP, Wayhs CAY, 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. Devl Neuroscience.* 2013; 31:21–24.
- Mescka CP, Guerreiro G, Hammerschmidt T, Faverzani J, Coelho DM, Mandredini V, Wayhs CAY, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas CR. l-Carnitine supplementation decreases DNA damage in treated MSUD patients. *Mutation Research.* 2015; 775:43–47.
- Mir, L. *Genômica*. São Paulo: Atheneu, 2004.
- Mitsubuchi H, Owada M, Endo F. Markers associated with inborn errors of metabolism of branched-chain amino acids and their relevance to upper levels of intake in healthy people: an implication from clinical and molecular investigations on maple syrup urine disease. 4th Amino Acid Assessment Workshop. *J Nutr.* 2005 Jun; 135 (6 Suppl):1565S-70S.
- Molfino A, Gioia G, Fanelli FR, Muscaritoli M. The role for dietary omega-3 fatty acids supplementation in older adults. *Nutrients* 2014; 6:4058-4072.
- Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, Puffenberger EG, Kelley RI. Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics.* 2002; 109(6).

Mozzafarian D, Wu JHY. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 58(20): 2047-2067.

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): 1809-1820.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper: bioquímica. 27ª ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 692 p.

Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kenelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Bioquímica ilustrada de Harper. 29ª ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. 818 p.

Naylor EW, Guthrie R: Newborn screening for maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). *Pediatr* 1978, 61:262–266

Nellis MM, Kasinski A, Carlson M, Allen R, Schaefer AM, Schwartz EM, Danner DJ. Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2003; 80:189–195

Nellis MM, Danner DJ. Gene preference in maple syrup urine disease. *Am. J. Hum. Genet*. 2001; 68:232–237.

Nelson DL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. 6th ed. New York, USA: MacMillan; 2013.

Nemeth M, Millesi E, Wagner KH, Wallner B. Effects of Diets High in Unsaturated Fatty Acids on Socially Induced Stress Responses in Guinea Pigs. *PLoS ONE*. 2014; 9(12): e116292.

doi:10.1371/journal.pone.0116292

Neuringer M, Connor WE, Lin DS, Barstad L, Luck S. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal v3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83: 4021–5.

Newsholme EA, Beis I, Leech AR, Zammit VA. The role of creatine kinase and arginine kinase in muscle. *Biochem J*. 1978; 15; 172(3): 533–537.

Oliveira AC, Santos AMN, Martins AM, D'almeida V. Screening for inborn errors of metabolism among newborns with metabolic disturbance and/or neurological manifestations without determined cause. *Sao Paulo Med J/Rev Paul Med*. 2001; 119(5):160-4.

OMIM — Online Mendelian Inheritance in Man, Maple Syrup Urine Disease: MSUD, <http://omim.org/entry248600>. Acesso: junho, 2015.

O'neill S, Brault J, Stasia MJ, Knaus UG. Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *Redox Biol*. 2015; 6: 135–156.

- Ozyurt B, Sarsilmaz M, Akpolat N, Ozyurt H, Akyol O, Herken H, Kus I. The protective effects of omega-3 fatty acids against MK-801-induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rat. *Neurochem Int.* 2007; 50:196-202.
- Paterniti I, Impellizzeri D, Di Paola R, Esposito E, Gladman S, Yip P, Priestley JV, Michael-Titus AT, Cuzzocrea S. Docosahexaenoic acid attenuates the early inflammatory response following spinal cord injury in mice: in-vivo and in-vitro studies. *Journal of Neuroinflammation* 2014; 11:6
- Peet M. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci.* 2008; 45(1):19–25.
- Pereira MB, Conceição GD, Coelho JC, Wajner M, Giugliani R. Detections of metabolic disorders in high-risk patients. A pilot study in Salvador, Bahia. *Arq. Neuropsiquiatr.* 1997; 55(2):209-212.
- Pilla C, Cardozo RFO, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CMD. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem Research.* 2003a; 28(5): 675-679.
- Pilla C, Cardozo RFO, Dornelles PKB, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CMD. Kinetic studies on the inhibition of creatine kinase activity by branched-chain α -amino acids in the brain cortex of rats. *Int. J. Devl Neuroscience.* 2003b; 21:145–151.
- Prostek A, Gajewska M, Kamola D, Bałasińska B. The influence of EPA and DHA on markers of inflammation in 3T3-L1 cells at different stages of cellular maturation. *Lipids in Health and Disease*, 2014; 13:3.
- Renwick AG, Walker R. The fourth workshop on the assessment of adequate intake of dietary amino acids: general discussion of session 3 and overall workshop discussion. *J Nutr.*, 2005; 135(6 Suppl):1602S-6S.
- Ribeiro CA, Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Grando V, Schmidt AL, Ferreira GC, Perry MLS, Dutra-Filho CS, Wajner M. Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res.* 2008; 33:114–124
- Riegel, RE. *Bioquímica*. 5 ed. São Leopoldo, RS: ed. UNISINOS; 2001.
- Rogero MM, Tirapegui J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Braz J Pharmaceutical Sciences.* 2008; 44(4): 563-575.
- Rogers LK, Christina J, Valentine CJ, Keim SA. DHA Supplementation: Current Implications in Pregnancy and Childhood. *Pharmacol Res.* 2013; 70(1): 13–19.

- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1994; 228:35–51.
- Scaglia F, Carter S, O'Brien WE, Lee B. Effect of alternative pathway therapy on branched chain amino acid metabolism in urea cycle disorder patients. *Molecular Genetics and Metabolism* 2004; 81:S79–S85.
- Scaini G, Jeremias IC, Morais MOS, 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. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2002; 106:169–174.
- 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* 2013; 48:581-9.
- Scalco FB, Oliveira MLC, Simoni RE, Aquino Neto FR. inborn errors of metabolism, an important group of orphan neglected diseases: Investigation of 8,000 Patients in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 2014; 25(10): 1914-1917.
- Schacky C, Weber PC. Metabolism and effects on platelet function of the purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in humans. *J Clin Invest*. 1985; 76(6): 2446–2450.
- Schmidt S, Willers J, Riecker S, Möller K, Schuchardt JP, Hanh A. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the cytoskeleton: an open-label intervention study. *Lipids in Health and Disease* 2015, 14:4
- 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 Genetics Metabol*. 2004; 82: 69–75.
- Schwartz IV, Souza CFM, Giugliani R. Treatment of inborn errors of metabolism. *Jornal de Pediatria*. 2008; 84 (4)(Supl): 8-19.
- Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Ch 87. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Ribeiro CAJ, Wannmacher CMD, Wyse ATS, Dutra-Filho CS, Wajner M. Inhibition of brain energy metabolism by the α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochem et Biophys Acta*. 2003; 1639: 232– 238.
- Shepherd D, Garland PB. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J*. 1969;114(3):597-610.

Sheppard KW, Cheatham CL. Omega-6 to omega-3 fatty acid ratio and higher-order cognitive functions in 7- to 9-y-olds: a cross-sectional study. *Am J Clin Nutr* 2013; 98:659–67.

Shimazawa M, Nakajima Y, Mashima Y, Hara H. Docosahexaenoic acid (DHA) has neuroprotective effects against oxidative stress in retinal ganglion cells. *Brain Res.* 2009;1251: 269–275.

Shimmura, Y., Obayashi, M., Murakami, T. & Harris, R. A. Regulation of branched-chain amino acid catabolism: nutritional and hormonal regulation of activity and expression of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2001; 4: 419–423.

Simer K, Schulzke SM, Patole S. Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; 23: (1).

Sion E, Fingerhut R, Baumkotter J, Konstantopoulou V, Ratschmann R, Wendel U. Maple syrup urine disease: favourable effect of early diagnosis by newborn screening on the neonatal course of the disease. *J Inherit Metab Dis.* 2006; 29: 532–537.

Simn E, Schwarz M, Wendel U. Social outcome in adults with maple syrup urine disease (MSUD). *J Inherit Metab Dis,* 2007; 30:264.

Siopoulos AP. Importance of the omega-6/omega-3 balance in health and disease: evolutionary aspects of diet. *World Review of Nutrition and Dietetics,* 2011; 102: 10–21.

Smith CM, Marks AD.; Lieberman, M. *Bioquímica médica básica de marks: uma abordagem clínica.* 2. Ed. Porto Alegre: Artmed; 2007. 980 p.

Smith HJ, Greenberg NA, Tisdale MJ. Effect of eicosapentaenoic acid, protein and amino acids synthesis and degradation in skeletal muscle of cachectic mice. *British Journal of Cancer,* 2004; 91: 408 – 412.

Souza CFM, Schwartz IV, Giugliani R. Neonatal screening of metabolic disorders. *Ciência e Saúde Coletiva.* 2002; 7(1):129-137.

Strauss KA, Puffenberger EG, Morton DH. Maple Syrup Urine Disease, in: R.A. Pagon, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP (Eds.). *GeneReviews.* Seattle (WA); 1993.

- Strauss KA, Morton DH. Branched-chain ketoacyl dehydrogenase deficiency: maple syrup disease. *Current Treat Options Neurol.* 2003; 5:329–341
- Strauss KA, Wardeley B, Robinson D, Hendrickson C, Rider NL, Puffenberger EG, Shelmer 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): 333–345.
- Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and câncer. *Cancer & Metabolism.* 2014; 2:17
- Tchan M, Westbrook M, Wilcox G, Cutler R. The Management of Pregnancy in Maple Syrup Urine Disease: Experience with Two Patients. *JIMD Rep.* 2013; 10:113-7.
- Thompson RJ, Kynoch PA, Sarjant j. Immunohistochemical localization of creatine kinase-BB isoenzyme to astrocytes in human brain. *Brain Research.* 1980; 201: 423-426.
- Treacy E, Clow CL, Reade TR, Chitayat D, Mamer A, Scriver CR. Maple syrup urine disease: interrelations between branched-chain amino, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *J. Inher. Metab. Dis.* 1992; 15: 121-135.
- Trintinalia MM, Alves ANL, Fernandes L, Bechara EJH, Assunção NA. Potential diagnostic of branched-chain ketoaciduria by HPLC-DAD. *J. Braz. Chem. Soc.* 2014; 25(10): 1857-1863.
- Valentine CJ. Maternal dietary DHA supplementation to improve inflammatory outcomes in the preterm infant. *Adv. Nutr.,* 2012;3: 370–376.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentos de Bioquímica – A Vida em Nível Molecular*, 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- Wajner M, Coelho DM, Barschak AG, Araujo PR, Pires RF, Lulhier FJG, Vargas CR. Reduction of large neutral amino acid concentrations in plasma and CSF of patients with maple syrup urine disease during crises. *J. Inher. Metab. Dis.* 2000; 23:505-512.
- Wajner A, Bürger C, Dutra-Filho CS, Wajner M, de Souza Wyse AT, Wannmacher CM. Synaptic plasma membrane Na(+), K(+)-ATPase activity is significantly reduced by the alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis.* 2007; 22(1):77–88.
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.,* 1992; 281, 21-40.

- Wallimann T. Dissecting the role of creatine kinase. *Current Biology*. 1994; 1: 42-46.
- Walker CG, West AL, Browning LM, Madden J, Gambell JM, Jebb SA, Calder PC. The pattern of fatty acids displaced by EPA and DHA following 12 months supplementation varies between blood cell and plasma fractions. *Nutrients*, 2015; 7: 6281-6293.
- Wang XL, Li CJ, Xing Y, Yang YH, Jia JP. Hypervalinemia and hyperleucine-isoleucinemia caused by mutations in the branched-chain-amino-acid aminotransferase gene. *J Inherit Metab Dis*, 2015; 38:855–861.
- Weber PC, Fischer S, von Schacky C, Lorenz R, Strasser T. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in man. In: Simopoulos AP, Kifer RR, Martin RE, eds. *Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods*. Orlando, FL: Academic Press, 1986:49–60.
- Westall RG. The amino acids and other ampholytes of urine. 2. The isolation of a new sulphur-containing amino acid from cat urine. **Biochem J**. 1953; 55(2):244-8.
- Westall RG. The amino acids and other ampholytes of urine. 3. Unidentified substances excreted in normal human urine. *Biochem J*. 1955; 60(2):247-55.
- Whelan J. Dietary stearidonic acid is a long chain (n-3) polyunsaturated fatty acid with potential health benefits. *J Nutr*. 2009;139(1):5-10.
- Willatts P, Forsyth S, Agostoni C, Casaer P, Riva E, Boehm G. Effects of long-chain PUFA supplementation in infant formula on cognitive function in later childhood. *Am J Clin Nutr* 2013; 98 (suppl):536S–42S.
- Wu JE, Kao HJ, Li SC, Stevens R, Hillman S, Millington D, Chen YT. Mutagenesis identifies mice with mitochondrial branched-chain aminotransferase deficiency resembling human maple syrup urine disease. *J. Clin. Invest.* 2004; 113:434–440.
- Wynn RM, Kato M, Machius M, Chuang JL, LI J, Tomchick DR, Chuang DT. Molecular mechanism for regulation of the human mitochondrial branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex by phosphorylation. *Structure*. 2004; 12: 2185–2196.
- Wyss, M, Kaddurah, D. Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Reviews*. 2000; 80(3): 1107-1212.
- Yanagita T, Nagao K. Functional lipids and the prevention of the metabolic syndrome. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2008; 17(S1):189-191
- Yeaman SJ. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem. J*. 1989; 257, 625-632.

Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Horyn O, Luhovyy B, Lazarow A, Nissim I. Brain amino acid requirements and toxicity: the example of leucine. 4th Amino Acid Assessment Workshop. *J Nutr.* 2005; 135:1531-1538.

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(4):903–918.

ANEXO

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



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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da suplementação materna com ácidos graxos ômega-3 sobre parâmetros de metabolismo energético na prole submetida a um modelo animal de doença da urina do xarope do bordo" Protocolo nº 057/2015-1 sob a responsabilidade de **Emílio Lutz Streck** e equipe: **Meline Oliveira dos Santos Moraes, Milena Carvalho Silva, Lara Mezarri Gomes, Alessandra Rosa Biauth**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense, em reunião de: 19/05/2015.

Vigência do Projeto	01/06/2015 à 31/05/2016
Espécie/inhagem	Rattus norvegicus (Wistar)
Nº. De animais	88
Peso/idade	15 e 300g / 7 e 60 dias
Sexo	F e M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number : 057/2015-1

Principal Investigator: Emílio Lutz Streck

Researchers: Meline Oliveira dos Santos Moraes, Milena Carvalho Silva, Lara Mezarri Gomes, Alessandra Rosa Biauth

Project #fe: Evaluation of maternal supplementation with omega-3 fatty acids on energy metabolism parameters in offspring subjected to an animal model of maple syrup urine disease

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

Criciúma, 19 de maio de 2015.


JAIRO JOSÉ ZOCHE
Coordenador da CEUA