

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

KELY ISÉ

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES DA MELATONINA EM RATOS
WISTAR JOVENS SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE UM POOL
DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA**

**CRICIÚMA
2018**

KELY ISÉ

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES DA MELATONINA EM RATOS
WISTAR JOVENS SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE UM POOL
DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA**

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

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

CRICIÚMA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

I78a Isé, Kely.

Avaliação dos efeitos antioxidantes da melatonina em ratos wistar jovens submetidos à administração crônica de um pool de aminoácidos de cadeia ramificada / Kely Isé. - 2018.

63 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2018.

Orientação: Emílio Luiz Streck.

1. Doença da urina do xarope do bordo. 2. Estresse oxidativo. 3. Aminoácidos de cadeia ramificada. 4. Dano ao DNA. 5. Melatonina. I. Título.

CDD 23. ed. 616.042

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Bioenergética, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos, que tanto me apoiaram e incentivaram nessa conquista.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pelo dom da vida, por ter me dado saúde, força para superar as dificuldades, por minha família e amigos. Ao meu anjo de guarda, que me acompanha, por me haver até agora iluminado e protegido.

Aos meus pais amados, que se dedicaram à minha vida e educação como ser humano, me deram muito amor e carinho, fizeram de mim a pessoa que hoje sou, e eu só tenho motivos para agradecer, muito orgulho e admiração por vocês.

Aos meus irmãos, Cleite e Alexandro, por todo apoio, amor, carinho, incentivo e confiança. Obrigada por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim.

Aos meus amigos, especialmente, Marieli, Nathalia, Cristiane e Alini, que acompanharam em mais essa conquista. Gratidão por todo apoio, incentivo, paciência, e as palavras amigas dos momentos difíceis que me fortaleceu no seguir a diante.

Ao meu orientador Dr. Emilio Luiz Streck, obrigada pelos ensinamentos e paciência.

À Leticia, que auxiliou na realização desse projeto, sempre me tranquilizou e incentivou. Obrigada pela amizade, aprendizado, carinho, dedicação e paciência para comigo.

Aos alunos de iniciação científica, especialmente, Paulo, Julia e Gabriela, que auxiliaram por em prática o projeto. Obrigada por todo auxílio e os cuidados necessários para a conclusão desse projeto.

A Casa de repouso Santo Expedito, que me permitiu flexibilidade no horário de trabalho, e proporcionou a oportunidade de estudo. Obrigada ao apoio e incentivo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, por todo conhecimento transmitido nesse período.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense, pela formação e possibilidade de realização desse estudo.

Obrigada a todos que, mesmo não estando aqui citados, que tanto contribuíram para a conclusão desta etapa e para a Kely que hoje sou.

“Você pode sonhar, criar, desenhar, e construir o lugar mais maravilhoso do mundo. Mas é necessário ter pessoas para transformar seu sonho em realidade”.

Walt Disney

RESUMO

A Doença da Urina do Xarope de Bordo (DXB), também conhecida como Leucinose e cetoacidúria de cadeia ramificada, compreende um erro inato do metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), acarretando no acúmulo de leucina, isoleucina e valina, bem como seus α -cetoácidos e hidroxíácidos correspondentes. No entanto, estudos vêm demonstrando o envolvimento de estresse oxidativo na fisiopatologia da DXB, pressupõe-se que a ocorrência do estresse oxidativo seja decorrente dos metabolitos acumulados que induzem a produção de espécies reativas e ou a diminuição da capacidade antioxidante, levando a danos nas biomoléculas de lipídeos, proteínas e DNA. Observa-se alterações nos parâmetros de malondialdeído (MDA), tanto em em plasma de pacientes com DXB, como em modelos de animais. Além disso, mudanças nos níveis de DCF, CAT, SOD, GPx e GSH, e teor carbonila. Nesse sentido, sabe-se que a Melatonina estimula enzimas antioxidantes, podendo ainda, cruzar membranas biológicas, alcançando os compartimentos sub-celulares, protegendo-os dos radicais livres, sem apresentar toxicidade. Além de que, apresenta efeito neuroprotor, capacidade de inibir reações de estresse oxidativo, reações inflamatórias agudas e apoptose celular. Para avaliar os possíveis efeitos antioxidantes da melatonina, foram utilizados 128 ratos machos Wistar, com sete dias de idade, deixados com suas mães, e sendo desmamados aos 21 dias de vida. O experimento foi dividido em quatro (4) grupos amostrais: (controle, melatonina, DXB, DXB + melatonina). Os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina sem anestesia, sendo dissecadas as estruturas cerebrais: córtex cerebral, hipocampo e estriado. Avaliaram-se os parâmetros de estresse oxidativo: dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); determinação do dano oxidativo a proteínas; atividades da Superóxido Dismutase e catalase; dosagem do conteúdo de sulfidrilas; medida da oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH). E dano ao DNA: através do ensaio cometa. Os resultados demonstraram que a exposição de AACR, induziu um aumento significativo de equivalentes de MDA nos grupos DXB quando comparados ao controle nas estruturas analisadas, além disso, os animais tratados com melatonina, apresentam reversão dos danos ocasionados pela liporeoxidação. Quanto aos conteúdos sulfidrilas, verificou-se uma melhora dos conteúdos no grupo DXB tratado com melatonina comparado ao DXB. A enzima SOD teve sua atividade aumentada no córtex cerebral e estriado, enquanto que a atividade da CAT foi reduzida no córtex cerebral e hipocampo nos grupos DXB. Por fim, observou-se um aumento da frequência e índice de danos ao DNA, sendo que o tratamento com melatonina foi capaz de reverter tais danos.

Palavras-chaves: Doença da urina do xarope do bordo; Estresse oxidativo; dano ao DNA; Aminoácidos de cadeia ramificada; Leucinose.

ABSTRACT

The Syrup Urine Disease (DXB), also known as leucinosis and branched chain ketoaciduria, comprises an innate error in the branched-chain amino acid metabolism (AACR), leading to accumulation of leucine, isoleucine and valine, as well as α -keto acids and corresponding hydroxy acids. However, studies have demonstrated the involvement of oxidative stress in the pathophysiology of DXB, it is assumed that the occurrence of oxidative stress is due to the accumulated metabolites that induce the production of reactive species and / or the reduction of antioxidant capacity, leading to damage in biomolecules of lipids, proteins and DNA. Changes in the parameters of malondialdehyde (MDA) are observed in both plasma in DXB patients and in animal models. In addition, changes in the levels of DCF, CAT, SOD, GPx and GSH, and carbonyl content. In this sense, it is known that Melatonin stimulates antioxidant enzymes, and can also cross biological membranes, reaching sub-cellular compartments, protecting them from free radicals, without presenting toxicity. Besides that, it has neuroprotective effect, ability to inhibit reactions of oxidative stress, acute inflammatory reactions and cellular apoptosis. To evaluate the possible antioxidant effects of melatonin, 128 male Wistar rats, seven days old, left with their mothers, and weaned at 21 days of age were used. The experiment was divided into four (4) sample groups: (control, melatonin, DXB, DXB + melatonin). The animals were euthanized by decapitation with guillotine without anesthesia, and the cerebral structures were dissected: cerebral cortex, hippocampus and striatum. The parameters of oxidative stress were evaluated: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); determination of oxidative damage to proteins; activities of Superoxide Dismutase and catalase; dosage of sulfhydryl content; oxidation measure of 2', 7'-dichlorofluorescein (DCFH). And DNA damage: through the comet assay. The results showed that the AACR exposure induced a significant increase of MDA equivalents in the DXB groups when compared to the control in the analyzed structures; in addition, the animals treated with melatonin showed a reversal of the damages caused by the liporexidation. As regards the sulfhydryl contents, there was an improvement of the contents in the DXB group treated with melatonin compared to DXB. The SOD enzyme had its activity increased in the cerebral cortex and striatum, whereas CAT activity was reduced in the cerebral cortex and hippocampus in the DXB groups. Finally, an increase in the frequency and index of DNA damage was observed, with melatonin treatment capable of reversing such damage.

Keywords: Maple syrup urine disease; Oxidative stress; DNA damage; Branched Chain Amino Acids; Leucinosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Rota catabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR).	16
Figura 2 - Desenho esquemático representativo do protocolo experimental.....	27
Figura 3 - Efeito da administração do pool de AACR.	33
Figura 4 - Efeito da administração do pool de AACR.	35
Figura 5 - Efeito da administração do pool de AACR.	37
Figura 6 - Efeito da administração do pool de AACR.	39
Figura 7 - Efeito da administração do pool de AACR	41
Figura 8 - Efeito da administração do pool de AACR.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos fenótipos da Doença da Urina do Xarope do Bordo19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AACR – Aminoácidos de Cadeia Ramificada
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CAT –Catalase
- CEUA – Comitê de Uso de Animais
- DCF - 2',7'diclorofluoresceína fluorescente (do inglês, *fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein*)
- DCFH - 2',7'-diclorofluoresceína (do inglês, *2'7'- dichlorofluorescein*)
- DCFH- DA - diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (do inglês, *dichlorofluorescein diacetate*)
- DNA-Ácido Desoxirribonucleico
- DNPH - 2,4-dinitrofenilidrazina
- DTNB - Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico)
- DXB – Doença da Urina do Xarope do Bordo
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ERN - Espécie reativa de nitrogênio
- ERO - Espécie reativa de oxigênio
- G6PD - Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (do inglês, *glucose-6-phosphate dehydrogenase*)
- GPx – Glutaciona Peroxidase
- GR – Glutaciona Redutase
- GSH - Glutaciona reduzida
- GSSG - Glutaciona oxidada
- KCl - Cloreto de potássio
- MEL – Melatonina
- MDA - Malondialdeído
- NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
- PBS - Tampão fosfato-salina (do inglês, *phosphate buffered saline*)
- PN – Pós-nascimento
- SOD – Superóxido Dismutase

SPSS - Pacote estatístico para análises estatísticas (do inglês, *software package used for statistical analysis*)

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

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

TCA - Ácido tricloroacético (do inglês *trichloroacetic acid*)

TNB²⁻ - Ânion 2-nitro-5-tiobenzoato (do inglês, 2-nitro-5-thiobenzoate anion)

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	14
1.2 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO	14
1.2.1 Histórico	15
1.2.2 Epidemiologia	15
1.3 METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA	16
1.4 COMPLEXO DOS A-CETOÁCIDOS DESIDROGENASE DE CADEIA RAMIFICADA	17
1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	17
1.6 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	19
1.7 ESTRESSE OXIDATIVO	20
1.8 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO ..	21
1.9 DANO AO DNA	22
1.10 PROPRIEDADES DA MELATONINA	22
1.11 JUSTIFICATIVA	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 METODOLOGIA	26
3.1 ANIMAIS	26
3.2 GRUPOS	26
3.3 MODELO DXB	26
3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	27
3.4.1 Preparo das amostras	27
3.4.2 Análise dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (tbars)	28
3.4.3 Dosagem do conteúdo de sulfidrilas	28
3.4.4 Medida da oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (dcfh)	29
3.4.5 Determinação de proteínas	29
3.4.6 Avaliação das atividades das enzimas antioxidantes	29
3.4.6.1 Atividade da superóxido dismutase (sod)	29
3.4.6.2 Atividade da catalase (cat)	30

3.4.7 Dano ao dna.....	30
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4 RESULTADOS.....	32
4.1 EFEITO CRÔNICO DAS EXPOSIÇÕES AOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS) EM TECIDO CEREBRAL DE RATOS WISTAR JOVENS TRATADOS COM MELATONINA.....	32
4.2 EFEITO CRÔNICO DAS EXPOSIÇÕES AOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE O CONTEÚDO DE SULFIDRILAS EM TECIDO CEREBRAL DE RATOS WISTAR JOVENS TRATADOS COM MELATONINA.....	34
4.3 EFEITO CRÔNICO DAS EXPOSIÇÕES AOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE A OXIDAÇÃO DE DCFH EM TECIDO CEREBRAL DE RATOS WISTAR JOVENS TRATADOS COM MELATONINA.....	36
4.4 EFEITO CRÔNICO DAS EXPOSIÇÕES AOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM TECIDO CEREBRAL DE RATOS WISTAR JOVENS TRATADOS COM MELATONINA.....	38
4.5 EFEITO CRÔNICO DAS EXPOSIÇÕES AOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (CAT) EM TECIDO CEREBRAL DE RATOS WISTAR JOVENS TRATADOS COM MELATONINA.....	40
4.6 EFEITO CRÔNICO DAS EXPOSIÇÕES AOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE O DANO AO DNA EM SANGUE TOTAL DE RATOS WISTAR JOVENS TRATADOS COM MELATONINA.....	42
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO.....	62
ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) compreendem um grupo de doenças raras, em grande parte de herança autossômica recessiva. O primeiro registro de EIM ocorreu em 1908, por Garrod, relatando o caso da alcaptonúria. Fundamentado nas leis de Mendel, sugeriu um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio, onde os pacientes apresentavam excesso de ácido homogentísico na urina, relacionando dessa forma a doença à um bloqueio na rota do catabolismo (Garrod, 1909; Scriver, 2008).

Sabe-se que os EIM compreendem um grupo de doenças genéticas, em torno de 500, caracterizada pela deficiência, ausência ou modificação estrutural de uma proteína, que em grande parte é uma enzima (Gimenez-Sanches et al., 2001). Embora raros, os EIM correspondem a cerca de 10% das doenças genéticas, atingindo dessa forma 1: 1.000 nascidos vivos quando analisados o seu conjunto (Scriver et al., 2001).

A classificação desse grupo de doença se dá conforme a repercussão celular e metabólica, apresentando quatro tipos de distúrbios: distúrbios de transporte, distúrbios de armazenamento, degradação e secreção, distúrbios de síntese e distúrbios do metabolismo intermediário (Karam et al., 2001). Dessa forma, os EIM possuem manifestações clínicas variadas e inespecíficas, originadas em grande parte, pelas diferenças na atividade enzimática, área do metabolismo e tecido afetado. Contudo, sintomas como alteração no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) são comuns entre os EIM (Cockoburn e Giltzman, 1982).

1.2 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO

A Doença da Urina do Xarope de Bordo (DXB), também conhecida como Leucinose e cetoacidúria de cadeia ramificada, compreende um EIM dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), acarretando no acúmulo de leucina, isoleucina e valina, bem como seus α -cetoácidos: ácido α -cetoisocapróico, α -ceto- β -metilvalérico e α -cetoisovalérico, e hidroxíácidos: ácido α -hidroxiisocapóico (HIC), ácido α -hidroxiisvalérico (HIV) e ácido 2-hidroxi 3-metilvalérico (HMV), onde o

excesso é desencadeado pela deficiência do complexo dos α -cetoácidos desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR) (Chuang e Shih, 2001).

Tal deficiência ocorre por meio de mutações nas proteínas da subunidade E1 α ou E1 β da enzima E1 ou da enzima E2 do CDCCR (Treacy et al., 1992).

1.2.1 Histórico

Os primeiros relatos da Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB), são de 1954, onde Menkes e colaboradores descreveram quatro casos de uma doença cerebral degenerativa, apresentando edema cerebral, convulsões, espasticidade e sofrimento respiratório, na primeira semana de vida e evoluindo ao óbito. Percebeu-se ainda, o forte odor de açúcar queimado na urina, semelhante ao do xarope do bordo, dando origem, dessa forma, ao nome Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB). Na mesma década, houve também outro relato dos mesmos sintomas, sendo observados concentrações elevadas dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR). (Menkes et al., 1954; Westall et al., 1957).

Já durante a década 60, constatou-se a deficiência do complexo enzimático, como causa bioquímica da doença, por meio de estudos enzimáticos em leucócitos e fibroblastos de pacientes afetados (Dancis et al., 1960). No mesmo período, foi sugerido o primeiro tratamento para a doença, baseado em uma dieta com restrição dos aminoácidos de cadeia ramificada (Snyderman et al., 1964).

1.2.2 Epidemiologia

Estima-se que a incidência da Doença da Urina do Xarope do Bordo, seja em cerca de 1:185.000 nascidos vivos. Entretanto, ao analisar regiões específicas, como o estado da Pensilvânia/Estados Unidos, onde há os Menonitas, há uma incidência alta, estimada em 1:176 nascidos vivos (Zhang et al., 1989; CHUANG e SHIH, 2001). Já no Brasil, sugere-se uma incidência de 1:100.000 nascidos vivos (Herber et al., 2015), podendo esse valor não ser fidedigno devido a doença não está inserida no programa de triagem neonatal.

1.3 METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA

O metabolismo dos aminoácidos de cadeias ramificadas (AACR) inicia-se com o transporte dos mesmos para o interior da célula, por meio de um sistema de transporte específico. Assim, há primeiramente a transaminação reversível nos tecidos extra-hepáticos, sendo o processo catalizado pelas isoenzimas de aminotransferase de cadeia ramificada, levando ao α -cetoisocapróico da leucina, α -ceto- β -metilvalérico da isoleucina e α -cetoisovalérico da valina. Com isso, ocorre a translocação dos α -cetoácidos para a mitocôndria por meio de um transportador específico, onde há então o processo de descarboxilação oxidativa, que é catalisado pelo complexo dos α -cetoácidos desidrogenase de cadeia ramificada. Posterior a esse processo, a sequência de reações dos respectivos acil-CoA de cadeia ramificada apresentam rotas distintas. Ressalta-se que ao final do processo a leucina produz acetoacetato e acetilCoA, valina é unicamente succinil CoA e isoleucina, tanto acetil CoA como succinil CoA (figura 1)(Chuang e Shih, 2001).

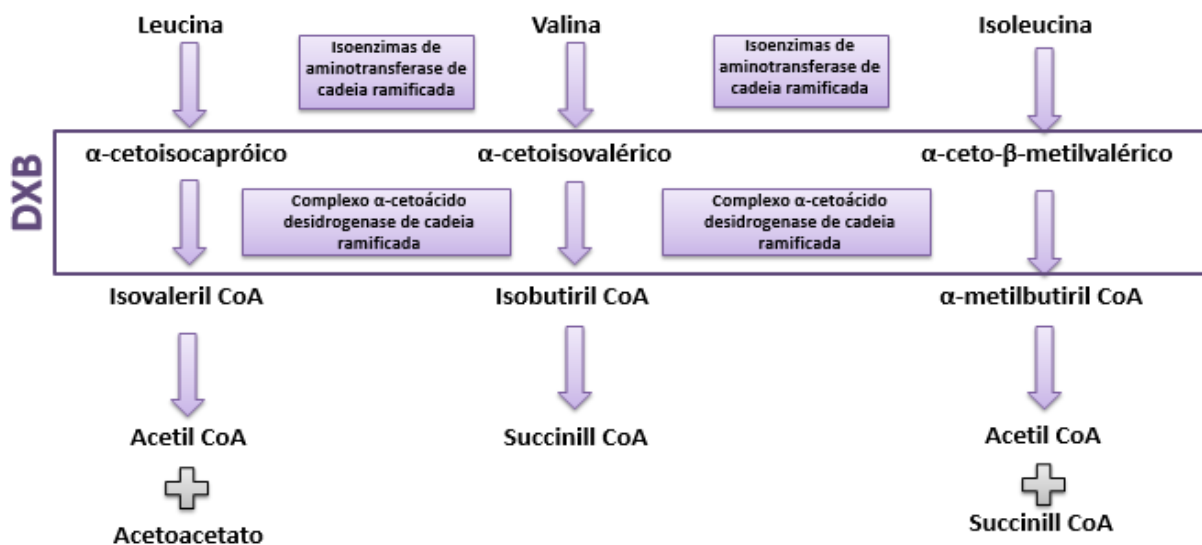


Figura 1 - Rota catabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina. Inicialmente ocorre a transaminação reversível pela aminotransferase dos AACR, seguida da descarboxilação oxidativa dos cetoácidos de cadeia ramificada e esterificação da coenzima A pelo complexo α -cetoácido desidrogenase. O destaque demonstra o bloqueio que ocorre na Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB), oriundo da deficiência do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada. Fonte: Adaptado de Chuang e Shih, 2001.

1.4 COMPLEXO DOS α -CETOÁCIDOS DESIDROGENASE DE CADEIA RAMIFICADA

O complexo dos α -cetoácidos desidrogenase de cadeia ramificada localiza-se na membrana mitocondrial interna das células, onde regula o fluxo dos aminoácidos de cadeia ramificada utilizados na obtenção de energia (Chuang e Shih, 2001). O complexo apresenta os componentes catalíticos: α -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada ($\alpha 2\beta 2$) ou E1, sendo esse composto ainda por duas subunidades: E1 α e E1 β , di-hidrolipoil transacilase ou E2 e di-hidrolipoamida desidrogenase homodimérica ou E3 (Yeaman, 1986; Reed e Hackert, 1990; Chuang et al., 2008). O funcionamento do complexo inicia-se com o componente E1 catalisando uma descarboxilação dos α -cetoácidos mediada pela tiamina pirofosfatase, o que leva à redução da molécula de lipoil que ligada a E2. Dessa forma, o lipoil reduzido e o seu domínio são utilizados para transferir o grupo acil do E1 para a CoA, acarretando no aumento da quantidade de acil-CoA. Por fim, o componente E3, que é ligado ao FAD, reoxida o resíduo de di-hidrolipoil do E2 tendo o NAD⁺ como último aceptor de elétrons, resultando na produção de acil CoA de cadeia ramificada, CO₂ e NADH (Danner et al., 1979; Reed e Hackert, 1990; Treacy et al., 1992; Peinemann e Danner, 1994; Chuang e Shih, 2001).

1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) apresenta fenótipos distintos, sendo eles: clássico, intermediário, intermitente, responsivo à tiamina e deficiente de E3 (Chuang e Shih, 2001). A forma clássica compreende a mais comum e grave. Os sintomas desse fenótipo iniciam, geralmente, na primeira semana de vida, e irá depender do grau de deficiência do complexo enzimático CAACR e da quantidade de proteínas ingerida. Manifestações como letargia, deficiência intelectual e retardo psicomotor, hipoglicemia, coma, convulsão, perda do apetite, perda de peso e alteração progressiva dos sinais neurológicos, cetoacidose e odor de açúcar queimado podem ser observados nos pacientes afetados (Chuang e Shih, 2001; Mortonet et al., 2002).

A forma intermediária, apresenta-se assintomática no período neonatal, mas podendo apresentar o odor de xarope do bordo na urina, sendo geralmente

diagnosticada entre os 5 meses a 7 anos de vida. As características sintomáticas desse fenótipo incluem atraso no desenvolvimento durante e quadro de retardo mental inespecífico e progressivo, descompensação metabólica. Nessa forma de manifestação da doença, há uma atividade enzimática residual entre 3 a 30% do normal (Rittinger et al., 1986; Chuang e SHIH, 2001; Strausset al., 2010).

O fenótipo intermitente da doença apresenta diagnóstico e sintomas tardios, uma vez que há aumento dos níveis de AACRs somente durante as crises agudas ou sobrecarga de proteínas na dieta, onde ainda, possuem 5 a 20% de atividade normal do CDCCR. Os sintomas iniciam, geralmente, entre o quinto mês e o segundo ano de vida, mas podendo ser mais tardio. Nos períodos de estresse fisiológico os pacientes podem apresentar características clínicas e bioquímicas da forma clássica (Chuang e Shih, 2001; Wendel e Baulny, 2006; Strausset al., 2010; de Baulny et al., 2012;).

Ao analisar a forma responsiva à tiamina, percebe-se que a mesma é similar à intermediária. Nesse tipo de manifestação clínica da doença, a atividade residual do CDCCR é de 2 a 40%. Ainda pode se observar, que os pacientes não apresentam sintomas neonatais, embora na vida adulta, apresentem um curso semelhante à forma intermediária. Entretanto, nesse fenótipo, os pacientes apresentam melhora do quadro clínico e dos exames laboratoriais quando submetidos ao teste terapêutico com tiamina (Chuang et al., 2004).

Por fim, no fenótipo classificado como deficiência da subunidade E3, a sintomatologia pode surgir no período neonatal ou tardio, sendo associada à acidose láctica, sendo a forma mais rara da doença. Isso ocorre pelo fato de que a subunidade E3 do complexo CDCCR também é componente dos complexos α -cetoglutarato desidrogenase e piruvato desidrogenase. Dessa forma, há elevações plasmáticas de lactato, piruvato e alanina, onde apresenta sintomas clínico e bioquímico distintos. Conforme a tabela 1 (Chuang e Shih, 2001; Strausset al., 2006).

Tabela 1 - Classificação dos fenótipos da Doença da Urina do Xarope do Bordo

Fenótipo	Características	Atividade Enzimática Residual
Clássico	Recusa alimentar, letargia, alterações neurológicas progressivas, hipoglicemia, coma, cetoacidose e convulsões	0 a 2%
Intermediário	Atraso no desenvolvimento, cetoacidose pouco frequente, convulsões	0 a 30%
Intermitente	Episódios de ataxia, cetoacidose precipitada por infecção ou estresse	5 a 20%
Responsiva à Tiamina	Semelhante à forma intermediária	2 a 40%
Deficiência de E3	Ausência de sintomas neonatais, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, hipotonia	0-25%

Fonte: Adaptado de Chuang e Shih (2001).

1.6 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico da DXB baseia-se na triagem neonatal, sendo o exame que contempla a Doença não é oferecida pelo Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil. O exame para rastreio da doença na triagem neonatal é encontrado somente em laboratórios privados (Souza et al., 2002).

A identificação das altas concentrações plasmáticas e urinárias dos AACR ocorre por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), autoanalisador de aminoácidos ou por espectrometria de massa em Tandem. Já os cetoácidos de cadeia ramificada podem ser detectados pela análise de ácidos orgânicos na urina através da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-MS) (Chuang e Shih, 2001; Chuang et al., 2006). Além disso, exames complementares podem ser realizados para o diagnóstico, como avaliação da atividade enzimática CDCCR em linfócitos, biópsia do fígado, fibroblastos da pele e exames de imagem (Strauss et al., 2006).

O tratamento da Doença da Urina do Xarope do Bordo tem como objetivo normalizar a homeostase do metabolismo intermediário, evitando dessa forma, descompensação metabólica. Para isso, na fase aguda da doença, que compreende

a descompensação metabólica, realiza-se uma rápida redução das concentrações dos níveis de AACR, suporte nutricional e indução do anabolismo por meio do aporte de proteínas hidrolisadas isentas de AACR. Podem ser realizados ainda, procedimentos como diálise, hemodiálise, hemofiltração (Strausset al., 2006; Cardoenaet al.,2016).

Na fase de manutenção, há uma dieta pobre em proteínas, apresentando baixo conteúdo de AACR e suplementada com uma fórmula semissintética, constituída de uma mistura de outros aminoácidos, carboidratos, vitaminas minerais e oligoelementos (Ramon e Jauregui, 2005; Strausset al., 2006). Assim, visa-se manter os níveis plasmáticos de leucina próximo dos valores de referência, que se encontram entre 77 e 153 $\mu\text{mol/L}$, entre 100 e 300 μmol que são limites aceitáveis no sentido de evitar danos (Lepage et al., 1997; Morton et al., 2002). Contudo, a restrição dietética desses pacientes pode ocasionar um atraso no crescimento e desenvolvimento, causando ainda imunodeficiência, desmielinização e lesões de pele (morton et al., 2002).

Dessa forma, recentemente está sendo proposto uma alternativa com o transplante hepático, visando a possibilidade de uma dieta livre, uma vez que levaria a um aumento de cerca de 10% do normal do CDCCR sobre o organismo. Entretanto, problemas cirúrgicos, bem como os riscos de imunossupressão limitam tal opção (Strauss et al., 2006; Serra et al., 2010; Mazariegos et al., 2012; Blackburn et al., 2017).

A terapia objetiva manter os níveis plasmáticos dos AACR mais próximos possíveis dos valores de referência, diminuindo os efeitos da doença para manter a qualidade de vida do paciente. Até o presente momento não existe tratamento efetivo pra DXB. Dessa forma, considerando as alterações de estresse oxidativo e de dano o DNA presentes na doença, pensou-se no tratamento com melatonina como uma potencial terapia adjuvante.

1.7 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo compreende o desequilíbrio entre agentes oxidantes e sistemas de defesa antioxidante, ocorrendo durante este processo a oxidação de biomoléculas, onde há perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio

homeostático (Halliwell e Gutteridge, 1999; Dalle-donne et al., 2003; Halliwell e Whiteman, 2004).

Neste processo, há o envolvimento de radicais livres, consistindo em estruturas químicas apresentando um elétron desemparelhado, que atuam em reações de óxido-redução (Schneider e oliveira, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2007). Assim, os principais oxidantes envolvem espécie reativa ao oxigênio (ERO) e espécie reativa ao nitrogênio (ERN). A fim de se evitar os danos causados pelas EROs e pelas ERNs, há o sistema de defesa por antioxidantes, que agem contra a toxicidade dessas espécies, mantendo a homeostase entre a produção e a eliminação de espécies reativas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Tal mecanismo é composto por sistemas enzimáticos e não enzimáticos. Dessa forma, antioxidantes enzimáticos agem na desintoxicação celular das espécies reativas, como por exemplo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Já compostos não enzimáticos, são sintetizados pelo organismo, apresentando poder antioxidantes, como por exemplo, bilirrubina, o ácido lipoico, melatonina, a coenzima Q, o ácido úrico e a GSH (Halliwell e Gutteridge, 2007).

1.8 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO

O estresse oxidativo tem sido proposto como uma importante característica de vários EIM, incluindo acidúrias orgânicas, fenilcetonúria, DXB, defeitos do ciclo da ureia e homocistinúria (Guire; Parikh; Diaz, 2009). Além do mais, estudos em animais demonstraram que os AACR (leucina, isoleucina e valina) e seus respectivos α -cetoácidos acumulados na DXB estimulam a lipoperoxidação em homogeneizado de cérebro de ratos. (Fontella et al., 2002). Recentemente, estudos relataram que tanto os AACR como a administração de CIC, foram capazes de ocasionar mudanças nos níveis MDA, teor de carbonila, níveis de DCF, CAT, SOD, GPx, G6PD e GSH (Mescka et al., 2016; Taschetto et al., 2017).

Estudos vêm demonstrando o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da DXB, alterações de parâmetros de malondialdeído (MDA), tanto em plasma de pacientes com DXB, como em animais (Barschak et al., 2006; Barschak et al., 2008a; Barschak et al., 2008b; Barschak et al., 2009, Mescka et al., 2013, Mescka et al., 2016).

Embora o mecanismo responsável pelo estresse oxidativo nos erros inatos do metabolismo não seja totalmente compreendido, é possível que o acúmulo de metabólitos tóxicos induza a formação excessiva de radicais livres (Artuch et al., 2004).

1.9 DANO AO DNA

O dano no DNA celular se apresenta como uma grande ameaça para a estabilidade do genoma, com isto pode ocorrer à perda ou aumento da atividade cromossômica e conseqüentemente modificações na expressão genica (Kawanishi, Hiraku; Oikawa; 2004, Lee; Koo; Min, 2003).

As espécies reativas de oxigênio podem causar danos extensivos ao DNA, proteínas e lipídeos (Orhan et al., 2016). A ocorrência do estresse oxidativo na doença da urina do xarope do bordo pressupõe-se que os metabólitos acumulados na doença induzem a produção de espécies reativas de oxigênio e ou a diminuição da capacidade antioxidante, levando a danos nas biomoléculas de lipídeos, proteínas e DNA (Sitta et al., 2014).

O dano ao DNA pode ocorrer de duas principais formas distintas: a primeira acontece naturalmente por meio de moléculas endógenas à célula, e a segunda forma ocorre por meio de radiação e xenobióticos (Rao, 2007). O teste de ensaio de cometa detecta danos ao DNA referentes aos agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (Silva; Erdtmann; Henriques, 2003).

1.10 PROPRIEDADES DA MELATONINA

O dermatologista Aaron Lerner e colaboradores, descreveram inicialmente a melatonina em 1958 (Lerner et al., 1958) nomeando-a assim, devido à sua capacidade de contração dos melanóforos de melanócitos de sapos (Claustrat et al., 2005). A Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), possui sua produção realizada na glândula pineal, tendo uma maior produção no escuro. Sua síntese se dá a partir da serotonina de acordo com a seguinte sequência de reações: conversão do triptofano em serotonina; conversão da serotonina em N-acetilserotonina (mediada pela aril-alcil-amina-Nacetiltransferase); conversão da N-acetilserotonina em MEL (mediada pela hidroxil-indol-O-metiltransferase) (Claustrat et al., 2005).

A melatonina sincroniza o ritmo circadiano, protege contra estresse oxidativo, regula o metabolismo energético, modula sistema imunológico e retarda o processo de envelhecimento (Tan et al., 2007; De Pedro Martinez – Alvarez e Delgado 2008; Calabero et al., 2009; Shieh et al., 2009; Hardland 2010; Tan et al., 2010). Além disso, é um antioxidante que age diretamente pela eliminação de radicais livres e regulando o perfil de expressão gênica de enzimas antioxidantes como catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase (Majidinia et al., 2017).

Em relação ao estresse oxidativo, a Melatonina estimula enzimas antioxidativas, podendo cruzar membranas biológicas, alcançando os compartimentos sub-celulares, protegendo-os dos radicais livres, sem apresentar toxicidade (Costa et al., 1995; Marin et al., 1997; Guerrero, 2002; Millan-Plano et al., 2003). Além do mais, estudos apontam que o tratamento de melatonina foi capaz de inibir estresse oxidativo, reações inflamatórias agudas e apoptose celular (Ghobadi et al., 2017; Wang et al., 2018; Wei et al., 2018). Deste modo, o presente estudo visa investigar os efeitos antioxidantes da melatonina como uma possível terapia adjuvante no tratamento da DXB.

1.11 JUSTIFICATIVA

Na DXB os metabolitos acumulados levam alteração de marcadores de lipídios, proteínas e danos oxidantes de DNA, demonstrando uma produção de radicais livres e estresse oxidativo na doença, que está relacionado a disfunção neurológica, cujo mecanismo do dano cerebral desses pacientes ainda são pouco conhecidos.

Uma vez que a melatonina sintética vem sendo utilizada para a prevenção e tratamento de numerosas condições patológicas, a mesma apresenta efeito neuroprotetor e atividade antioxidante, sendo assim, o tratamento com melatonina seria uma nova abordagem terapêutica adjuvante para a doença, já que os modelos animais e também pacientes têm demonstrado a ocorrência de estresse oxidativo na DXB.

O presente estudo busca do ponto de vista científico melhor compreender a complexidade da fisiologia celular e molecular envolvida em torno dos danos neuroquímicos, relacionados aos altos níveis de aminoácidos de cadeia ramificada e

seus respectivos α -cetoácidos, trazendo a melatonina com uma possível terapia adjuvante minimizando os efeitos da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos antioxidantes da melatonina em ratos Wistar jovens submetidos à administração crônica de um pool de aminoácidos de cadeias ramificadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito da melatonina na atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais submetidos a administração crônica de aminoácidos de cadeias ramificadas;
- Verificar o efeito da melatonina na oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais submetidos a administração crônica de aminoácidos de cadeias ramificadas;
- Analisar o efeito da melatonina no dano a lipídeos e a proteínas, em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais submetidos a administração crônica de aminoácidos de cadeias ramificadas;
- Avaliar o efeito da melatonina sobre o dano ao DNA, através dos parâmetros de frequência e índice de dano, em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais submetidos a administração crônica de aminoácidos de cadeias ramificadas;

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 128 ratos (*Rattus norvegicus*) machos, linhagem Wistar, com sete dias de idade, sendo fornecidos por meio do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os neonatos foram deixados com suas mães, sendo desmamados aos 21 dias de vida. Posteriormente, os animais foram alojados em gaiolas em grupos de cinco, com iluminação (ciclos de claro-escuro de ± 12 h), exatidão e temperatura controladas (24 ± 1 °C). Além disso, possuíam livre acesso à água e ao alimento. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos. O projeto deste trabalho de pesquisa possui aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob o protocolo número 017/2017-02 (ANEXO A).

3.2 GRUPOS

O tamanho amostral deste projeto (128 animais) foi baseado em dados da literatura e em estudos prévios elaborado em nosso laboratório. Os grupos experimentais seguem abaixo:

- Grupo 1: Controle (Salina - subcutâneo + Salina - intraperitoneal);
- Grupo 2: Melatonina 10 mg/Kg (Salina - subcutâneo + Melatonina - intraperitoneal);
- Grupo 3: DXB (Pool de AACR - subcutâneo + Salina - intraperitoneal);
- Grupo 4: DXB + Melatonina (Pool de AACR - subcutâneo + Melatonina - intraperitoneal).

3.3 MODELO DXB

Para o presente estudo, foi utilizado um modelo animal quimicamente induzido da DXB conforme Bridi et al. (2006). De acordo com o estudo, a indução ocorre através da administração subcutânea de uma associação de AACR, conteúdo

leucina (190 mmol/L), isoleucina (59 mmol/L) e valina (69 mmol/L), levando a alterações dos aminoácidos, assim como visto nos pacientes acometidos pela doença. Diante disso, 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, durante 21 dias (grupo DXB). Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo protocolo, porém receberam solução salina 0,9%. Após a primeira administração do pool de aminoácidos os animais foram suplementados com administração intraperitoneal de melatonina (10 mg/kg) (Giusti et al.,1996; Ahmad et al., 2011; Wu et al.,2016) a cada 24 horas ou solução salina via intraperitoneal, com o mesmo intervalo de tempo, durante 21 dias, sendo um experimento crônico, de acordo com a seguinte figura 2.

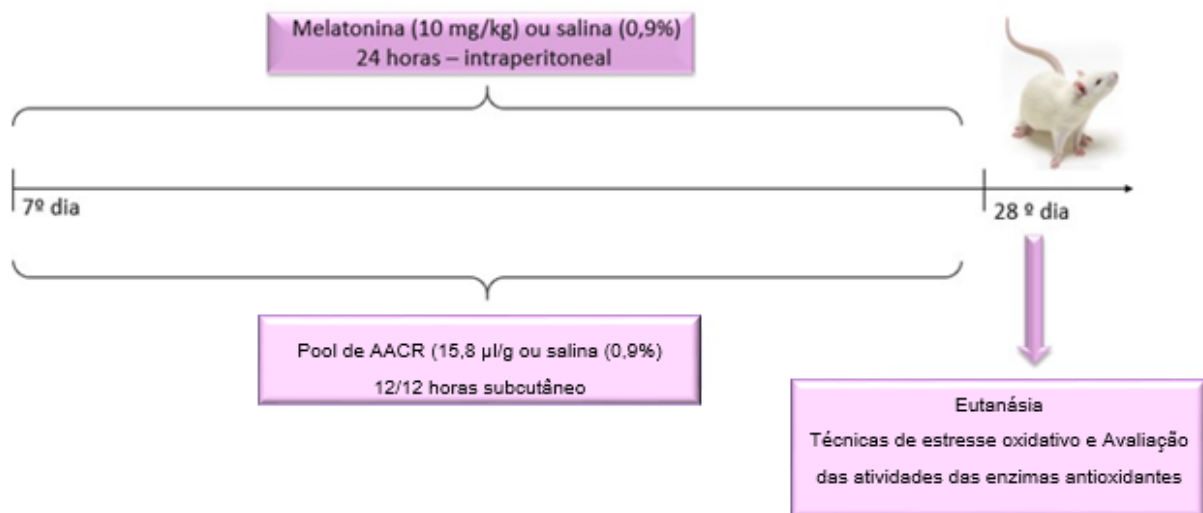


Figura 2 - Desenho esquemático representativo do protocolo experimental. Fonte: Do autor.

3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.4.1 Preparo das amostras

Os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina e sem anestesia, sendo dissecadas as estruturas cerebrais(córtex cerebral, hipocampo e estriado) e coleta de sangue venoso. Os tecidos cerebrais foram homogeneizados na proporção 1:10, em tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4. Em seguida, centrifugou-se o homogenato a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante armazenado. Posteriormente, os homogeneizados foram mantidos a -

80 °C até o momento da realização das avaliações dos parâmetros de estresse oxidativo.

O sangue venoso coletado foi armazenado em tubos eppendorf com solução de congelamento contendo heparina, as amostras de sangue foram mantidas a - 80 °C, posteriormente foi descongelado para a realização do teste ensaio cometa.

3.4.2 Análise dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (tbars)

Para determinação dos níveis de TBA-RS, o homogeneizado foi precipitado através de uma reação ácida com ácido tricloroacético (TCA) a 10 % com sulfato de sódio adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v/v). Seguida da centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico 0,67 % na proporção de 1:1(v/v), sendo a mistura levada a um banho fervente durante 2 horas, com resfriamento em água à temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi realizada uma curva de calibração com 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Os resultados foram expressos como nmol de equivalentes de malondialdeído.mg de proteína-1 (Esterbauer e Cheeseman, 1990).

3.4.3 Dosagem do conteúdo de sulfidrilas

Os conteúdos de sulfidrilas foram determinados conforme Aksenov e Markesbery (2001). As amostras foram homogeneizadas na proporção 1:10, em tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4, sendo centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. Em uma placa de Elisa, foi preparado o branco para cada amostra e um branco reagente. Será pipetado 12 µL de amostra e 238 µL de Tampão PBS com EDTA 1 M no branco amostra, 242,9 µL Tampão PBS com EDTA 1 M e 7,1 µL no branco reagente, e será utilizado 12 µL de amostra, 230,9 µL de Tampão PBS com EDTA 1 M e 7,1 µL de DTNB, para a determinação dos conteúdo das sulfidrilas. Após pipetar o DTNB, a placa foi deixada em temperatura ambiente, protegida da luz, por 30 minutos, sendo posteriormente, realizada a leitura em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados foram expressos em nmols de TNB/mg de proteína.

3.4.4 Medida da oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (dcfh)

De acordo com Le Bel et al. (1992), foi determinada a produção de espécies reativas. As amostras foram previamente homogeneizadas, adicionadas diacetato do DCF, onde as alíquotas foram incubadas durante 30 minutos à 37 °C. As espécies reativas de oxigênio realizam a oxidação de dois elétrons de DCFH, levando a produção do produto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Tampo et al.,2003; Lee et al.,2009). A fluorescência foi determinada utilizando comprimentos de onda de 488 nm (excitação) e 525 nm (emissão), sendo a curva de calibração realizada utilizando-se DCF padrão (0-10 µM). Os resultados obtidos foram expressos como µmol de DCF.mg de proteína.

3.4.5 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas, necessárias para os cálculos das análises de estresse oxidativo, ocorreram conforme descrito por Lowry et al. (1951).

3.4.6 Avaliação das atividades das enzimas antioxidantes

3.4.6.1 Atividade da superóxido dismutase (sod)

Conforme Bannister e Calabrese (1987), foi determinada a atividade da SOD. Realizou-se inicialmente leituras da auto-oxidação da adrenalina. Em uma placa de Elisa, pipetaram-se 190 µL de tampão glicina e 5 µL de catalase no branco; 5 µL de amostra, 185 µL de tampão glicina e 5 µL de catalase para a primeira amostra; 10 µL de amostra, 180 µL de tampão glicina e 5 µL de catalase para a segunda amostra; 15 µL de amostra, 175 µL de tampão glicina e 5 µL de catalase para a terceira amostra. Foi realizado em seguida a leitura pontual em espectrofotômetro a 480 nm. Em seguida, pipetou-se 5 µL de adrenalina em todos os poços, sendo realizado uma nova leitura em espectrofotômetro a 412 nm durante 20 minutos, com leitura de 40 em 40 segundos. A atividade da enzima expressa foi expressa em U/mg de proteína (unidade de atividade da SOD por mg de proteína) (Bannister e Calabrese, 1987).

3.4.6.2 Atividade da catalase (cat)

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

3.4.7 Dano ao DNA

O Ensaio Cometa foi realizado conforme o protocolo descrito por Singh et al. (1988) e com as modificações sugeridas por Tice et al. (2000). O preparo das lâminas foi realizado a partir da mistura de 5µL de homogenato (com tampão PBS) sangue total com 90µL de agarose Low Melting Point (0,75%). Colocou-se então, a mistura (células/agarose) em lâmina de microscópio pré-revestida com 300µL de agarose normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos para solidificação. Logo após as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X-100 e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 2 semanas. Após este período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300 mM hidróxido de sódio (NaOH) e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos ocorrendo o desenovelamento do DNA. Realizou-se a corrida eletroforética a 25 v e 300 mA por 15 minutos. Todas as etapas ocorreram sob luz amarela indireta. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com brometo de etídio (20µg/mL) para análise em microscópio de fluorescência com aumento de 400x. Avaliou-se 100 células por

indivíduo (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação para ausência de cauda, até 4 para o comprimento máximo (Collins, 2004). Desta forma, tem-se um Índice de Danos (ID), onde células foram visualizadas de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação para ausência de cauda. Calculou-se a frequência de danos (FD em %) em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda. Utilizou-se controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises os resultados foram apresentados como a média \pm desvio padrão. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) de duas vias. Quando significativa, realizou-se post hoc por meio do teste de Duncan, sendo o nível de significância adotado $p \leq 0.05$. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica®.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO CRÔNICO DAS EXPOSIÇÕES AOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS) EM TECIDO CEREBRAL DE RATOS WISTAR JOVENS TRATADOS COM MELATONINA.

Inicialmente, avaliou-se os efeitos das exposições aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis de lipoperoxidação ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), em córtex cerebral, hipocampo e estriado. Nós observamos um aumento significativo de equivalentes de MDA no grupo DXB quando comparado ao controle nas estruturas analisadas (figura 3 A, B e C). Verificou-se ainda no estriado uma diminuição significativa de equivalentes de MDA no grupo melatonina (figura 3 C). Além disso, os animais induzidos ao modelo de DXB tratados com melatonina, apresentaram reversão dos danos ocasionados pela peroxidação lipídica nas estruturas analisadas, sendo que no córtex cerebral houve uma melhora dos níveis (figura 3 A, B e C), mas não ao ponto de serem equivalentes aos resultados do grupo melatonina (figura 3 A).

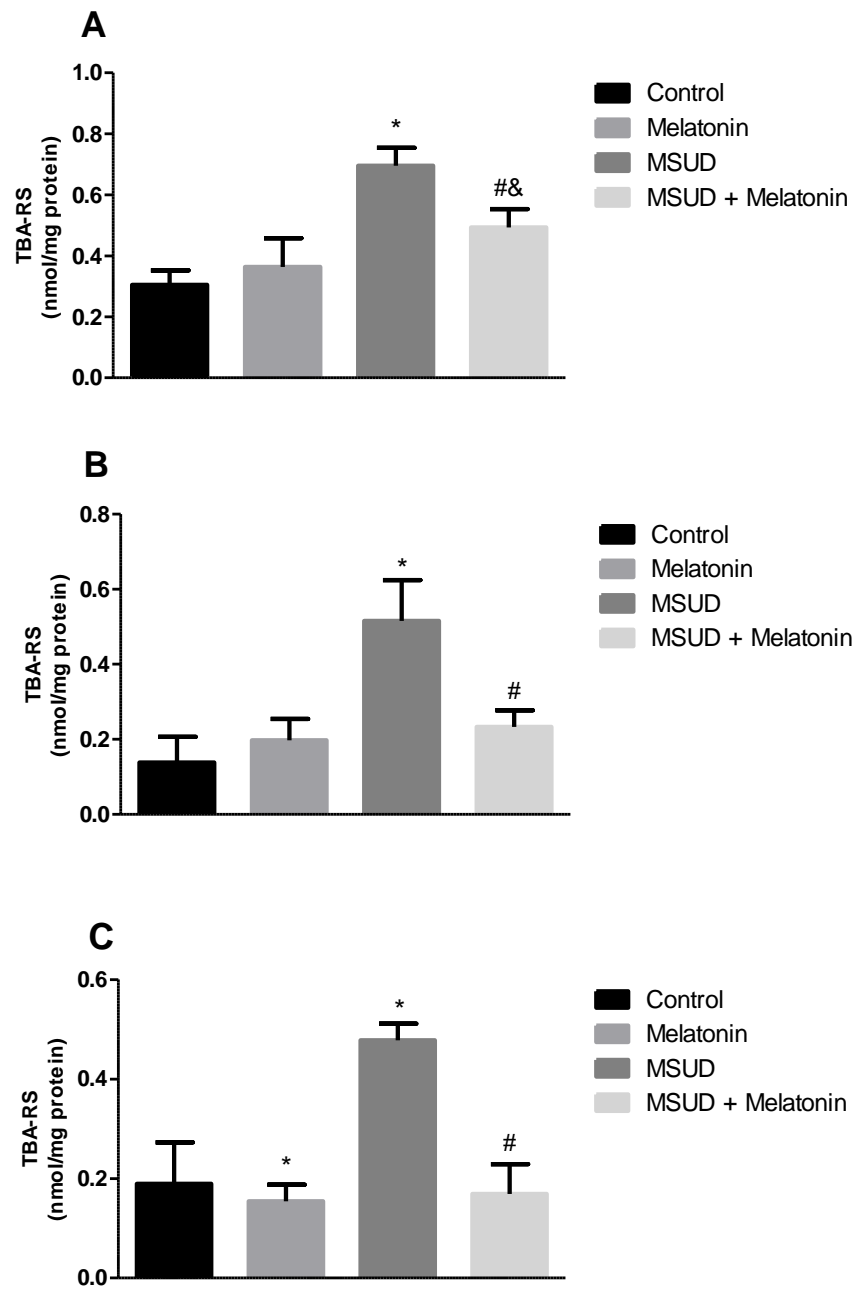


Figura 3 -Efeito da administração do pool de AACR (15,8 $\mu\text{mol/g}$) sobre níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em em córtex cerebral (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos Wistar machos com 30 dias de vida. Os dados expressos como média \pm desvio padrão da média para 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; # comparado ao grupo DXB e & comparado ao grupo melatonina (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Ducan).

4.2 EFEITO CRÔNICO DAS EXPOSIÇÕES AOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE O CONTEÚDO DE SULFIDRILAS EM TECIDO CEREBRAL DE RATOS WISTAR JOVENS TRATADOS COM MELATONINA.

Em seguida, os conteúdos de sulfidrilas se mostraram alterados nas estruturas córtex cerebral, hipocampo e estriado nos animais do grupo DXB. Verificou-se uma diminuição significativa dos conteúdos de sulfidrilas em córtex cerebral e hipocampo, quando o grupo DXB é comparado ao grupo controle (figura 4 A e B). Analisando o grupo DXB em relação ao grupo melatonina, o tratamento com melatonina foi capaz de diminuir significativamente os conteúdos de sulfidrilas percebe-se uma diminuição significativas dos conteúdos de sulfidrilas (figura 4 C). Além disso, percebeu-se um aumento significativo do conteúdo de sulfidrilas nos grupos melatonina nas estruturas córtex cerebral, hipocampo e estriado (figura 4 A, B e C). Quando analisado o grupo DXB + melatonina, identificou-se que os animais tratados apresentam melhora do conteúdo de sulfidrilas quando comparados ao grupo DXB, nas estruturas córtex cerebral e hipocampo (figura 4 A e B), porém sem atingir os níveis do grupo melatonina (figura xB).

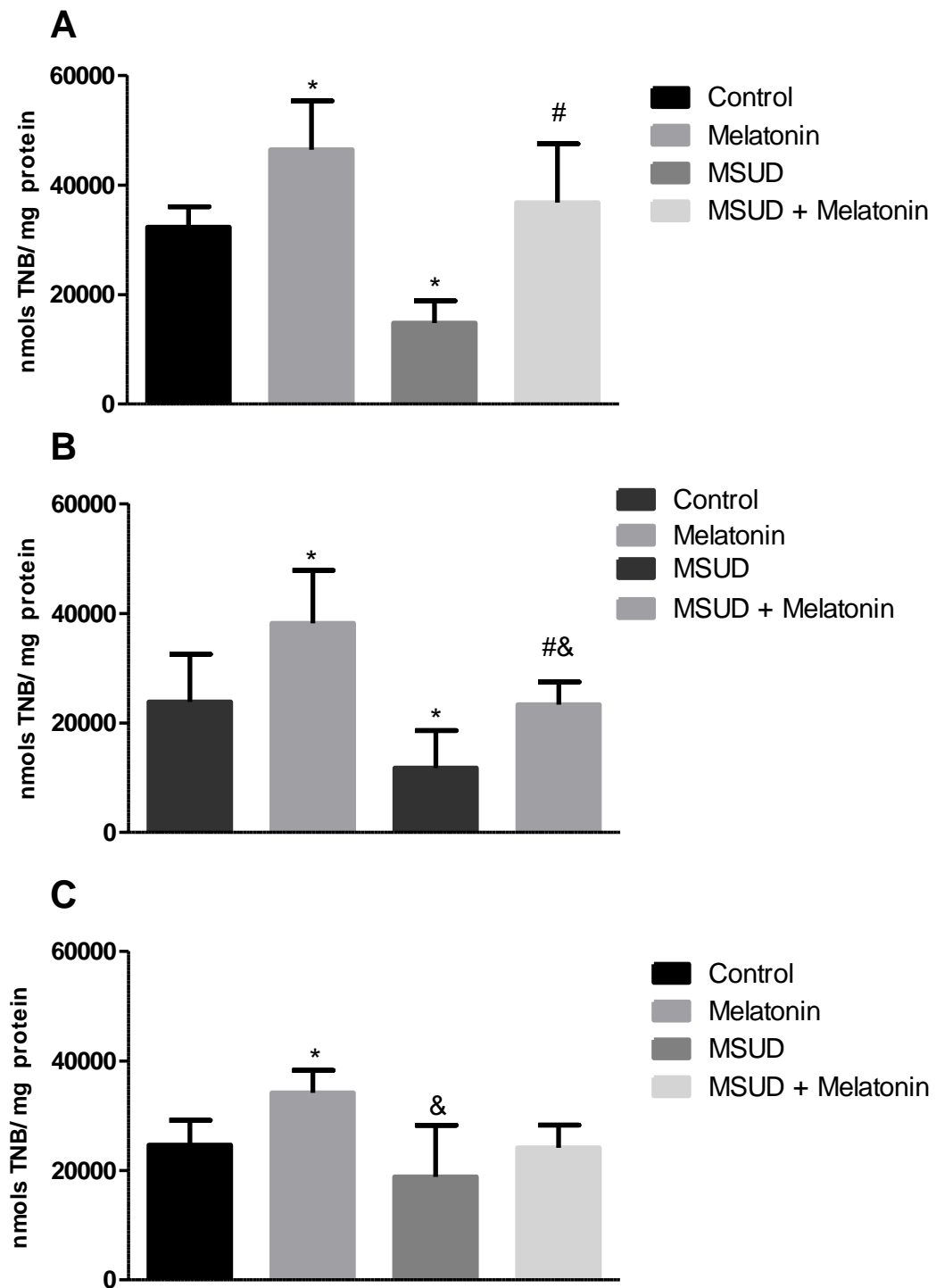


Figura 4 - Efeito da administração do pool de AACR (15,8 $\mu\text{mol/g}$) sobre o conteúdo de sulfidrilas em córtex cerebral (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos Wistar machos com 30 dias de vida. Os dados expressos como média \pm desvio padrão da média para 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; # comparado ao grupo DXB e & comparado ao grupo melatonina (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Duncan).

4.3 EFEITO CRÔNICO DAS EXPOSIÇÕES AOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE A OXIDAÇÃO DE DCFH EM TECIDO CEREBRAL DE RATOS WISTAR JOVENS TRATADOS COM MELATONINA.

Verificou-se também as espécies reativas através da técnica de oxidação de DFCH. Nota-se um aumento significativo de DCF nos animais do grupo DXB, quando comparados ao grupo controle nas estruturas córtex cerebral e estriado (figura 5 A e C). Percebe-se ainda, uma diminuição significativa de DCF no grupo melatonina quando comparado ao grupo controle (figura 5 C). Ademais, o grupo DXB + melatonina apresenta uma diminuição significativa de DCFH quando comparado ao grupo DXB (figura 5 A), entretanto, sem chegar aos níveis do grupo melatonina no estriado (figura 5 C).

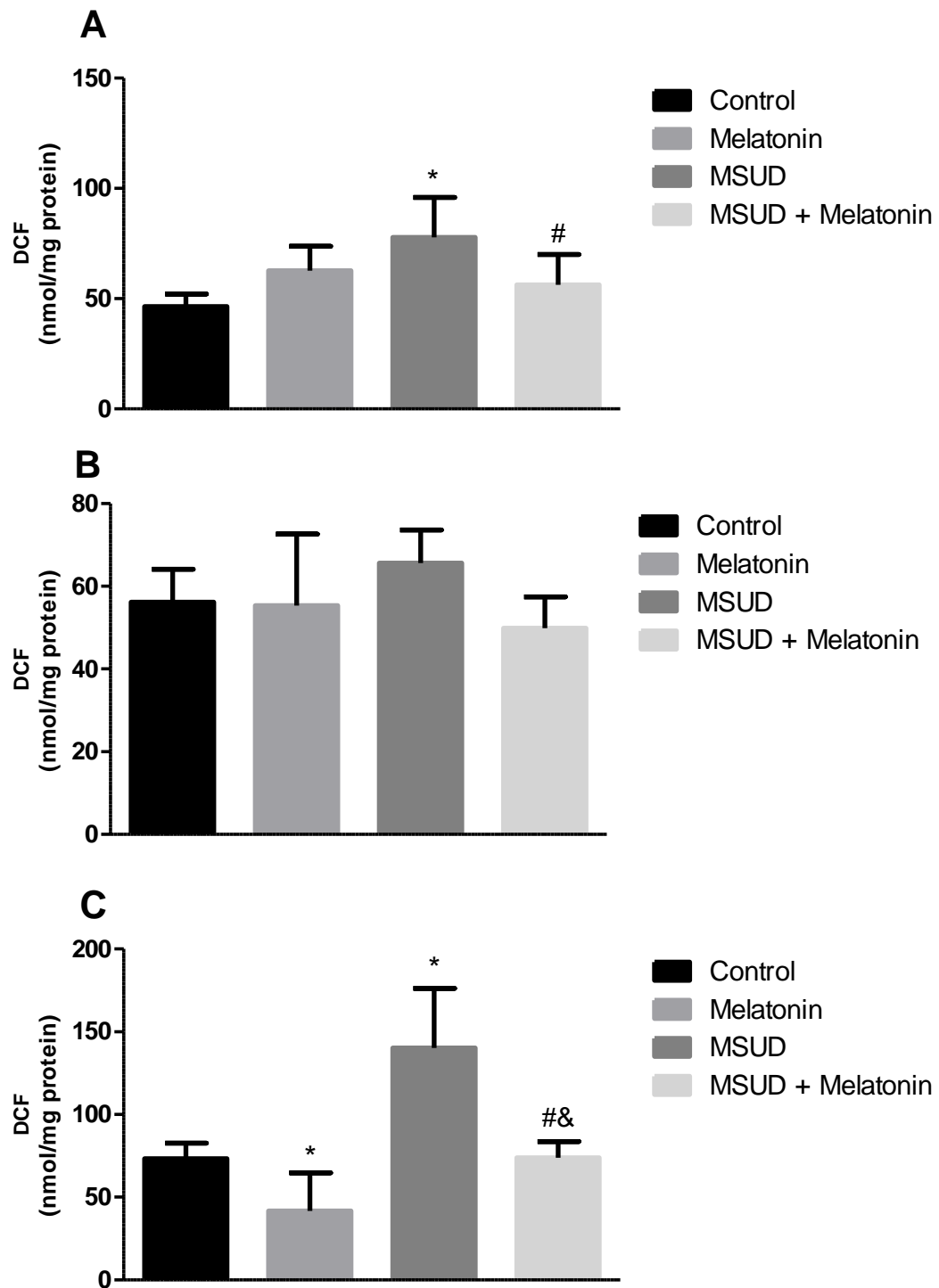


Figura 5 -Efeito da administração do pool de AACR (15,8 $\mu\text{mol/g}$) sobre sobre a oxidação de DCFH em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos Wistar machos com 30 dias de vida. Os dados expressos como média \pm desvio padrão da média para 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; # comparado ao grupo DXB e & comparado ao grupo melatonina (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Duncan).

4.4 EFEITO CRÔNICO DAS EXPOSIÇÕES AOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM TECIDO CEREBRAL DE RATOS WISTAR JOVENS TRATADOS COM MELATONINA.

Para analisar a atividade antioxidante, analisou-se primeiro a atividade da superóxido dismutase (SOD). Verifica-se um aumento significativo da atividade da SOD no grupo DXB quando comparado ao grupo controle nas estruturas córtex cerebral e estriado (figura 6 A e C). Percebe-se ainda no grupo DXB tratado com melatonina, que a atividade da SOD no hipocampo apresentou um aumento significativo quando comparado aos grupos melatonina e DXB (figura 6 B).

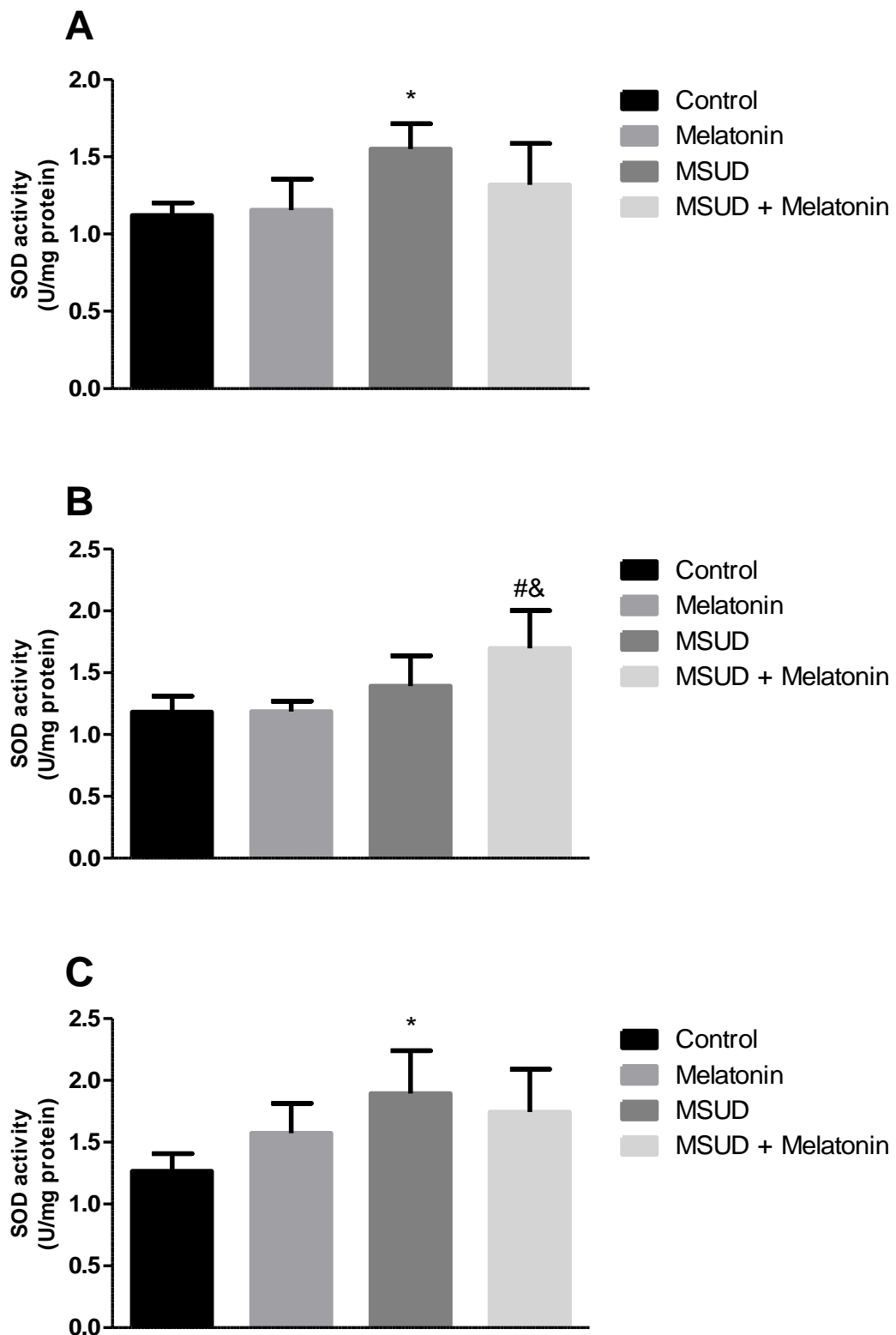


Figura 6 - Efeito da administração do pool de AACR (15,8 $\mu\text{mol/g}$) sobre a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em córtex cerebral (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos Wistar machos com 30 dias de vida. Os dados expressos como média \pm desvio padrão da média para 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; # comparado ao grupo DXB e & comparado ao grupo melatonina (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Ducan).

4.5 EFEITO CRÔNICO DAS EXPOSIÇÕES AOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (CAT) EM TECIDO CEREBRAL DE RATOS WISTAR JOVENS TRATADOS COM MELATONINA.

Em relação ainda a atividade antioxidante, verificou-se a atividade da atividade da catalase em córtex cerebral, hipocampo e estriado. Percebe-se uma diminuição significativa da atividade da catalase nos animais do grupo DXB quando comparados ao grupo controle, nas estruturas córtex cerebral e hipocampo (Figura 7 A e B). Além disso, a mesma diminuição é encontrada no grupo melatonina da estrutura hipocampo (figura 7 B). Entretanto, há um aumento da atividade da catalase no grupo melatonina quando analisada a estrutura do estriado. Em relação ao grupo DXB que recebeu tratamento com melatonina, percebe-se uma diminuição significativa da atividade da catalase quando comparada ao grupo melatonina nas estruturas córtex cerebral e estriado (figura 7 A e C), e um aumento da atividade da catalase quando comparado ao grupo DXB no hipocampo (figura 7 B).

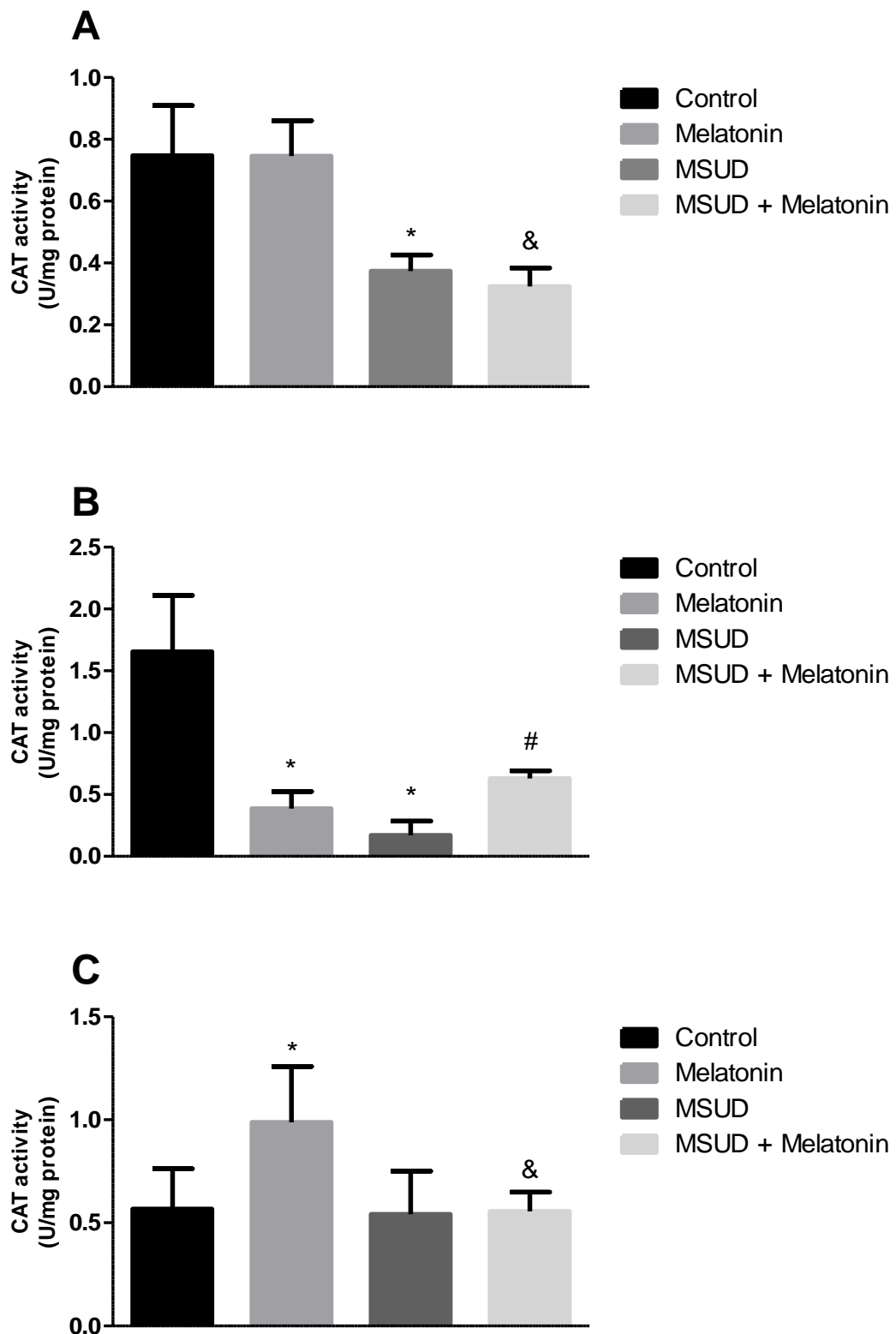


Figura 7 - Efeito da administração do pool de AACR (15,8 $\mu\text{mol/g}$) sobre a atividade enzimática da da catalase (CAT) em córtex cerebral (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos Wistar machos com 30 dias de vida. Os dados expressos como média \pm desvio padrão da média para 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; # comparado ao grupo DXB e & comparado ao grupo melatonina (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Ducan).

4.6 EFEITO CRÔNICO DAS EXPOSIÇÕES AOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE O DANO AO DNA EM SANGUE TOTAL DE RATOS WISTAR JOVENS TRATADOS COM MELATONINA.

Por fim, para verificar o dano ao DNA, avaliou-se a frequência de danos (%) e o índice de danos (0-400). O estudo demonstra que a administração crônica de AACR causou um aumento significativo da frequência de danos (%) no grupo DXB, quando comparado ao grupo controle. Além disso, verificou-se que o tratamento com melatonina no grupo DXB foi capaz de reverter tais danos, porém não aos níveis do grupo melatonina (figura 8 A). Ao analisar o índice de danos (0-400), consta-se que o grupo DXB apresenta um aumento significativo do índice de danos quando comparado ao grupo controle. Ademais, o tratamento com melatonina no grupo DXB foi capaz de reverter tais danos, porém não aos níveis do grupo melatonina (figura 8 B).

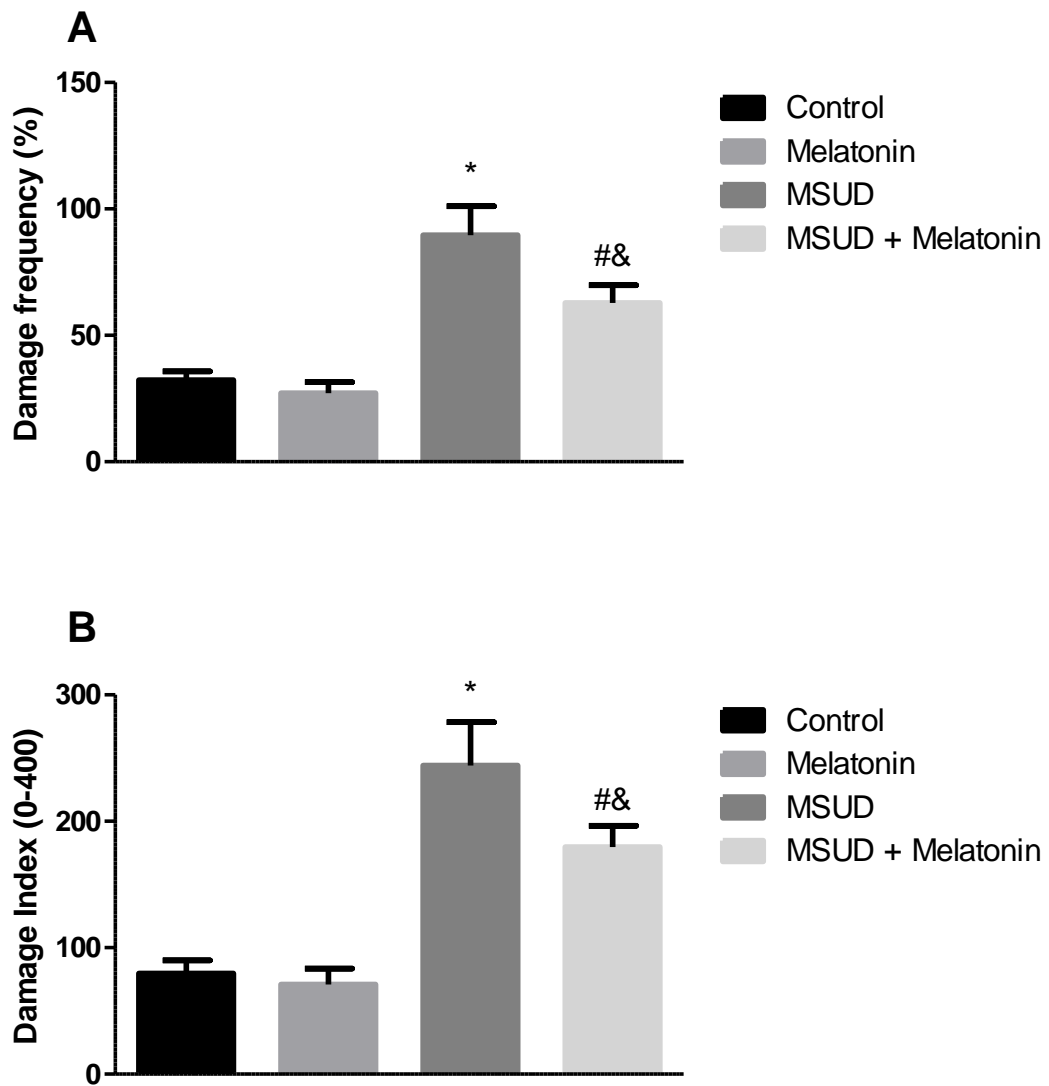


Figura8 - Efeito da administração do pool de AACR (15,8 $\mu\text{mol/g}$) sobre a frequência de dano (FD) (A) e o índice de dano (ID) (B) em sangue total de ratos Wistar machos com 30 dias de vida. Os dados expressos como média \pm desvio padrão da média para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; # comparado ao grupo DXB e & comparado ao grupo melatonina (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Ducan).

5 DISCUSSÃO

A doença da urina do xarope do bordo é considerada um dos mais importantes e sérios distúrbios genéticos do metabolismo de aminoácidos, sendo a leucina e α -cetoisocaproico os principais metabólitos neurotóxicos na doença, sendo associados ao aparecimento de sintomas neurológicos (Chuang e Shih 2001; Snyderman et al. 1964). Além disso, marcadores de lipídios, proteínas e oxidantes de danos ao DNA foram relatados na DXB, provavelmente secundária à alta produção de radicais livres. Considerando estes achados, é bem estabelecido que o estresse oxidativo contribua para danos cerebrais da doença (Sitta et al., 2013). De tal modo, o possível uso de antioxidantes como uma nova terapia adjuvante para pacientes.

A terapia para DXB é baseada em uma dieta natural com restrição de proteína com baixo teor de aminoácidos de cadeia ramificada, suplementada com mistura de aminoácidos livre de AACR, enriquecida com oligoelementos, vitaminas e minerais, bem como a intervenção agressiva durante a descompensação metabólica aguda. Embora os benefícios do tratamento dietético para doença sejam inegáveis, a restrição natural de proteína pode aumentar o risco de deficiências nutricionais, sendo que estas podem resultar em um baixo status antioxidante total que pode predispor e / ou contribuir para o estresse oxidativo (Mescka et al. 2015). Outra forma de tratamento seria o transplante hepático, em pacientes pediátricos que apresente forma clássica da doença. Tem sido um tratamento bem sucedido, os riscos associados à cirurgia e a imunossupressão ao longo da vida semelhante a outras populações pediátricas de transplante de fígado, sendo que não há reversão de déficit cognitivo ou progressão de comprometimento neurocognitivo (Blackburn et al., 2017).

Estudos demonstram que o estresse oxidativo está presente em muitos EIM, incluindo acidurias orgânicas, aminoacidopatias, distúrbio da oxidação dos ácidos graxos mitocondriais e doenças peroxisômicas (Streck et al. 2003; Barschak et al. 2006; Vargas et al. 2004). Assim como em outros tecidos, o estresse oxidativo no cérebro pode danificar os neurônios por vários mecanismos, incluindo aumento da peroxidação lipídica, dano oxidativo ao DNA e proteínas e indução de apoptose ou necrose (Halliwell 2001).

Estudos indicam que a peroxidação lipídica, um evento importante induzido pelo estresse oxidativo, possui relação com a patogênese de algumas

doenças, particularmente as que afetam o sistema nervoso central, como distúrbios neurodegenerativos, convulsões epiléticas, desmielinização, demência e outras (Halliwell e Gutteridge, 1985; Reznick e Packer, 1993). Diante disso, buscou-se avaliar os efeitos da administração crônica de AACR sobre a peroxidação lipídica e o papel da melatonina como possível neuroprotetor, sabendo que a mesma estimula enzimas antioxidantes e apresenta proteção contra radicais livres.

Observou-se que a administração crônica do pool de BCAA aumentou os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em cortex cerebral, hipocampo e estriado. Estudos anteriores também indicam alterações dos níveis de TBA-RS em na DXB, onde foram descritos aumentados de TBA-RS em plasma de pacientes com DXB, in vitro, e em tecido cerebral de ratos submetidos a altas concentrações do pool de aminoácidos, ou somente da leucina ou CIC (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003; Barschak et al., 2006; Barschak et al., 2008a; Barschak et al., 2008b ;Barschak et al., 2009; Bridi et al., 2005a; Taschetto et al., 2017; Mescka et al., 2011; Mescka et al., 2013; Mescka et al., 2016).

Ainda em relação a análise de peroxidação lipídica, verificou-se que o grupo que recebeu apenas a melatonina, apresentou uma diminuição significativa dos níveis de TBARS, sendo que o grupo DXB tratado com melatonina demonstrou melhora dos níveis de peroxidação lipídica. De acordo com a literatura, a melatonina é capaz de melhorar níveis de TBARS, diminuindo esse parâmetro (El-Sokkary et al. 1999; Raghavendra e Kulkarni 2001; Gönenç et al, 2005; Parisotto et al., 2016; Ostjen et al., 2018). O uso de antioxidantes pode ajudar a minimizar o estresse oxidativo, contribuindo para a intervenção terapêutica, sendo que a melatonina atua como um eliminador de radicais livres. Após sua administração, atravessa as membranas livremente e se espalha através dos compartimentos de todo o corpo. Quando comparada a vitamina C e o α -tocoferol, apresenta-se dez vezes mais potente na quebra da reação em cadeia da peroxidação lipídica (Rosa et al., 2010).

A verificar o conteúdo de sulfidrilas, nota-se que a administração crônica de AACR é capaz de diminuir o conteúdo de sulfidrilas no córtex cerebral e hipocampo, sugerindo um dano oxidativo a proteína. Ressalta-se que o dano proteico relacionado ao acúmulo de AACR já é relatado, onde Taschetto et al., 2017, demonstrou que a administração aguda de CIC foi capaz de levar a alteração no conteúdo de carbonil. Considera-se que as espécies reativas induzidas por metabólitos podem interagir direta ou indiretamente com grupos de proteínas,

levando à oxidação de proteínas, devido a um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas e os sistemas de defesa antioxidante (Mescka et al., 2015; Taschetto et al., 2017). Ao analisar o papel da melatonina, verificou-se que a mesma aumentou o conteúdo de sulfidrilas em cortex cerebral, hipocampo e estriado, sendo ainda capaz de aumentar o conteúdo de sulfidrilas quando administrado em conjunto com o AACR nas estruturas córtex cerebral e hipocampo, apresentando assim um possível efeito neuroprotetor.

Os danos oxidativos causados pelos altos níveis de espécies reativas de oxigênio ocasionam modificações importantes a biomoléculas conduzindo a danos celulares, nas membranas lipídicas, nas proteínas citosólicas e de membrana, e danos nas bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Bianchi et al., 1999). Dessa forma, buscou-se analisar o a produção de espécies reativas por meio da oxidação de DCFH. Verificou-se um aumento da produção das espécies reativas ocasionado pela administração das altas doses de AACR em córtex cerebral e estriado. Levando-se em consideração que a superprodução de radicais livres de oxigênio e nitrogênio leva a maiores níveis de TBA-RS (González-Flecha et al., 1991; Halliwell e Gutteridge, 2007), tais achados ao encontro com o aumento de TBARS verificado nesse trabalho. Outros estudos indicam também que a administração de leucina ou o pool de AACR aumenta a formação de espécies reativas no em tecido cerebral de ratos jovens (Mescka et al., 2016; Mescka et al., 2015; Rieger et al., 2017). Ao analisar o estriado, verificou-se que a melatonina diminui a quantidade das especies reativas de oxigênio, assim como esperado, uma vez que, a melatonina possui um papel de antioxidante direto e indireto, eliminando radicais livres, sendo utilizada dessa forma, para reduzir o dano oxidativo(Reiter et al., 1995, Hardeland, 1997; Manchester et al., 2015; Tan et al., 2015; Reiter et al., 2016). Além disso, verificou-se que o grupo DXB que recebeu melatonina como tratamento, apresentou uma diminuição significativa da quantidade de espécies reativas de oxigênio quando comparado ao grupo DXB em córtex cerebral e estriado. Assim, sugere-se um possível efeito neuroprotetor da melatonina, uma vez que atua diretamente na captura de espécies de radicais livres (Manchester et al., 2015; Tan et al., 2015; Reiter et al., 2016).

Levando isso em consideração, buscou-se avaliar as enzimas antioxidantes, por meio da atividade da SOD e CAT, além de considerar que a melatonina é um poderoso antioxidante que atua diretamente na captura de

espécies de radicais livres e regulando o perfil de expressão gênica de enzimas antioxidantes como catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase (Reiter et al., 2000; Rodriguez et al., 2004).

Assim, verificou-se que a administração crônica de AACR foi capaz de aumentar a atividade da SOD em córtex cerebral e estriado no grupo DXB. Em contrapartida, a CAT apresenta uma diminuição significativa da sua atividade em córtex cerebral e hipocampo. Ressalta-se que estudos anteriores vêm indicando que a administração aguda e crônica do pool de BCAA ou de leucina altera padrões antioxidantes.

Estudos vem indicando a alteração de parâmetros antioxidantes por meio do acúmulo de aminoácidos de cadeia ramificada. Rieger et al. (2017), descrevem que a atividade de SOD foi significativamente diminuída no córtex cerebral pela administração de leucina, em um modelo crônico da doença. Além disso, outro estudo indica que a administração de CIC e CMV provocou uma atividade reduzida de SOD, sendo a atividade do CAT não modificada pelos metabolitos (Funchal et al., 2006). Taschetto et al. (2017), relatam ainda que a administração aguda de CIC aumentou significativamente a atividade de SOD, enquanto que a atividade do CAT foi diminuída quando analisados tecido cerebral de ratos.

Entretanto, um estudo indicou que a administração de AACR foi capaz de aumentar a atividade da CAT e diminuir a atividade de SOD (Mescka et al., 2016). Entretanto, alguns estudos indicam que não ocorreram alterações, como no estudo de Mescka et al. (2011), que em um modelo agudo da DXB, não relatam alterações da atividade de SOD, sendo a atividade de CAT reduzidas no córtex cerebral, assim como em outros estudos, que demonstram que não ocorreram modificação dos níveis da atividade da SOD in vitro de eritrócitos de indivíduos afetados pela DXB (Bridi et al., 2005a; Bridi et al., 2005b; Barschak et al., 2007).

Diante dos resultados, pode-se sugerir que o aumento na atividade SOD se dá pela produção de ânions superóxido. Com isso, a produção de H₂O₂ aumentada levaria a uma diminuição da atividade de catalase, já que quando exposta ao seu próprio substrato, H₂O₂, leva a mudanças na conformação enzimática (Halliwell e Gutteridge 2007; Kirkman e Gaetani, 2007). Vale lembrar que o excesso de superóxido dismutase pode levar à indução de lesões celulares, caso as células não forem capazes de metabolizar adequadamente H₂O₂ por catalase e peroxidase de GSH (Change et al., 1979; Halliwell 2011; Halliwell 2013).

Ao verificar a atividade de SOD no grupo DXB que recebeu o tratamento com melatonina, verificou-se um aumento significativo da atividade quando comparado aos grupos melatonina e DXB em hipocampo. Já analisando a atividade da CAT no grupo DXB que recebeu tratamento com a melatonina, verifica-se uma diminuição da sua atividade em córtex cerebral e estriado quando comparada ao grupo melatonina, porém aumentada em relação ao grupo DXB no hipocampo. Verifica-se ainda que a atividade da CAT foi diminuída em hipocampo, entretanto aumentada no estriado, quando comparado ao grupo controle.

Estudos sugerem que a melatonina pode estimular a enzima CAT, responsável pela metabolização de H₂O₂. Dessa forma, espera-se que a melatonina reduza os níveis intracelulares de H₂O₂ e a geração de OH. Ressalta-se, entretanto, que a atividade da CAT dentro do cérebro tem influência mínima como um processo antioxidante por causa de sua baixa atividade. (Menendez-Pelaez et al., 1993; Menendez-Pelaez e Reiter, 1993; Montilla et al., 1997).

Na desintoxicação do radical .OH, acredita-se que a melatonina atue por meio da doação de elétrons (Hardeland et al., 1993; Poeggeler et al., 1994 , Poeggeler et al., 1996). Ao fazê-lo, a melatonina tornar-se o radical indolil (ou melatonil) (Stasica et al., 1998), o qual pode então eliminar um O - 2 , reduzindo ainda mais o número de .OH gerado a partir de O - 2 . (Hardeland et al., 1993 ; Poeggeler et al., 1994). Assim, cada molécula de melatonina aparentemente tem a capacidade de eliminar dois radicais (Hardeland et al., 1993; Poeggeler et al., 1994, Poeggeler et al., 1996). Descreve-se ainda que a melatonina atua na regulação da expressão gênica de enzimas antioxidantes como SOD, CAT e glutathione peroxidase (Antolin et al., 1996 ; Kotler et al., 1998; Reiter et al., 2000; Rodriguez et al., 2004)

Uma vez que demonstrou-se alterações de importantes parâmetros de estresse oxidativo, buscou-se avaliar o dano do DNA do sangue dos ratos que receberam a administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada, sendo tratados com melatonina, uma vez que o DNA celular é um alvo sensível após o estresse oxidativo, onde podem ocorrer danos que incluem modificações químicas e estruturais, devidoprincipalmente ao radical hidroxila (El-Mallakh et al.,1995; Culmsee e Mattson, 2005; Cooke et al., 2006; Khamisy e Caldecott, 2006).

Assim, verificou-se que a administração crônica de AACR aumentou significativamente a frequência de danos e o índice de danos ao DNA em sangue de ratos wistar jovens. Em concordância, Scaini et al. (2012), verificaram que a

administração aguda de AACR acarretou no aumento significativo no dano ao DNA no hipocampo, enquanto que a administração crônica aumentou o dano ao DNA no hipocampo e estriado de ratos. Além disso, Mescka et al.,2014, demonstraram danos no DNA em leucócitos tratados com leucina ou CIC em comparação com o grupo controle, onde pacientes tratados somente com restrição dietética apresentavam dano ao DNA (Mescka et al.,2015). Vale ressaltar que o ensaio do cometa não discrimina as causas do dano ao DNA, entretanto, sugerimos que o acúmulo de aminoácidos de cadeia ramificada é capaz de promover danos ao DNA, uma vez que aumentam a produção de radicais livres, assim como verificamos nesse estudo.

Ao verificar os efeitos da melatonina, observou-se que o tratamento foi capaz de prevenir os danos ocasionados pela administração de altas doses de AACR, quando comparado ao grupo DXB, sugerindo um efeito benéfico da terapia antioxidante na prevenção de danos no DNA em um modelo crônico induzido quimicamente de DXB. Esse resultado vai ao encontro com a literatura, que descreve que a melatonina protege o DNA dos efeitos deletérios de agentes físicos, radiação ionizante, toxinas e lipopolissacarídeos (Mathes, 2010; El-Sokkary et al., 1999; Qi et al., 2000). Como a principal causa de danos no DNA são os níveis elevados de EROs, o efeito protetor da melatonina é relacionado ao seu potencial antioxidante, uma vez que a mesma consegue atravessar as membranas celulares, permitindo fornecer proteção no local do DNA contra os radicais livres gerados (Melchiorri et al., 1996; Reiter, 1993; Hevia et al., 2015).

Levando em consideração que as espécies reativas de oxigênio são capazes de oxidar diferentes moléculas, como por exemplo, lipídios, proteínas, açúcares e DNA, acarretando na morte celular (Halliwell, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2007), indicamos que o excesso de aminoácidos de cadeia ramificada em ratos jovens, é capaz de induzir o estresse oxidativo, por meio do aumento da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, produção de espécies reativas de oxigênio, alteração de parâmetros antioxidantes, além de causar dano ao DNA.

6 CONCLUSÃO

A administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada altera parâmetros de estresse oxidativo em tecido cerebral de ratos jovens e dano ao DNA, por sua vez a melatonina reverte os danos, tendo assim, um possível efeito neuroprotetor na doença.

Dessa forma, alterações de parâmetros de estresse oxidativo e de dano ao DNA podem estar relacionados com a fisiopatologia da disfunção neurológica dos pacientes com a DXB, sendo que o tratamento com melatonina pode ser considerado uma potencial terapia adjuvante para esses pacientes.

REFERÊNCIAS

- Acuna-Castroviejo D, Escames G, Rodriguez MI, Lopez LC. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci.* 2007; 12: 947-963.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-126.
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001; 302(2-3): 141-145.
- Antolin, I., Rodriguez, C., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Aria, H., Kotter, M., Rodriguez-Colungo, M. J., Tolivia, D. and Menendez-Pelaez, A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J.* 1996; 10: 882-890.
- Arendt, J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J Biol Rhythms.* 2005; 20(4): 291-303.
- Artuch, R., Colome, C., Sierra, C., Brandi, N., Lambruschini, N., Campistol, J., Ugarte, D. and Vilaseca, M.A. (2004). A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin Biochem* 37:198-203.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for SOD. *Methods Biochem Anal.* 1987; 32:279-312.
- 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(4-5): 317-324.
- 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(1): 71-80.
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, Busanello EN, Coelho DM, Cipriani F, Dutra-Filho CS, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Amino acids levels and lipid peroxidation in maple syrup urine disease patients. *Clin Biochem.* 2009; 42(6):462-466.
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, de Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis.* 2006; 21 (4): 279-286.
- Bianchi MLP, Antunes LMO. 1999. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Rev nutrição.* 12(2):123-130.
- Blackburn PR, Gass JM, Vairo FPE, Farnham KM, Atwal HK, Macklin S, Klee EW, Atwal PS. Maple syrup urine disease: mechanisms and management. *Appl Clin Genet.* 2017 Sep 6;10:57-66.

Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: Cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr: Top Med Chem.* 2002; 2: 113-132.

Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Wajner M, Utra Filho CS. Indução do estresse oxidativo no cérebro de ratos pelos metabólitos acumulados na doença da urina xarope de bordo. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 21 (2003), pp. 327 – 332.

Bridi R, Braum CA, Zorzi GK, Wannmacher CM, Wajner M, Lissi EG, Dutra-Filho CS. Os ácidos alfa-ceto acumulados na doença da urina do xarope de bordo estimulam a peroxidação lipídica e reduzem as defesas antioxidantes no córtex cerebral de ratos jovens. *Metab. Brain Dis.*, 20 (2005), pp. 155 – 167.

Bridi R, Latini A, Braum CA, Zorzi GK, Moacir W, Lissi E, Dutra-Filho CS. Avaliação do mecanismo envolvido no dano oxidativo induzido por leucina no córtex cerebral de ratos jovens. *Radic Livre Res.*, 39 (2005), pp. 71 – 79.

Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernandez C, SoriaValles C, De Gonzalo-Calvo D, Coto-Montes A (2009). Melatonin alters cell death processes in response to age-related oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice. *Journal of Pineal Research*, 46 (1),106–114.

Cardoena L, Schiffb M, Lambrona J, Regaa A, Virlouvetd AL, Biranc V, Eleni Dit Trollie S, Elmaleh-Bergèsa M, Alisona M. Leucinose à révélation néonatale. Neonatal presentation of maple syrup urine disease. *Archives de Pédiatrie.* 2016; 23(12): 1291–1294.

Change B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxidemetabolism in mammalian organs. *Physiol Ver.* 1979; 59: 527–605.

Chuang DT, Shih VE. Maple syrup urine disease (branchedchain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill; 2001.p.1971-2005.

Chuang DT, Wynn RM, Shih VE. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudt AL, Sly WL, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.* New York: McGraw-Hill; 2008. p. 1971-2005.

Chuang JL, Wynn RM, Moss CC, Song JL, Li J, Awad N, Mandel H, Chuang DT. Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients: a proposed mechanism for the thiamine-responsive phenotype. *J Biol Chem.* 2004; 279(17):792-800.

Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev.* 2005; 9: 11-24.

Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie.* 2015; 61(2-3):77-84.

Cockoburn F, Giltzeman R, editors. *Inborn Errors of Metabolism in Humans.* MTP Press Limited. 157-160, 1982.

Cooke MS, Olinski R, Evans MD. A medição do dano oxidativo ao DNA tem significado clínico. *Clin. Chim. Acta*, 365 (2006), pp. 30 - 49

Costa EJ, Lopes RH, Lamy-Freund MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res.* 1995; 19(3): 123-126.

Culmsee C, Mattson MP. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 10;331(3):761-777.

Dalle-Donne I, Giustarini R, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003;9(4):169-76.

Dancis J, Hutzler J, Levitz M. Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine disease. *Biochim Biophys Acta.* 1960; 23:342- 343.

Danner DJ, Lemmon SK, Besharse JC, Elsas LJ. Purification and characterization of branched chain α -ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1979; 254:5522-5526.

de Baulny HO, Dionisi-Vici C, Wendel U. Branched-Chain Organic Acidurias/Acidaemias. In: Saudubray J-M, Berghe GVD, Walter JH, editors. *Inborn Metabolic Diseases: diagnosis and treatment.* 3th. 2012. p. 277-96.

De Pedro N, Martinez-Alvarez RM, & Delgado MJ (2008). Melatonin reduces body weight in goldfish (*Carassius auratus*): effects on metabolic resources and some feeding regulators. *Journal of Pineal Research*, 45(1), 32–39.

El-Khamisy SF, Caldecott KW. TDP1-dependent DNA single-strand break repair and neurodegeneration. *Mutagenesis.* 2006; 21: 219-224.

El-Mallakh RS, Hedges S, Casey D. Digoxin encephalopathy presenting as mood disturbance. *J. Clin. Psychopharmacol.* 1995; 15: 82-83

El-Sokkary GH, Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Cabrera J: Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration. *Alcohol Alcohol.* 1999; 34: 842-850.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990;186:407-21.

Fontella FU, Gassen E, Pulronik V, Wannmacher CMD, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho C. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis.* 2002; 17:47–54.

Funchal C, Latini A, Jacques-Silva MC, Dos Santos AQ, Buzin L, Gottfried C, Wajner M, Pessoa-Pureur R. Morphological alterations and induction of oxidative stress in

glial cells caused by the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Int.* 2006; 49(7):640-50.

Garrod AG. *Inborn Errors of Metabolism.* Oxford, Oxford University Press. 1909.
Gupta YK, Gupta M, KOHLI K. Neuroprotective role of melatonin in oxidative stress vulnerable brain. *Indian J Physiol Pharmacol* 2003; 47 (4): 373–386.

Ghobadi A, Shirazi A, Najafi M, Kahkesh MH, Rezapoor S. Melatonin Ameliorates Radiation-Induced Oxidative Stress at Targeted and Nontargeted Lung Tissue. *J Med Phys.* 2017;42(4):241-244.

Gimenez-Sanches G, Childs B, Valle D. The effect of mendelian disease on human health. In: Scriver CH, editores. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill; 2001. p. 67-174.

Gönenç S, Uysal N, Açıkgöz O, Kayatekin BM, Sönmez A, Kiray M, Aksu I, Güleçer B, Topçu A, Şemin I. Effects of Melatonin on Oxidative Stress and Spatial Memory Impairment Induced by Acute Ethanol Treatment in Rats. *Physiol. Res.* 2005; 54: 341-348.

González-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 10:93–100.

Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr: Top Med Chem.* 2002; 2: 167-179.

Guire PJ, Parikh A, Diaz AG. Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism* 98 (2009) 173-180.

Halliwell B, Gutteridge JMC. In: *Free radicals in biology medicine.* Oxford University Press Inc. N.Y. 3th ed, 1999.

Halliwell B, Gutteridge MC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4a ed. New York, Oxford University Press Inc., 2007. 540p.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231-55.

Halliwell B. Antioxidant in human health and disease. *Annu Rev Nutr .* 1996; 16: 33-50.

Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 344:721–724

Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci.* 2011; 32(3):125-30.

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 2001; 18:685–716.

Halliwell B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 75:637–44.

Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev*. 1993;17(3):347-57.

Hardeland, R. New actions of melatonin and their relevance to biometeorology. *Int. J. Biometeorol*. 1997; 41 (2): 47-57.

Hardeland R (2010). Melatonin metabolism in the central nervous system. *Current Neuropharmacology*, 8(3), 168–181

Herber S, Schwartz IVD, Nalin T, Netto CBO, Junior JSC, Santos ML, Ribeiro EM Schüler-Faccini L, Souza CFM. Maple syrup urine disease in Brazil: a panorama of the last two decades. *Jornal de Pediatria*. 2015; 91 (3): 292-298.

Hevia D, González-Menéndez P, Quiros-González I, et al. Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer. *J Pineal Res*. 2015;58:234-250.

Karam SM, Schawartz IV, Giugliani R. Introdução e aspectos clínicos. In: Carakushansky G. *Doenças genéticas na pediatria*. 2001; 155-158.

Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa, S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res*. 2001; 488:65-76.

Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci*. 2007; 32:44–50. doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.003

Kotler, M., Rodriguez, C., Sainz, R. M., Antolin, I. and Menendez-Pelaez, A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J. Pineal Res*. 1998; 24: 83-89.

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem resToxicol*. 1992; 5: 227-231.

Lepage N, McDonald N, Dallaire L, Lambert M. Age-specific distribution of plasma aminoacid concentration in healthy pediatric population. *Clin Chem*. 1997; 43:2397-2402.

Lerner AB, Case JD, Takahashi D. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*. 1958; 80: 2057-2058.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J Pineal Res.* 2015;59:403-419.

Marin J, Rodriguez-Martinez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther.* 1997; 75(2): 111- 134.

Mathes AM. Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. *World J Gastroenterol.* 2010;16:6087-6097.

Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol.* 2005; 165: 139-149.

Mazariegos GV, Morton DH, Sindhi R, Soltys K, Nayyar N, Bond G, Shellmer D, Shneider B, Vockley J, Strauss KA. Liver transplantation for classical maple syrup urine disease: long-term follow-up in 37 patients and comparative United Network for Organ Sharing experience. *Pediatr.* 2012; 160:116-121.

Melchiorri D, Reiter RJ, Sewerynek E, Hara M, Chen L, Nisticò G. Paraquat toxicity and oxidative damage: reduction by melatonin. *Biochem Pharmacol.* 1996;51:1095-1099

Menendez-Pelaez A, Poeggeler B , Reiter RJ , L Barlow-Walden , Pablos MI , Tan DX . Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J. Cell. Biochem.* 1993; 53 (4): 373-82.

Menendez-Pelaez, A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res.* 1993; 15 (2): 59-69.

Menkes JH, Hurst PL, Craig JM. A new syndrome: Progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics.* 1954; 14:462.

Menkes JH. Maple syrup urine disease. Isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics.* 1959; 23:348-353.

Mescka CP, Rosa AP, Schirmbeck G, da Rosa TH, Catarino F, de Souza LO, Guerreiro G, Sitta A, Vargas CR, Dutra-Filho CS. L-carnitine Prevents Oxidative Stress in the Brains of Rats Subjected to a Chemically Induced Chronic Model of MSUD. *Mol Neurobiol.* 2016; 53(9): 6007-6017.

Mescka CP, Rosa AP, Schirmbeck G, Rosa TH, Catarino F, Souza LO, Guerreiro G, Sitta A, Vargas CR, Dutra-Filho CS. L-carnitine Prevents Oxidative Stress in the

Brains of Rats Subjected to a Chemically Induced Chronic Model of MSUD. *Mol Neurobiol* DOI. 2015; 10.1007/s12035-015-9500-z.

Mescka CP, Wayhs CA, Guerreiro G, Manfredini V, Dutra-Filho CS, Vargas CR. Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro. *Gene*. 2014 Sep 15;548(2):294-8. doi: 10.1016/j.gene.2014.07.051. Epub 2014 Jul 18.

Mescka CP, Wayhs CA, Vanzin CS, Biancini GB, Guerreiro G, Manfredini V, Souza C, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas CR. Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: l-carnitine effect. *Int. J. Devl Neuroscience*. 2013; 31 (1): 21–24.

Majidinia M, Sadeghpour A, Mehrzadi S, Reiter RJ, Khatami N, Yousefi B. Melatonin: A pleiotropic molecule that modulates DNA damage response and repair pathways. *J. Pineal Res*. 2017;63:e12416.

Montilla, P., Tunez, I., MunÄoz, M. C., Soria, J. V. and Lopez, A. Antioxidative effect of melatonin in rat brain oxidative stress induced by adriamycin. *J. Physiol. Biochem*. 1997; 53 (3): 301-306.

Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, Puffenberger EG, Kelley RI. Diagnosis and treatment of maple syrup urine disease: a study of 36 patients. *Pediatrics*. 2002; 109:999-1008.

Orhan HG, Karaaslan C, Ozcan S, Firuzi O, Tavakkoli M, Saso L, Suzen S. Novel indole-based melatonin analogues: Evaluation of antioxidant activity and protective effect against amyloid β -induced damage. *Boorganic & Medicinal Chemistry*. 2016;24: 1658–166.

Ostjen CA, Rosa CGS, Hartmann RM, Schemitt EG, Colares JR, Marroni NP. Anti-inflammatory and antioxidant effect of melatonin on recovery from muscular trauma induced in rats. *Exp Mol Pathol*. 2018; 106:52-59. doi: 10.1016/j.yexmp.2018.12.001.

Parisotto EB, Vidal V, García-Cerro S, Lantigua S, Wilhelm Filho D, Sanchez-Barceló EJ, Martínez-Cué C, Rueda N. Chronic Melatonin Administration Reduced Oxidative Damage and Cellular Senescence in the Hippocampus of a Mouse Model of Down Syndrome. *Neurochem Res*. 2016;41(11):2904-2913

Peinemann F, Danner DJ. Maple syrup urine disease 1954-1993. *J Inher Metab Dis*. 1994; 17:3-15.

Poeggeler B, Reiter RJ, Hardeland R, Tan DX, Barlow-Walden LR. Melatonin and structurally-related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers in vitro. *Redox Report*. 1996; 2 (3): 179-84. doi: 10.1080 / 13510002.1996.11747046.

Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR. Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron

donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;738:419-20.

Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Siu AW, Garcia JJ. Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium (III) and H₂O₂: protection by melatonin and related molecules. *J Pineal Res.* 2000;29:54-61

Raghavendra V, Kulkarni SK: Possible antioxidant mechanism in melatonin reversal of aging and chronic ethanol-induced amnesia in plus-maze and passive avoidance memory tasks. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30: 595- 602.

Ramon L, Jauregui I. Enfermedad de jaraqui de arce: una entidad rara que debemos recordar. A propósito de su manejo dietético. *An Med Interna. Madrid.* 2005; 22 (10): 493-497.

Rao, K.S. Mechanisms of disease: DNA repair defects and neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007. 3(3):162-72.

Reed LJ, Hackert ML. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *J Biol Chem.* 1990; 265:8971- 8974.

Reiter R. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Braz J Med Biol Res.* 1993;26:1141-1155.

Reiter R. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Braz J Med Biol Res.* 1993;26:1141-1155.

Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res.* 2016;61:253-278.

Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden LR, Chuang JI, Ortiz GG, Acuña Castroviejo-D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.* 1995 Jan; 18 (1): 1-11.

Reiter RJ, Tan D-X, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci.* 2000;7:444-458.

Reznick AZ, Packer L (1993) Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU (eds) *Free radicals: from basic science to medicine.* Birkhäuser Verlag, Basel, pp 425–437

Rieger E, de Franceschi ID, Preissler T, Wannmacher CMD. Neuroprotective Effect of Creatine and Pyruvate on Enzyme Activities of Phosphoryl Transfer Network and Oxidative Stress Alterations Caused by Leucine Administration in Wistar Rats. *Neurotox Res.* 2017; 32 (4): 575-584. doi: 10.1007 / s12640-017-9762-5.

Rittinger O, Bachmann C, Irrnberger T, Pilz P, Walter GF, Wendel U, Plöchl E. [The intermediate form of maple syrup disease]. *Klin Padiatr.* 1986;198(1):37-43.

Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004; 36 (1): 1-9.

Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004; 36 (1): 1-9.

Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36:1–9.

Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler C, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *v. 47 – no.1 – jan./mar. 2010.*

Scaini G, Jeremias IC, Morais MO, Borges GD, Munhoz BP, Leffa DD, Andrade VM, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. DNA damage in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab.* 2012 Jun;106(2):169-74. doi: 10.1016/j.ymgme.2012.04.009.

Schneider C, Oliveira A. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte.* 2004;10:308-13.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8 ed. New York: McGrawHill Inc, 2001. p. 3-45.

Scriver CR. Garrod's Croonian Lectures (1908) and the charter "Inborn Errors of Metabolism": Albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008. *J Inher Metab Dis.* 2008;31:580-98.

Serra JD, Sánchez FA, Visus FSV. "Enfermedades de orina de jarabe arce". In: Sanjurjo P, Baldellou A. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 3a ed. Madrid: Eddiciones Ergon. 2010. 1332 p.

Shieh JM, Wu HT, Cheng KC, & Cheng JT (2009). Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKCzeta-Akt-GSK3beta pathway in hepatic cells. *Journal of Pineal Research*, 47(4), 339–344.

Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance. 2003.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988. 175:184-191.

Sitta A, Ribas GS, Mescka CP, Barschak AG, Wajner M, Vargas CR. Neurological Damage in MSUD: The Role of Oxidative Stress. 2013; *Cell Mol Neurobiol* (2014) 34:157–165.

Sitta, A. et al. Neurological Damage in MSUD: The Role of Oxidative Stress. *Cell Mol Neurobiol.* 2014. 34:157–165.

Snyderman SE, Norton PM. Roitman E. Maple Syrup Urine Disease with particular reference to diet therapy. *Pediatrics.* 1964; 34:452- 472.

Souza CFM, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciênc Saúde Coletiva.* 2002; 7:129-137.

Stasica, P., Ulanski, P. and Rosiak, J. M. Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. *J. Pineal Res.* 1998; 25 (1): 65-6.

Strauss KA, Puffenberger EG, Morton DH. Maple syrup urine disease. In: Pagon R, Bird T, Dolan C, Stephens K, Adam M, editores. *GeneReviews.* Seattle, Washington, USA: University of Washington, 2006.

Strauss KA, Wardley B, Robinson D, Hendrickson C, Rider NL, Puffenberger EG, Shellmer D, Moser AB, Morton DH. Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design. *Mol Genet Metab.* 2010; 99: 333- 345.

Streck EL, Vieira OS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis.* 2003; 18:147–154.

Tan DX, Manchester LC, Terron M P, Flores LJ, & Reiter RJ (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *Journal of Pineal Research*, 42(1), 28–42.

Tan, DX, Hardeland R, Manchester LC, Paredes SD, Korkmaz A, Sainz R M, Reiter RJ (2010). The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 85(3), 607–623.

Tan D-X, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. *Molecules.* 2015;20:18886-18906.

Taschetto L, Scaini G, Zapelini HG, Ramos ÂC, Strapazzon G, Andrade VM, Réus GZ, Michels M, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. Acute and long-term effects of intracerebroventricular administration of α -ketoisocaproic acid on oxidative stress parameters and cognitive and noncognitive behaviors. *Metab Brain Dis.* 2017; 32(5): 1507-1518.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and an in vivo genetic toxicological testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000. 35:206-21 Walterfang M,

Bonnot O, Mocellin R, Velakoulis D. The neuropsychiatry of inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2013; 36 (4): 687–702.

Treacy E, Clow CL, Reade TR, Chitayat D, Mamer OA, Scriver CR. Maple syrup urine disease: interrelationship between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *J Inherit Metab Dis*. 1992; 15: 121–135.

Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR et al. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1688:26–32.

Wang ML, Wei CH, Wang WD, Wang JS, Zhang J, Wang JJ. Melatonin attenuates lung ischaemia-reperfusion injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2018. [Epub ahead of print].

Wei Z, Gao T, Liang B, Zhao Q, Ma F, Li C. Effects of Exogenous Melatonin on Methyl Viologen-Mediated Oxidative Stress in Apple Leaf. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(1).

Wendel U, Baulny HO. Branched-Chain Organic Acidurias/Acidemias. In: Fernandes J, Saudubray JM, Berghe GV, editores. *Inborn Metabolic diseases*. 2006; 3: 247-251.

Westall RG, Dancis J, Miller S. Maple syrup urine disease. *Am J Dis Child*. 1957; 94: 571-572.

Yeaman SJ. The mammalian 2-oxoacid dehydrogenases: a complexes in primary biliary cirrhosis. *Trends Biochem Sci*. 1986;11(1):293-6.

Zhang B, Edenberg HJ, Crabb DW, Harris RA. Evidence for both a regulatory mutation and a structural mutation in a family with maple syrup urine disease. *J Clin Invest*. 1989;83(4):1425-9.

ANEXO

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de parâmetros neuroquímicos da sinalização colinérgica e comportamento do tipo ansioso em peixe-zebra submetidos à altas doses de aminoácidos de cadeia ramificada.", registrada com o protocolo nº 030/2017-1, sob a responsabilidade de Emilio Luiz Streck, junto à equipe: Leticia Burato Wessler, Naithan Ludian Fernandes Costa, Eduardo Pacheco Rico, Jotele Fontana Agostini Berteli, Karine Medeiros Vieira, Helena Cristina Zuehl Dal Toé, Samira Leila Baldin, Marcel Marcos Machado - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 02/05/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	22/05/2017 a 19/03/2018
Espécie/linhagem/raça	Peixe Danio rerio
Nº de animais	522
Idade/Peso	4 meses / 400-500 mg
Gênero	Masculino (261) Feminino (261)
Origem	Biotério UFRGS

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:

Project title: "Evaluation of neurochemical parameters about cholinergic signaling and anxiety-like behavior in zebrafish submitted to high doses of branched chain amino acids."


Protocol number: 030/2017-1

Principal Investigator: Emilio Luiz Streck

Researchers: Leticia Burato Wessler, Naithan Ludian Fernandes Costa, Eduardo Pacheco Rico, Jotele Fontana Agostini Berteli, Karine Medeiros Vieira, Helena Cristina Zuehl Dal Toé, Samira Leila Baldin, Marcel Marcos Machado.

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/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 02 de maio de 2017.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA