

**TRATAMENTO COM ANTIOXIDANTES PREVINE O PREJUÍZO DE MEMÓRIA
EM UM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO**

Brena P. Teodorak^{1,2}, Emilio L. Streck^{1,2*}

*¹Laboratório de Bioenergética, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil*

*²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Porto
Alegre, RS, Brazil*

*Correspondence author: Prof. Emilio L. Streck, Laboratório de Bioenergética,
Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105, Criciúma, 88806-000,
SC, Brazil. Telephone: + 55 48 3431 2539. Fax: +55 48 3431 2644.
E-mail: emiliostreck@gmail.com

Resumo

A doença da urina do xarope do bordo (DXB) é uma alteração metabólica autossômica recessiva resultante da deficiência do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada; este bloqueio causa o acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina (Leu), isoleucina (Ileu) e valina (Val), bem como seus correspondentes α -cetoácidos de cadeia ramificada. Considerando que os pacientes com DXB apresentam disfunção neurológica e comprometimento cognitivo o presente estudo teve como objetivo determinar a influência dos altos níveis de AACR (Leu, Ileu, Val) na aquisição e retenção de memória aversiva em ratos jovens e a influência da administração concomitante de N-Acetilcisteína (NAC) e deferoxamina (DFX) sobre as alterações comportamentais provocadas pelo tratamento com AACR. Nossos resultados demonstraram que animais submetidos à administração de AACR apresentaram um déficit tanto na memória de curta, como de longa duração quando comparado ao grupo controle, confirmando que ocorre prejuízo de memória no grupo DXB. Usando o protocolo SHIRPA demonstramos que os animais submetidos à administração do *pool* de AACR não apresentaram comprometimento no estado neuropsiquiátrico, tônus muscular e força e função autônoma. Neste contexto, alterações na atividade motora ou emotividade provavelmente não contribuem para o comprometimento da memória causado pela administração do *pool* de AACR. Além disso, os efeitos comportamentais apresentados pelos animais submetidos à administração de AACR foram impedidos pela coadministração de NAC mais DFX, sugerindo que o déficit cognitivo provocado pelos AACR pode ser causado por uma possível associação entre os radicais livres / dano oxidativo e o déficit cognitivo na DXB.

Palavras-chaves Doença da urina do xarope do bordo; aminoácidos de cadeia ramificada; tratamento antioxidante; comprometimento cognitivo

1. Introdução

Doença da urina do xarope do bordo (DXB) é uma doença metabólica autossômica recessiva resultante de uma deficiência no complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR) (Chuang and Shih, 2001), este bloqueio causa o acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina (Leu), isoleucina (Ileu), valina (Val), bem como dos seus correspondentes α -cetoácidos de cadeia ramificada (CACR) em tecidos e fluidos corporais. (Chuang and Shih, 2001; Treacy et al. 1992). Pacientes com DXB apresentam sintomas como convulsões, cetoacidose, apnéia, hipoglicemia, coma, ataxia, retardo psicomotor e mental. Além disso, apresentam alterações neuropatológicas, edema cerebral, atrofia dos hemisférios cerebrais e baixa densidade da massa branca correspondendo a hipomielinização (Chuang et al. 2001; Schönberger et al. 2004; Treacy et al. 1992).

Embora as sequelas neurológicas estejam presentes na maioria dos pacientes com DXB, os mecanismos subjacentes a neurotoxicidade desta doença são pouco conhecidos. Neste contexto, demonstrou-se que os metabólitos acumulados na DXB podem causar alterações significativas nas concentrações dos neurotransmissores glutamato, aspartato e ácido gama-aminobutírico (GABA) no cérebro (Dodd et al. 1992; Prensky and Moser, 1967; Tavares et al. 2000; Yudkoff et al. 1994), e este comprometimento pode estar relacionado com a redução da captação cerebral de aminoácidos essenciais (Araújo et al. 2001). Do mesmo modo, estes metabólitos afetam o metabolismo energético no cérebro de ratos (Danner and Elsas, 1989; Halestrap et al. 1974;

Land et al. 1976; Pilla et al. 2003; Yudkoff et al. 1994), e induzem o estresse oxidativo (Bridi et al. 2005a, 2005b, 2003; Fontella et al. 2002).

Portanto, a presente investigação foi realizada para determinar a influência dos altos níveis de AACR (Leu, Ileu, Val) na aquisição e retenção da memória aversiva em ratos jovens. Para essa finalidade, usamos um modelo quimicamente induzido de DXB. Uma vez que observações anteriores sugerem que o estresse oxidativo pode estar envolvido na fisiopatologia da disfunção neurológica da DXB (Fontella et al. 2002; Bridi et al. 2005a, 2005b, 2003), nós também investigamos a influência da administração concomitante da N-Acetilcisteína (NAC) e deferoxamina (DFX) sobre as alterações comportamentais provocadas pelo tratamento com AACR, a fim de avaliar se as espécies reativas de oxigênio poderiam estar implicadas nessas alterações e se a administração de antioxidantes seria capaz de proteger o desempenho de ratos nessa tarefa.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Ratos Wistar foram obtidos através do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Eles foram acondicionados em grupos de cinco, com livre acesso a água e comida, em um ciclo claro-escuro de 12h (luzes acessas às 7:00), a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Instituto Nacional para o cuidado e uso de animais de laboratório e da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, com a aprovação do comitê de ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense (protocolo número 60/2010).

2.2. Administração aguda do *pool* de AACR

Os animais receberam três administrações por via subcutânea (com intervalo de 1 h entre as administrações) do *pool* de AACR (15.8 µL/g de peso corporal) contendo leucina 190 mmol/L, isoleucina 59 mmol/L e valina 69 mmol/L em solução salina (0.85% NaCl) ou salina (grupo controle) O *pool* de aminoácidos de cadeia ramificada e solução salina foram administrados em ratos jovens (30 dias) com n=12 (Bridi et al. 2006). Uma hora após a última administração, os animais foram submetidos a testes comportamentais.

2.3. Administração crônica do *pool* de AACR e tratamento com antioxidantes

Os animais foram divididos em três grupos: 1) controle (salina); 2) DXB (induzido pelo *pool* de AACR); 3) DXB tratado com uma combinação de NAC (20 mg/kg) mais DFX (20 mg/kg). Os animais receberam duas administrações por via subcutânea (com intervalo de 12h entre elas) do *pool* de AACR (15.8 µL/g de peso corporal) contendo leucina 190 mmol/L, isoleucina 59 mmol/L e valina 69 mmol/ em solução salina (0.85% NaCl) a partir do 7 dia de vida, duas vezes por dia durante 21 dias (última injeção no 27º dia) (Bridi et al. 2006) (n=12). NAC foi administrada por via subcutânea duas vezes ao dia (12h de intervalo uma da outra) e DFX uma vez a cada dois dias durante 21 dias (Di-Pietro et al. 2008).

2.4. Teste SHIRPA

O SHIRPA (*SmithKline/Harwell/ImperialCollege/RoyalHospital/Phenotype Assessment*) foi concebido como uma bateria de múltiplos testes usados para estudos longitudinais com diretrizes e materiais padronizados (Rogers et al. 1997). O quadro primário de SHIRPA consiste em uma série de observações, reflexos e funções básicas

sensório-motoras que fornece um perfil funcional e comportamental pela observação avaliativa do desempenho individual. O protocolo de SHIRPA foi usado para avaliar mudanças comportamentais durante o curso da DXB. Para o propósito de análise, os parâmetros individuais avaliados pelo SHIRPA foram agrupados em cinco categorias funcionais (estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autonômica, tônus e força muscular; reflexo e função sensorial) de acordo com Lackner et al. (2006), determinando uma contagem global e cinco domínios de contagem. O reflexo e domínio sensorial envolvem o posicionamento visual, reflexo auricular, reflexo corneal, pressão no dedo da pata, e reflexo de endireitamento. O estado neuripsiquiátrico envolve atividade espontânea, excitação de transferência, escape ao toque, passividade posicional, medo, irritabilidade, mordida e vocalização. O comportamento motor envolve atividade locomotora, posição corporal, tremores, maneira de andar, elevação pélvica, elevação da cauda, ondulação do tronco, manobra do arame, agarramento dos membros, e geotaxia negativa. Função autonômica envolve ritmo respiratório, fechamento da pálpebra, irritação cutânea, cor da pele, ritmo cardíaco, lacrimejamento e salivagem. Envolve tônus muscular e força, tônus corporal, tônus dos órgãos, e tônus abdominal.

2.5. Teste de esquiva inibitória

Condicionamento de esquiva inibitória é um modelo bem estabelecido de memória em ratos. O aparelho de esquiva inibitória consiste em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de aço inoxidável (1mm diâmetro), com espaços entre as barras de 1cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e, 2,5 cm de comprimento foi colocada junto a parede esquerda do aparelho. Na sessão de treino, os animais foram

colocados sobre a plataforma e com um dispositivo automatizado mediu o tempo que o animal levou para descer com as quatro patas da plataforma. Esse tempo é denominado latência (Quevedo et al. 1997, 1999; Roesler et al. 2004). Imediatamente após descer da plataforma, o animal recebe um choque de 0,6 mA durante 1 segundo. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e mediu-se o tempo que ele levou para descer (latência), porém não foi administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Os intervalos entre o treino e o teste foram de 1,5 horas para medir memória de curta duração (Bevilaqua et al. 2003; Izquierdo et al. 1998). E 24 horas para memória de longa duração (Izquierdo et al. 1998; Quevedo et al. 1997, 1999; Roesler et al. 2004).

2.6. Análises estatísticas

Testes t pareados foram aplicados quando comparados os grupos expostos a duas condições diferentes. Comparações entre os três grupos foram feitas através análise de variância de uma via (ANOVA). Quando o valor de F for significativo, foram feitas comparações entre os grupos pelo teste de Tukey, os dados são apresentados na forma de média \pm erro da média padrão. Como as variáveis em análise do teste de esquila inibitória não seguem uma distribuição normal e sua variância não cumpriu o pressuposto de homocedasticidade, esses dados foram apresentados usando mediana e intervalo interquartil e foram analisados pelo teste não-paramétrico, Mann-Whitney U. As diferenças entre os grupos foram classificadas como significativas com $P < 0.05$. Todas as análises foram realizadas em um computador compatível com IBM PC utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

3. Resultados

Inicialmente, nós investigamos se a administração aguda e crônica do *pool* de AACR causaria prejuízo comportamental. Figura 1 e 2, respectivamente, ilustram o desempenho dos ratos Wistar após a administração aguda e crônica do pool de AACR ou salina (grupo de controle) nas cinco categorias funcionais distintas: reflexo e função sensorial, estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autônoma, tônus muscular e força. O resultado da soma de todas as categorias funcionais é demonstrado no gráfico “Total”. Não houve diferença significativa entre os grupos no reflexo e função sensorial, comportamento motor, estado neuropsiquiátrico e tônus muscular, quando comparado com o grupo de controle.

Em seguida, foi investigado se a administração aguda do *pool* de AACR iria induzir mudanças na consolidação de memória aversiva. A figura 3 mostra que não houve diferença significativa no tempo de latência entre os grupos durante o treinamento, em ratos submetidos à administração aguda do pool de AACR. No entanto, observamos uma diferença estatisticamente significativa na memória aversiva de curto e longo prazo, quando comparado com o grupo controle.

Finalmente, investigamos o efeito da administração crônica do pool de AACR e a influência da administração concomitantemente de NAC e DFX sobre as mudanças na consolidação da memória provocada pela administração de AACR. Nenhuma diferença foi demonstrada entre os grupos na sessão de treinamento. Na sessão teste, o tempo de latência foi significativamente menor quando comparado com o grupo controle, e esta alteração foi

prevenida com o uso de NAC e DFX após a administração crônica do pool de AACR (Figura 4).

4. Discussão

Pacientes com DXB geralmente apresentam um grau variável de disfunção neurológica cuja fisiopatologia é escassamente conhecida. Contudo, vários estudos demonstram ação neurotóxica decorrente do acúmulo de AACR em diferentes parâmetros bioquímicos (Branco et al. 2000; Funchal et al., 2002, 2004a, 2004b; Pessoa-Pureur et al. 2002; Sgaravatti et al. 2003). Além disso, esses metabólitos competem com glutamato pela glutamato descarboxilase (Tashian, 1961), induzem o estresse oxidativo e a apoptose (Bridi et al. 2005a, 2005b; Fontella et al. 2002; Jouvét et al. 2000). No presente estudo nós avaliamos os efeitos dos metabólitos acumulando na DXB no cérebro de ratos em desenvolvimento (7-28 dias de vida, um grande período de proliferação celular e sinaptogênese em várias estruturas cerebrais envolvidas no aprendizado/memória), através de um modelo quimicamente induzido.

Nossos resultados mostraram que a exposição aguda ao *pool* de AACR produz prejuízo na memória aversiva de curta e longa duração através do treinamento na esquiiva inibitória. Além disso, a administração crônica do *pool* de AACR também altera a retenção em longo prazo independentemente da aquisição de memória. Utilizando o protocolo SHIRPA o qual determina diversas funções do sistema nervoso central, nós demonstramos que os animais submetidos à administração aguda e crônica do *pool* de AACR não apresentaram prejuízos no estado neuropsiquiátrico, tônus muscular e força, e na função

autônoma. Neste contexto, alterações da atividade motora ou emocional provavelmente não contribuíram para o prejuízo da memória causado pela administração do *pool* de AACR.

Apesar do exato mecanismo através do qual os AACR alteram a memória em ratos ainda ser desconhecido, evidências da literatura mostraram que o estresse oxidativo está associado com o déficit de memória (Bickford et al. 1999; da Silva et al. 2004; Serrano e Klann, 2004), e que a administração dos agentes antioxidantes são alternativas para melhorar tais déficits (Carney et al. 1991; Carrillo et al. 1993; Kontush, 2001; Knoll et al. 1994; Markesbery, 1997; Small, 1998). Vários estudos evidenciam que um possível mecanismo para o prejuízo, idade-dependente, na potenciação de longo prazo (LTP) através da IL-1 β e ERO envolve o aumento da c-Jun N-terminal quinase (JNK) e proteínas quinases p38 ativada por mitógeno, e a diminuição no ERK resultante na inibição de liberação de glutamato (Kelly et al. 2001, 2003; Lynch, 1998; Martin et al. 2002; McGahon et al. 1999; O'Donnell et al. 2000; Vereker et al. 2000, 2001). Neste contexto, considerando que os metabólitos acumulados na DXB induzem o estresse oxidativo (Bridi et al. 2005a, 2005b; Fontella et al. 2002), nós também investigamos se a geração de radicais livres poderia estar envolvida com o prejuízo de memória causado pelos AACR no teste de esquiva inibitória. Corroborando esta hipótese, o mesmo protocolo de tratamento antioxidante impediu o déficit de memória, e este efeito positivo da terapia antioxidante poderia ser atribuído à troca do *pool* de antioxidante, o qual evita a geração de radical hidroxila - com o DFX, um quelante de ferro - e redução de ROS - com a ação de NAC (Ritter et al. 2004).

Esses resultados sugerem que durante as crises de descompensação metabólica, como observado em pacientes com DXB não tratados, quando o cérebro é exposto às altas

concentrações de AACR (a concentrações millimolares) e metabólitos cognatos, vários mecanismos destrutivos podem ser acionados. Mais importante, os efeitos comportamentais mostrados pelos animais tratados com AACR na tarefa de memória aversiva foram impedidos pela co-administração de NAC e DFX, um *sequestrador* de radical livre, sugerindo que o prejuízo na cognição provocado pelos AACR pode ser causado pelo dano oxidativo no cérebro e pela possibilidade de associação entre os radicais livres/dano oxidativo e o prejuízo cognitivo em DXB. Tomadas em conjunto todas estas observações, nós levantamos a hipótese de que o estresse oxidativo deve ser considerado como um importante mecanismo fisiopatológico de danos teciduais subjacentes em pacientes com DXB.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada por concessões do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Araújo, P., Wassermann, G.F., Tallini, K., Furlanetto, V., Vargas, C.R., Wannmacher, C.M., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T., Wajner, M., 2001. Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem Int* 38, 529–537.
- Bevilaqua, L.R., Kerr, D.S., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M., 2003. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci* 17, 897-902.
- Bickford, P.C., Shukitt-Hale, B., Joseph, J., 1999. Effects of aging on cerebellar noradrenergic function and motor learning: nutritional interventions. *Mech Ageing Dev* 111, 141-154.
- Branco, T., Meirelles, R., da Rocha, B.B., de Mattos-Dutra, A., Wajner, M., Pessoa-Pureur, R., 2000. Alpha-ketoisocaproate increases the in vitro ³²P incorporation into intermediate filaments in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11, 3545–3350.
- Bridi, R., Araldi, J., Sgarbi, M.B., Testa, C.G., Durigon, K., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., 2003. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Dev Neurosci* 21, 327–332.
- Bridi, R., Braun, C.A., Zorzi, G.K., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Lissi, E.G., Dutra-Filho, C.S., 2005a. Alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defences in cerebral cortex from young rats. *Met Brain Dis* 20, 155–167.

- Bridi, R., Latini, A., Braun, C.A., Zorzi, G.K., Wajner, M., Lissi, E.G., Dutra-Filho, C.S., 2005b. Evaluation of the mechanisms involved in leucine induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic Res* 39, 71–79.
- Bridi, R., Fontella, F.U., Pulrolnik, V., Braun, C.A., Zorzi, G.K., Coelho, D., Wajner, M., Vargas, C.R., Dutra-Filho, C.S., 2006. A chemically-induced acute model of maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies. *J Neurosci Methods* 155, 224-230.
- Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Landum, R.W., Cheng, M.S., Wu, J.F., Floyd, R.A., 1991. Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3633-3636.
- Carrillo, M.C., Kanai, S., Sato, Y., Nokubo, M., Ivy, G.O., Kitani, K., 1993. The optimal dosage of (-) deprenyl for increasing superoxide dismutase activities in several brain regions decreases with age in male Fischer 344 rats. *Life Sci* 52, 1925-1934.
- Chuang, D.T., Shih, V.E., 2001. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria), in: Scriver, C.R., Beaudt, A.L., Sly, W.L., Valle, D. (Eds), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 1971-2005.
- da Silva, A.L., Piato, A.L., Bardini, S., Netto, C.A., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2004. Memory retrieval improvement by *Ptychopetalum olacoides* in young and aging mice. *J Ethnopharmacol* 95, 199-203.

- Danner, D.J., Elsas, L.J., 1989. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism, in: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 671-692.
- Di-Pietro, P.B., Dias, M.L., Scaini, G., Burigo, M., Constantino, L., Machado, R.A., Dal-Pizzol, F., Streck, E.L., 2008. Inhibition of brain creatine kinase activity after renal ischemia is attenuated by N-acetylcysteine and deferoxamine administration. *Neurosci Lett* 434, 139-143.
- Dodd, P.R., Williams, S.H., Gundlach, A.L., Harper, P.A., Healy, P.J., Dennis, J.A., Johnston, G.A., 1992. Glutamate and γ -aminobutyric acid neurotransmitter systems in the acute phase of maple syrup urine disease and citrullinemia encephalopathies in newborn calves. *J Neurochem* 59, 582-590.
- Fontella, F.U., Gassen, E., Pulrolni, V., Wannmacher, C.M.D., Klein, A.B., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., 2002. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 17, 47-54.
- Funchal, C., de Lima Pelaez, P., Loureiro, S.O., Vivian, L., Dall Bello Pessutto, F., de Almeida, L.M., Tchernin Wofchuk, S., Wajner, M., Pessoa Pureur, R., 2002. Alpha-ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediate filaments in postnatal rat cortical slices through ionotropic glutamatergic receptors. *Brain Res Dev Brain Res* 139, 267-276.
- Funchal, C., Dall Bello Pessutto, F., de Almeida, L.M., de Lima Pelaez, P., Loureiro, S.O., Vivian, L., Wajner, M., Pessoa-Pureur, R., 2004a. Alpha-keto-beta-methylvaleric acid increases the in vitro phosphorylation of intermediate filaments in cerebral cortex of young rats through the gabaergic system. *J Neurol Sci* 217, 17- 24.

- Funchal, C., Rosa, A.M., Wajner, M., Wofchuk, S., Pureur, R.P., 2004b. Reduction of glutamate uptake into cerebral cortex of developing rats by the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res* 29, 747–753.
- Halestrap, A.P., Brand, M.D., Denton, R.M., 1974. Inhibition of mitochondrial pyruvate transport by phenylpyruvate and α -ketoisocaproate. *Biochem Biophys Acta* 367, 102–108.
- Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello, E., Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A., Medina, J.H., 1998. Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393, 635–636.
- Jouvet, P., Rustin, P., Taylor, D.L., Pocock, J.M., Felderhoff-Mueser, U., Mazarakis, N.D., Sarraf, C., Joashi, U., Kozma, M., Greenwood, K., Edwards, A.D., Mehmet, H., 2000. Branched Chain Amino Acids Induce Apoptosis in Neural Cells without Mitochondrial Membrane Depolarization or Cytochrome c Release: Implications for Neurological Impairment Associated with Maple Syrup Urine Disease. *Mol Biol Cell* 11, 1919–1932.
- Kelly, A., Lynch, A., Vereker, E., Nolan, Y., Queenan, P., Whittaker, E., O'Neill, L.A., Lynch, M.A., 2001. The anti-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-10, blocks the inhibitory effect of IL-1 beta on long term potentiation. A role for JNK. *J Biol Chem* 276, 45564–45572.
- Kelly, A., Vereker, E., Nolan, Y., Brady, M., Barry, C., Loscher, C.E., Mills, K.H., Lynch, M.A., 2003. Activation of p38 plays a pivotal role in the inhibitory effect of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta on long term potentiation in rat dentate gyrus. *J Biol Chem* 278, 19453–19462.

- Knoll, J., Yen, T.T., Miklya, I., 1994. Sexually low performing male rats die earlier than their high performing peers and (-)-deprenyl treatment eliminates this difference. *Life Sci* 54, 1047–1057.
- Kontush, A., 2001. Amyloid-beta, an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radical Biological Medicine* 31, 1120–1131.
- Lackner, P., Beer, R., Heussler, V., Goebel, G., Rudzki, D., Helbok, R., Tannich, E., Schmutzhard, E., 2006. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32, 177–188.
- Land, J.M., Mowbray, J., Clark, J.B., 1976. Control of pyruvate and L-hydroxybutyrate utilization in rat brain mitochondria and its relevance to phenylketonuria and maple syrup urine disease. *J Neurochem* 26, 823–830.
- Lynch, M.A., 1998. Age-related impairment in long-term potentiation in hippocampus: a role for the cytokine, interleukin-1 beta? *Prog Neurobiol* 56, 571–589.
- Markesbery, W.R., 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biol Med* 23, 134–147.
- Martin, D.S., Lonergan, P.E., Boland, B., Fogarty, M.P., Brady, M., Horrobin, D.F., Campbell, V.A., Lynch, M.A., 2002. Apoptotic changes in the aged brain are triggered by interleukin-1beta-induced activation of p38 and reversed by treatment with eicosapentaenoic acid. *J Biol Chem* 277, 34239–34246.
- McGahon, B., Maguire, C., Kelly, A., Lynch, M.A., 1999. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by arachidonic acid and trans-1-amino-cyclopentyl-1,3-

- dicarboxylate impacts on long-term potentiation in the dentate gyrus in the rat: analysis of age-related changes. *Neuroscience* 90, 1167–1175.
- O'Donnell, E., Vereker, E., Lynch, M.A., 2000. Age-related impairment in LTP is accompanied by enhanced activity of stress-activated protein kinases: analysis of underlying mechanisms. *Eur J Neurosci* 12, 345–352.
- Pessoa-Pureur, R., Funchal, C., de Lima Pelaez, P., Vivian, L., Oliveira Loureiro, S., de Freitas Miranda, R., Wajner, M., 2002. Effect of the branched-chain alpha-ketoacids accumulating in maple syrup urine disease on the high molecular weight neurofilament subunit (NF-H) in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis* 17, 65-75.
- Pilla, C., Cardozo, R.F., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T., Wajner, M., Wannmacher, C.M., 2003. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem Res* 28, 675–679.
- Prensky, A.L., Moser, H.W., 1967. Changes in the amino acid composition of proteolipids of white matter during maturation of the human nervous system. *J Neurochem* 14, 117–121.
- Quevedo, J., Vianna, M., Zanatta, M.S., Roesler, R., Izquierdo, I., Jerusalinsky, D., Quillfeldt, J.A., 1997. Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory. *Behav Pharmacol* 8, 713-717.
- Quevedo, J., Vianna, M.R., Roesler, R., De-Paris, F., Izquierdo, I., Rose, S.P., 1999. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 6, 600-607.

- Ritter, C., Andrades, M.E., Reinke, A., Menna-Barreto, S., Moreira, J.C., Dal-Pizzol, F., 2004. Treatment with n-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med* 32, 342-349.
- Roesler, R., Lessa, D., Venturella, R., Vianna, M.R., Luft, T., Henriques, J.A., Izquierdo, I., Schwartsmann, G., 2004. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci* 19, 1041-1045.
- Rogers, D.C., Fisher, E.M., Brown, S.D., Peters, J., Hunter, A.J., Martin, J.E., 1997. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome* 8, 711–713.
- Schonberger, S., Schweiger, B., Schwahn, B., Schwarz, M., Wendel, U., 2004. Demyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab* 82, 69–75.
- Serrano, F., Klann, E., 2004. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev* 3, 431-443.
- Sgaravatti, A.M., Rosa, R.B., Schuck, P.F., Ribeiro, C.A., Wannmacher, C.M., Wyse, A.T., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., 2003. Inhibition of brain energy metabolism by the alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 1639, 232-238.
- Small, G.W., 1998. Treatment of Alzheimer's disease, current approaches and promising developments. *Am J Med* 104, 32S–38S.

- Tashian, R.E., 1961. Inhibition of brain-glutamic decarboxylase by phenylalanine, valine, and leucine derivatives: a suggestion concerning the etiology of the neurological defect in phenylketonuria and branchedchain ketonuria. *Metabolism* 10, 393-402.
- Tavares, R.G., Santos, C.E.F., Tasca, C., Wajner, M., Souza, D.O., Dutra-Filho, C.S., 2000. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *J Neurol Sci* 181, 44–49.
- Treacy, E., Clow, C.L., Reade, T.R., Chitayat, D., Mamer, O.A., Scriver, C.R., 1992. Maple syrup urine disease: interrelationship between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *J Inherit Metab Dis* 15, 121–135.
- Vereker, E., O'Donnell, E., Lynch, M.A., 2000. The inhibitory effect of interleukin-1beta on long-term potentiation is coupled with increased activity of stress-activated protein kinases. *J Neurosci* 20, 6811–6819.
- Vereker, E., O'Donnell, E., Lynch, A., Kelly, A., Nolan, Y., Lynch, M.A., 2001. Evidence that interleukin-1beta and reactive oxygen species production play a pivotal role in stress-induced impairment of LTP in the rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 14, 1809–1819.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Lin, Z.P., Nissim, I., Stern, J., Pleasure, D., Nissim, I., 1994. Interrelationships of leucine and glutamate metabolism in cultured astrocyts. *J Neurochem* 62, 1192-1202.

Figuras

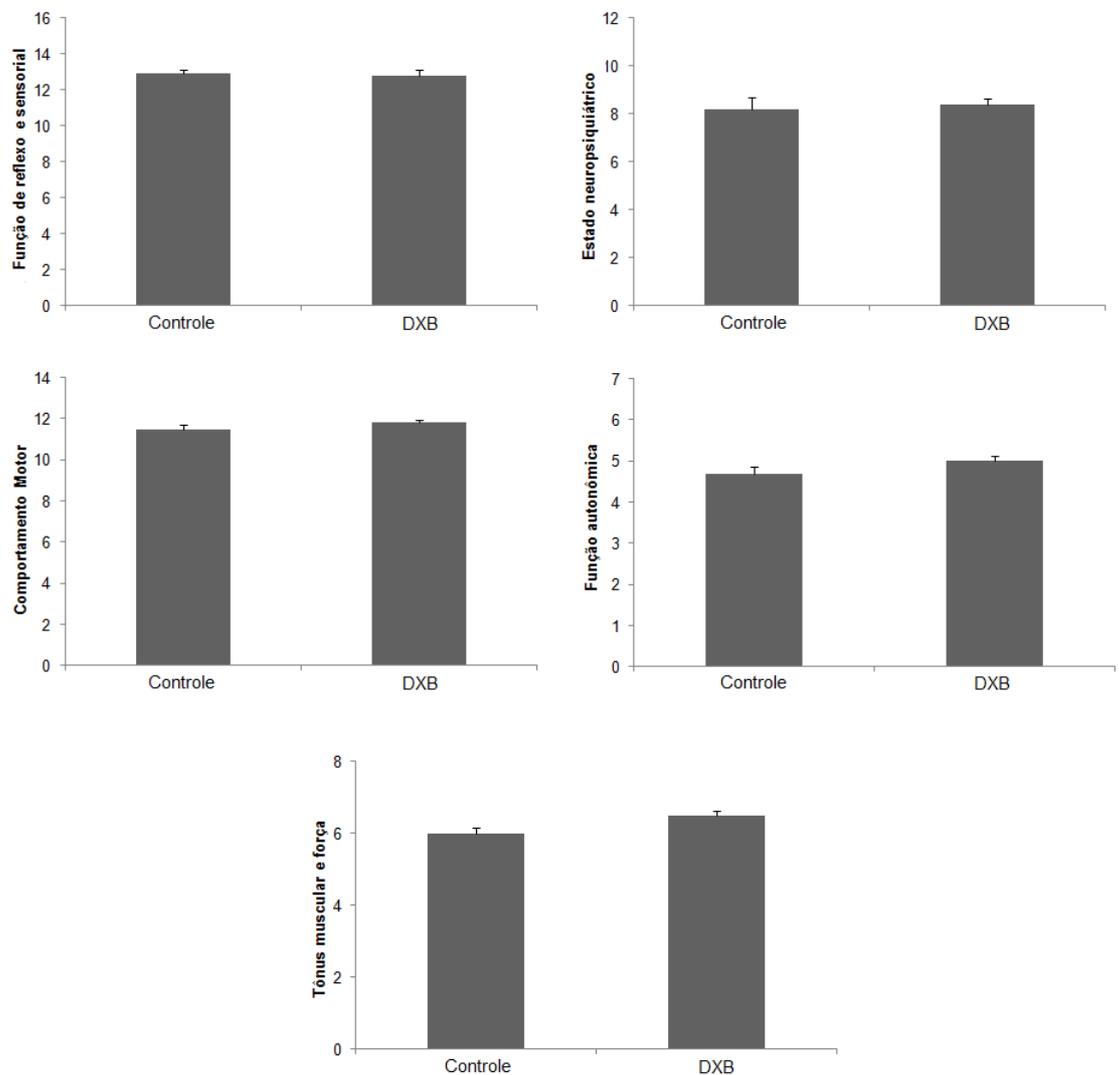


Figura 1: Comprometimento comportamental após a administração aguda de AACR. Comprometimento comportamental foi medido em cinco diferentes categorias funcionais: função de reflexo e sensorial, estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autônoma, tônus muscular e força usando o protocolo SHIRPA. A soma das pontuações de todas as categorias funcionais foi mostrada como uma pontuação "total" (inferior direito). Os dados são expressos como média \pm SEM, n = 12 animais por grupo.

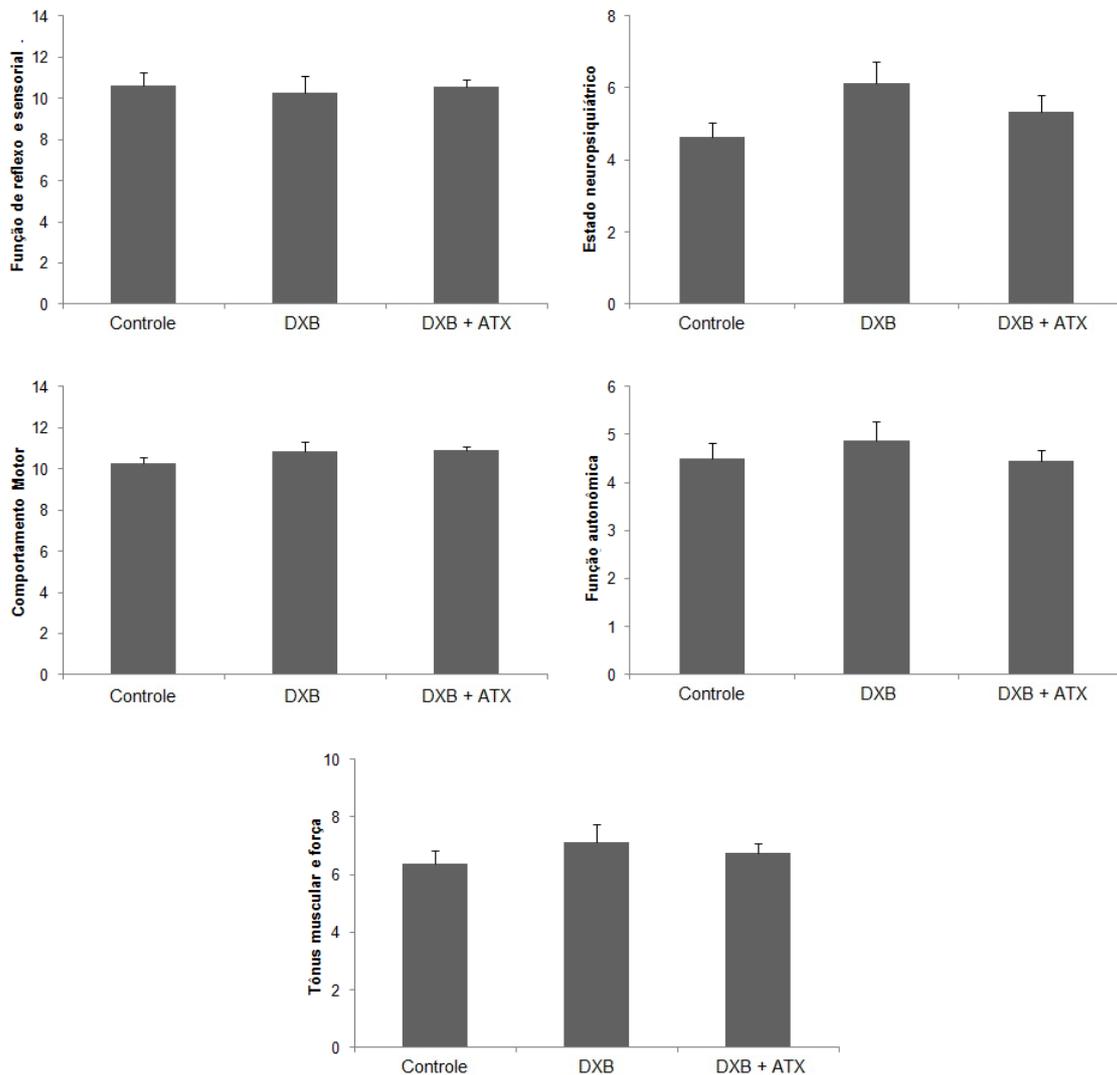


Figura 2: Comprometimento comportamental após a administração crônica de AACR. Comprometimento comportamental foi medido em cinco diferentes categorias funcionais: função de reflexo e sensorial, estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autônoma, tônus muscular e força usando o protocolo SHIRPA. A soma das pontuações de todas as categorias funcionais foi mostrada como um "total" (inferior direito). Os dados são expressos como média \pm SEM, n = 12 animais por grupo.

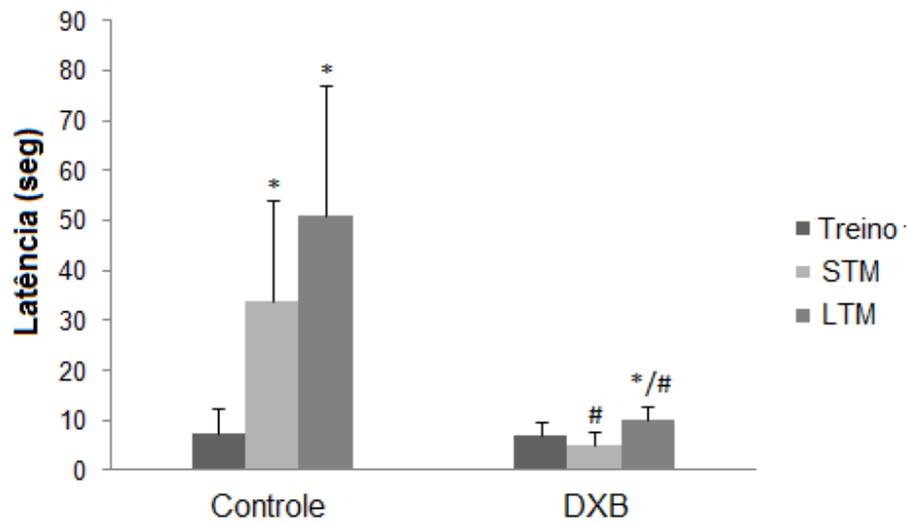


Figura 3: Efeito da administração aguda de AACR na memória de curta duração- (1.5 h após treino) e longa duração (24 h após treino) durante a tarefa de esquivas inibitória. Os dados são apresentados como mediana e intervalo inter-quartil, n = 12 animais por grupo. * $p < 0.05$ em comparação com o treinamento. # $p < 0.05$ em comparação com o grupo controle.

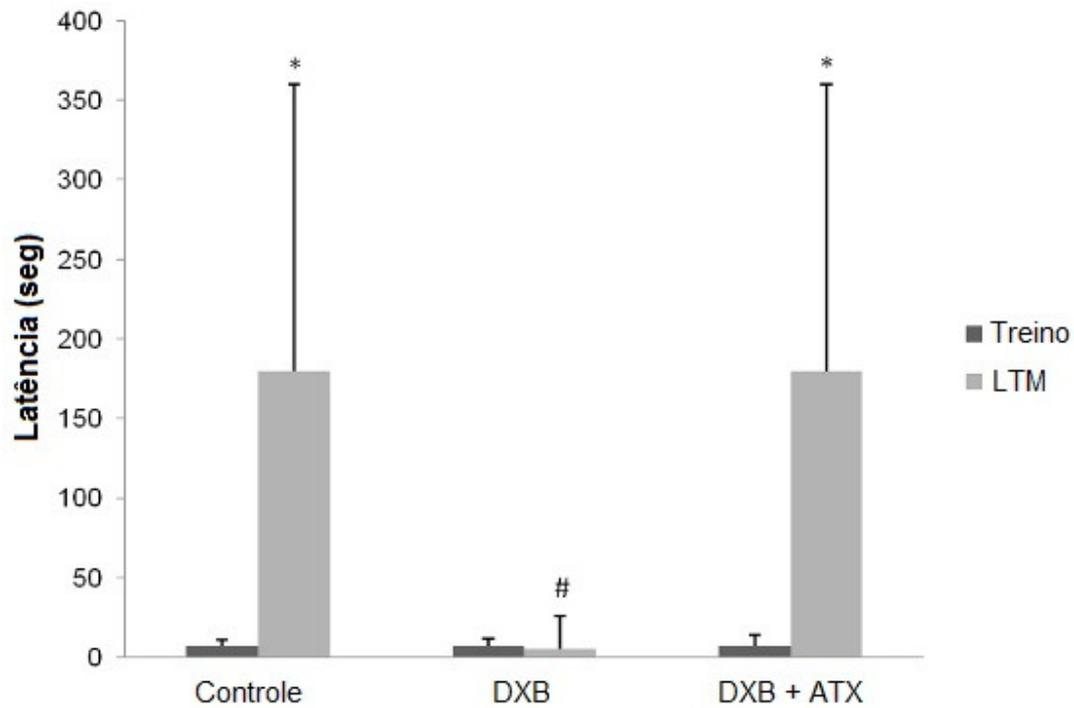


Figura 4: Efeito da administração crônica de AACR em memória de longo prazo (24 h após o treino) durante a tarefa de esquiva inibitória. Os dados são apresentados como mediana e intervalos inter-quartil, $n = 12$ animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o treinamento. # $P < 0,05$ em comparação com o grupo controle.