

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE mRNA DA ACETILCOLINESTERASE EM
RATOS SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DA DOENÇA DO XAROPE DO BORDO
DURANTE O SEU DESENVOLVIMENTO**

Natália de Rochi^{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, Brasil.

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

*Autor Correspondente: Prof. Emilio L. Streck, Laboratório de Bioenergética, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105, Criciúma, 88806-000, SC, Brasil. Telefone: + 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 doença metabólica hereditária caracterizada predominantemente por disfunção neurológica. No entanto, os mecanismos subjacentes à neuropatologia dessas alterações ainda não estão claros. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da administração aguda e crônica de um pool de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) sobre a atividade da acetilcolinesterase e expressão de mRNA no cérebro e soro de ratos durante seu desenvolvimento, e se o tratamento com antioxidantes preveniu as alterações induzidas por estes aminoácidos de cadeia ramificada. Nossos resultados mostraram que a administração aguda do pool de aminoácidos de cadeia ramificada em ratos de 10 e 30 dias de idade aumentou a atividade da acetilcolinesterase no córtex cerebral, estriado, hipocampo e no soro. E também que a administração crônica aumentou a atividade da acetilcolinesterase em todas as estruturas estudadas, e o tratamento antioxidante foi capaz de impedir este aumento. Além disso, ocorreu significativa diminuição da expressão de mRNA do gene da acetilcolinesterase no hipocampo, após administração aguda em ratos de 30 dias de idade. A expressão de mRNA da acetilcolinesterase foram aumentados significativamente após a administração crônica de pool aminoácidos de cadeia ramificada. O tratamento antioxidante foi capaz de impedir o aumento da atividade da acetilcolinesterase, mas não de alterar os níveis de Mrna. Os resultados do presente estudo demonstraram um aumento acentuado na atividade da acetilcolinesterase em todas as estruturas cerebrais estudadas após a administração do pool de aminoácidos de cadeia ramificada. Além disso, o aumento da atividade da acetilcolinesterase foi prevenido pela co-administração de NAC e DFX.

Palavras-Chaves: Doença da urina com odor de xarope do bordo (MSUD), aminoácidos de cadeia ramificada, danos ao DNA, estresse oxidativo, tratamento antioxidante.

Introdução

A doença do xarope do bordo (DXB) é um erro inato do metabolismo causado por uma grave deficiência na atividade do complexo α -acetoácido desidrogenase de cadeia ramificada. Deste modo, resulta no acúmulo de aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) leucina, isoleucina e valina e conseqüentemente de seus respectivos α -cetoácidos de cadeia ramificada (CCR), ácido α -cetoisocapróico (CIC), ácido α -ceto- β -metilvalérico (CMV) e ácido α -cetoisovalérico (CIV) (Chuang e Shih 2001). A incidência mundial é de 1:100.000 casos da doença em nascidos vivos (Chuang e Shih 2001; Mackenzie e Woolf 1959; Zinnanti et al. 2009), embora seja muito maior em populações étnicas específicas, como em famílias menonitas que se aproxima a 1:200 casos (Morton et al. 2002; Zinnanti et al. 2009). Pacientes afetados pela forma clássica deste transtorno apresentam encefalopatia, caracterizada por episódios de cetoacidose, apnéia, convulsões e coma, podendo levar à morte. Imagens do sistema nervoso central (SNC) revelam baixa densidade da substância branca correspondente a hipomielinização/desmielinização e atrofia cerebral (Chuang e Shih 2001; Schonberger et al. 2004; Tribble e Shapira 1983).

Seqüelas neurológicas estão presentes na maioria dos pacientes, mas os mecanismos subjacentes à neurotoxicidade deste distúrbio ainda não são claros. No entanto, leucina e/ou seus cetoácidos são considerados os principais metabólitos neurotóxicos na DXB, uma vez que o aumento das concentrações plasmáticas destes compostos (cerca de 5,0 mM) está associado com o aparecimento de sintomas neurológicos. Estudos em ratos com a forma intermediária da DXB e uma dieta rica em proteínas mostraram que o início dos sintomas comportamentais foi concomitante a depleção de neurotransmissores e que os sintomas mais graves estavam associados com a depleção de energia secundária à alterações no ciclo de Krebs (Zinnanti et al. 2009). Tem sido postulado um déficit de energia cerebral provocado pelo acúmulo de metabólitos na DXB (Danner e Elsas 1989; Halestrap e Brand 1974; Howell e Lee 1963; Land et al. 1976; Pilla et al. 2003), baixos níveis cerebrais de aminoácidos essenciais levando à diminuição da síntese de neurotransmissores (Araujo et al. 2001; Wajner e Vargas 1999; Wajner et al. 2000) e uma deficiência de mielina (Appel 1966; Taketomi et al. 1983; Treacy et al. 1992; Tribble e Shapira 1983), podendo contribuir para o desenvolvimento de lesão cerebral.

Tem sido descrito que os prejuízos de memória, aprendizagem e comportamento observados em pacientes com demência são causados, pelo menos em parte, por mudanças na função do sistema

colinérgico (Blokland 1995; Fodale et al. 2006), já que há evidências consistentes de que baixos níveis de acetilcolina (ACh) no cérebro estão relacionados com a disfunção cognitiva (Bartus et al. 1982; Mesulam 2004). A transmissão colinérgica é principalmente determinada pela hidrólise da ACh pela enzima acetilcolinesterase (AChE: EC 3.1.1.7). Esta enzima está presente na forma G4 (ligada á membrana) e forma G1 (citossólica) em diferentes regiões cerebrais (Das et al. 2001). No cérebro de mamíferos a forma G4 representa 60-90% da AChE total, dependendo da região anatômica, o restante sendo composto pelas formas G1 e G2 (Descarries et al. 1997). AChE é uma enzima muito importante em muitos organismos vivos, inclusive os vertebrados e seres humanos. É essencial para o funcionamento normal do sistema nervoso, uma vez que interrompe rapidamente a ação da ACh liberada na sinapse (Soreq e Seidman 2001). A AChE é associada ao desenvolvimento cerebral, aprendizagem, memória e dano neuronal (Ballard et al. 2005; Metz e Tracey 2005; Zimmerman e Soreq 2006). Além disso, tem sido descrito que a colinesterase está envolvida na ativação da modulação glial, fluxo sanguíneo cerebral, cascata amilóide, fosforilação tau, bem como na ação da proteína de adesão e no seu desenvolvimento sináptico e sua manutenção (Ballard et al. 2005; Silman e Sussman 2005).

Considerando que os pacientes com DXB costumam apresentar um grau variado de retardo mental e outros sintomas neurológicos, decidimos investigar se a administração aguda e crônica de um pool de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina, valina) afetaria a atividade da AChE e a expressão de mRNA no cérebro e soro de ratos durante o seu desenvolvimento, e se o tratamento antioxidante (N-acetilcisteína (NAC) E deferoxamina (DFX)) mostra ser um tratamento eficaz na DXB.

Materiais e Métodos

Animais

Ratos Wistar foram obtidos através do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Foram acondicionados em grupos de cinco, com livre acesso a água e comida, em um ciclo claro-escuro de 12h (luzes acessas ás 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).

Administração aguda do pool de aminoácidos de cadeia ramificada

Os animais receberam três administrações por via subcutânea (em intervalos de 1h entre si) do pool de aminoácidos de cadeia ramificada (15.8 µL/g do peso corporal) contendo leucina (190 mmol/L), (isoleucina 59 mmol/L) e (valina 69 mmol/L) em solução salina (0.85% NaCl) ou salina para o grupo controle. O pool de aminoácidos de cadeia ramificada e solução salina foram administrados em ratos infantis (10 dias) e jovens (28 dias) com n=6 (Bridi et al. 2006). Uma hora após a última injeção, os animais foram mortos por decapitação, o sangue foi coletado e o soro separado (centrifugado a 750 × g por 10 min). O cérebro foi rapidamente removido e o hipocampo, estriado e córtex cerebral foram separados para a avaliação da atividade da AChE.

Administração crônica do pool de aminoácidos de cadeia ramificada e tratamento com antioxidante

Os animais foram divididos em três grupos: 1) Controle (salina); 2) DXB (Induzida pelo pool de aminoácidos de cadeia ramificada); 3) DXB tratado com a combinação de NAC (20 mg/kg) e DFX (20 mg/kg). Os animais receberam duas administrações por via subcutânea (com intervalo de 12h) do pool de aminoácidos de cadeia ramificada (15.8 µL/g do peso corporal) contendo leucina (190 mmol/L), (isoleucina 59 mmol/L) e (valina 69 mmol/L) 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=6). 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). Doze horas após a última injeção, os animais foram mortos por decapitação, o sangue foi coletado e o soro separado (centrifugado a 750 × g por 10 min). O cérebro foi rapidamente removido e o hipocampo, estriado e córtex cerebral foram separados para a avaliação da atividade da AChE.

Atividade da Acetilcolinesterase

A atividade desta enzima foi realizada de acordo com o método descrito por Ellman e colaboradores (1961). A hidrólise da acetilcolina foi avaliada em uma concentração de 0,8 mM em 1 mL de uma solução contendo tampão fosfato 100 mM (pH 7,5) e DTNB 1,0 mM. Cinquenta microlitros de amostra foram adicionados à solução e pré-incubadas por 3 min. A hidrólise foi monitorada pela formação do diânion tiolato de DTNB a 412 nm por 2-3 min em intervalos de 30 s para uma temperatura de 25 ° C. As

amostras foram avaliadas em duplicata. A proteína foi medida pelo método de Lowry e colaboradores (1951) usando soro albumina bovina como padrão.

Análise semi-quantitativa da expressão gênica RT-PCR

A análise de expressão das subunidades catalíticas da AChE foi realizado por uma análise semi-quantitativa RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction). O estriado, hipocampo e o córtex cerebral foram dissecados em condições estéreis e imediatamente submetido a uma extração de RNA total pelo método TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. RNA foi quantificado por espectrofotometria e espécies cDNA foram sintetizadas com o kit *ImProm-II[™] Reverse Transcription System* (Promega). As reações de PCR para genes AChE e β -actina (da Silva 2008) foram realizadas utilizando 0,1 μ M primers (*ache* forward: 5'- GAC TGC CTT TAT CTT AAT GTG -3' e reverse: 5'- CGG CTG ATG AGA GAT TCA TTG -3'; *β -actin* forward 5'-TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG-3'; e reverse 5'-TAC TCC TGC TTC CTG ATC CAC AT-3') 0,2 μ M dNTP, 2 mM MgCl₂ e 0,1 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen), em um volume total de 25uL de AChE e 20uL de β -actina. As seguintes condições foram utilizadas para as reações de PCR: 1minuto a 94 °C, 1min para a temperatura de anelamento (54 °C para a β -actina e 55 °C para a AChE) e 1 min a 72 °C por 35 ciclos. Pós-extensão a 72 °C foi realizada por 10 min. Para cada conjunto de reações de PCR, o controle negativo foi incluído. Produtos do PCR (AChE: 785bp, β -actina: 210bp) foram analisados em gel de agarose 1,5%, contendo GelRed[®] (Biotium) e visualizado sob luz ultravioleta. Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, EUA) foi utilizado como marcador molecular e a normalização foi realizada utilizando- β -actina como um gene constitutivo.

Análise estatística

Os resultados são apresentados na forma de média \pm desvio padrão. Os ensaios foram realizados em duplicata e a média foi utilizada para análise estatística. Testes para determinação de normalidade e igualdade de variâncias foram realizados para examinar se os nossos dados são qualificados para os testes estatísticos paramétricos. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk, $P > 0,05$) com variâncias iguais entre as amostras (teste de variâncias iguais, $P > 0,05$). Assim, o teste t de Student foi utilizado para comparação de duas médias. Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido de Tukey HSD Post-Hoc Tests foi utilizado para comparação das três médias.. Diferenças entre os grupos foram

classificados como significativos quando $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas em um computador PC IBM-compatível, utilizando o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

Resultados

Primeiro examinamos os efeitos da administração aguda e crônica de um pool de aminoácidos de cadeia ramificada sobre a atividade da AChE no córtex cerebral, hipocampo, estriado e soro de ratos de 10 e 30 dias de idade. Observamos que a administração aguda de um pool de aminoácidos de cadeia ramificada em ratos de 10 e 30 dias de idade aumentou a atividade da AChE no córtex cerebral, estriado, hipocampo e no soro, quando comparado ao grupo controle (Figura 1 e Figura 2, respectivamente). Além disso, a administração crônica de um pool de aminoácidos de cadeia ramificada aumentou a atividade da AChE no córtex cerebral, hipocampo, estriado e soro; o tratamento com antioxidante foi capaz de prevenir o aumento da atividade da AChE (Figura 3).

A regulação da atividade da AChE pode ser uma consequência do controle transcricional e/ou modificações pós-translacionais. Efeitos da administração aguda e crônica de um pool de aminoácidos sobre os níveis de mRNA da AChE no cérebro são apresentados na Figura 4, 5 e 6. Comparado ao grupo controle uma diminuição significativa dos níveis de mRNA da AChE no hipocampo foi observado após a administração aguda em ratos de 10 e 30 dias de idade. Por outro lado, os níveis de mRNA da AChE aumentaram significativamente após a administração crônica de um pool de aminoácidos de cadeia ramificada no córtex cerebral, mas diminuiu no estriado.

Discussão

A fisiopatologia dos sintomas neurológicos e atrofia do cérebro de pacientes com DXB parece ser múltipla e ainda é pouco conhecida (Chuang e Shih 2001). No entanto, há dados na literatura sugerindo que os metabólitos acumulados na DXB podem estar envolvidos na neuropatologia dessa doença. Estudos têm demonstrado que os aminoácidos de cadeia ramificada e seus cetoácidos podem induzir alterações no metabolismo energético (Amaral et al. 2010; Danner e Elsas 1989; Howell e Lee 1963; Land et al. 1976; Pilla et al. 2003; Ribeiro et al. 2008; Sgaravatti et al. 2003), estresse oxidativo (Barschak et al. 2006; Bridi et al. 2003; 2005a; 2005b; Fontella et al. 2002), e causar alterações

significativas nos níveis de neurotransmissores glutamato, aspartato e γ -aminobutírico (GABA) no cérebro (Dodd et al. 1992; Prensky e Moser 1967; Tavares et al. 2000; Yudkoff et al. 1994). Além disso, foi demonstrado que a administração crônica de leucina em ratos em desenvolvimento faz com que ocorra mudanças duradouras de comportamento relacionadas com a aprendizagem e memória (Melo et al. 1999).

A AChE é associado com o desenvolvimento do cérebro, aprendizado e memória e dano neuronal (Ballard et al. 2005; Metz e Tracey 2005; Zimmerman e Soreq 2006). A ativação da AChE leva a uma rápida degradação da acetilcolina e um baixo estímulo subsequente de receptores de acetilcolina causando efeitos indesejáveis sobre as funções cognitivas (Tõugu e Kesvatera 1996; Soreq e Seidman 2001). Baseados em nossos resultados podemos sugerir que o aumento na atividade da AChE causada pelo acúmulo de aminoácidos de cadeia ramificada leva a uma rápida redução da neurotransmissão colinérgica devido a uma diminuição dos níveis de acetilcolina na fenda sináptica, contribuindo assim para um declínio cognitivo progressivo e outras disfunções neurológicas visto em pacientes com DXB. Além disso, várias linhas de evidência (Greenfield 1984; Inestrosa et al. 1996; Karpel et al. 1996; Layer e Willbold 1995) demonstraram atividades não-catalíticas para a AChE, demonstrando que a enzima desempenha um papel complexo, modulando o crescimento e morte celular. Jiang e Zhang (2008) mostrou que as isoformas da AChE participam da apoptose de duas maneiras: através da promoção ou supressão de morte celular. A melhora da expressão variante da AChE pode influenciar na expressão de outro grupo de genes, incluindo aqueles envolvidos na apoptose (Ben-Ari et al. 2006). Além disso, a AChE também contribui para a formação do apoptossomo durante a apoptose. O silenciamento da AChE com siRNA bloqueia a interação entre fator de ativação de protease de apoptose 1 e o citocromo c (Park et al. 2004). Uma vez que a apoptose está envolvida na fisiopatologia da DXB, através de uma via independente do citocromo c (Jouvet et al. 2000) e AChE é capaz de promover apoptose, nossos resultados podem explicar, pelo menos em partes, as seqüelas neurológicas associadas com as altas concentrações plasmáticas de metabólitos na DXB.

A fim de verificar, se o gene da AChE pode ser modulado após a administração aguda e crônica de um pool de aminoácidos de cadeia ramificada em ratos de 10 e 30 dias de idade, realizamos experimentos semi-quantitativos de RT-PCR após estes tratamentos. Interessantemente, os resultados demonstraram que os níveis de mRNA da AChE foram significativamente menores no hipocampo após a administração aguda do pool de aminoácidos, sugerindo que o aumento da atividade da AChE observados neste tratamento não está diretamente relacionado a uma maior expressão gênica da AChE. O maquinário

de transcrição é continuamente controlado pela regulamentação da transcrição/tradução, interações proteína-proteína / modificações, e uma rede metabólica, que formam um sistema que permite que as células respondam de forma sensível a múltiplos sinais que existem em seu ambiente (Krishna et al. 2006). O fenômeno conhecido como ciclo *feedback* negativo (Keseler et al. 2005; Salgado et al. 2001), que situa-se na interface das redes metabólicas e genéticas, poderia esclarecer o concomitante aumento da hidrólise ACh e a diminuição dos níveis de mRNA da AChE no hipocampo após a administração aguda de um pool de aminoácidos de cadeia ramificada. Grifman e colaboradores (1997) vêm demonstrando que a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de cAMP (PKA) pode fosforilar AChE em sítios não-consensuais. Observamos que as subunidade catalíticas da AChE de ratos apresentam uma alta pontuação prevista de possíveis sítios de fosforilação: S-88 (PKA), T-280 (PKA) e S-593 (PKC) de acordo com a análise realizada em NetPhosk, uma ferramenta de predição de fosforilação de proteínas quinase-específica. Assim, a fosforilação PKA é uma possível candidata para realizar a ativação da atividade AChE observada após a administração aguda de um pool de aminoácidos de cadeia ramificada.

Por outro lado, os resultados demonstraram que os níveis de mRNA da AChE aumentaram significativamente após a administração crônica de um pool de aminoácidos de cadeia ramificada no córtex cerebral, sugerindo que o aumento da atividade AChE observado neste tratamento pode ser diretamente relacionado a uma maior expressão do gene AChE. Interessantemente a administração de antioxidante foi capaz de impedir o aumento da atividade da AChE, mas não de alterar os níveis de mRNA. No estriado, os níveis de mRNA da AChE diminuíram significativamente após a administração crônica do *pool* de BCAA, sugerindo que o aumento da atividade da AChE observada nesta região não está diretamente relacionado com um aumento da expressão de gene da AChE, mas com possíveis sítios de fosforilação. Portanto, a regulação da atividade AChE observada no estriado poderia ser atribuída a possíveis alterações no estado de fosforilação da mesma. Neste contexto, sugerimos que a fosforilação PKA realiza a ativação da atividade da AChE após a administração crônica, já que o tratamento com antioxidantes foi capaz de impedir o aumento da atividade da AChE e que ERO estão envolvidas em diferentes eventos de capacitação relacionados com o aumento dos níveis de cAMP e ativação da via PKA dependendo de AMPc (Aitken et al. 1998; Herrero et al. 2000; Leclerc et al. 1997). Assim, a fosforilação de PKA poderia ser um fator decisivo na mudança de conformação da enzima, levando a um aumento da afinidade da enzima com o substrato (Aldunate et al. 2004; Das et al. 2001; Melo et al. 2003).

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram um aumento acentuado na atividade da AChE em todas as áreas do cérebro que foram avaliadas após a administração de um pool de aminoácidos de cadeia ramificada. Além disso, o aumento da atividade da AChE foi impedido pela co-administração de NAC e DFX; estes compostos aumentaram a eficiência da transmissão colinérgica, impedindo a hidrólise da acetilcolina liberada, pela inibição da AChE, tornando assim mais disponíveis acetilcolina na sinapse colinérgica (Benzi e Morreti 1998; Das et al. 2002; Grisaru et al. 1999). Nesta linha, podemos supor que uma diminuição da atividade AChE pelo tratamento antioxidante pode contribuir para aumentar os níveis de ACh e, conseqüentemente, para melhorar as funções cognitivas, tais como o aprendizado e a memória (Kaur et al. 2007; Mesulam et al. 2002).

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada por recursos 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

- Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS (1998) A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterized by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci* 111:645-656
- Aldunate R, Casar JC, Brandan E (2004) Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. *Brain Res Rev* 47:96-104
- Amaral AU, Leipnitz G, Fernandes CG, Seminotti B, Schuck PF, Wajner M (2010) Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Res* 1324:75-84
- Appel SH (1966) Inhibition of brain protein synthesis: an approach to a biochemical basis of neurological dysfunction in the amino-acidurias. *Trans N Y Acad Sci* 29:63-70
- Araújo P, Wassermann GF, Tallini K, Furlanetto V, Vargas CR, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M (2001) Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem Int* 38:529-537

- Ballard CG, Greig NH, Guillozet-Bongaarts AL, Enz A, Darvesh S (2005) Cholinesterases: Roles in the brain during health and disease. *Curr Alzheimer Res* 2:307–318
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, de Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR (2006) Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 21:279–286
- Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217:408-414
- Ben-Ari S, Toiber D, Sas AS, Soreq H, Ben-Shaul Y (2006) Modulated splicing-associated gene expression in P19 cells expressing distinct acetylcholinesterase splice variants. *J Neurochem* 97:24–34
- Benzi G, Morreti A (1998) Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? *Eur J Pharmacol* 346:1–13
- Blokland A (1995) Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res* 21:285–300
- Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Wajner M, Dutra-Filho CS (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 CA, Zorzi GK, Wannmacher CM, Wajner M, Lissi EG, Dutra-Filho CS (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 CA, Zorzi GK, Wajner M, Lissi EG, Dutra-Filho CS (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 FU, Pulrolnik V, Braun CA, Zorzi GK, Coelho D, Wajner M, Vargas CR, Dutra-Filho CS (2006) A chemically-induced acute model of maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies. *J Neurosci Methods* 155:224-230
- Chuang DT, Shih VE (2001) Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudt AL, Sly WL, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, pp 1971–2005

- da Silva RS, Richetti SK, da Silveira VG, Battastini AM, Bogo MR, Lara DR, Bonan CD (2008) Maternal caffeine intake affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. *Int J Dev Neuroscience* 26:339–343
- Danner DJ, Elsas LJ (1989) Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: Scriver, CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, pp 671–692
- Das A, Dikshit M, Nath C (2001) Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci* 68:1545-1555
- Das A, Shanker G, Nath C, Pal R, Singh S, Singh HK (2002) A comparative study I rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *ginkgo biloba* anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacol Biochem Behav* 73:893–900
- Descarries L, GIsiger V, Steriade M (1997) Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol* 53:603–625
- Di-Pietro PB, Dias ML, Scaini G, Burigo M, Constantino L, Machado RA, Dal-Pizzol F, Streck EL (2008) Inhibition of brain creatine kinase activity after renal ischemia is attenuated by N-acetylcysteine and deferoxamine administration. *Neurosci Lett* 434:139-143
- Dodd PR, Williams SH, Gundlach AL, Harper PA, Healy PJ, Dennis JA, Johnston GA (1992) Glutamate and gamma-aminobutyric acid neurotransmitter systems in the acute phase of maple syrup urine disease and citrullinemia encephalopathies in newborn calves. *J Neurochem* 59:582–590
- Ellman GI, Courtney KD, Andres Jr V, Feather-Stone RM (1961) A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95
- Fodale V, Quattrone D, Trecroci C, Caminiti V, Santamaria LB (2006) Alzheimer's disease and anaesthesia: implications for the central cholinergic system. *Br J Anaesth* 97:445–452
- Fontella FU, Gassen E, Pulrolni V, Wannmacher CMD, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS (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
- Greenfield S (1984) Acetylcholinesterase may have novel functions in the brain. *Trends Neurosci* 7:364–

- Grifman M, Arbel A, Ginzberg D, Glick D, Elgavish S, Shaanan B, Soreq H (1997) In vitro phosphorylation of acetylcholinesterase at non-consensus protein kinase A sites enhances the rate of acetylcholine hydrolysis. *Brain Res Mol Brain Res* 51:179-87
- Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H (1999) Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem* 264:672–686
- Halestrap AP, Brand MD, Denton RM (1974) Inhibition of mitochondrial pyruvate transport by phenylpyruvate and α -ketoisocaproate. *Biochem Biophys Acta* 367:102–108
- Herrero MB, Chatterjee S, Lefièvre L, de Lamirande E, Gagnon C (2000) Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 29:522-536
- Howell RK, Lee M (1963) Influence of α -keto acids on the respiration of brain in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 113:660–663
- Inestrosa NC, Alvarez A, Pérez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, Casanueva OI, Soto C, Garrido J (1996) Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 16:881–891
- Jiang H, Zhang XJ (2008) Acetylcholinesterase and apoptosis. A novel perspective for an old enzyme. *FEBS J* 275:612-617
- Jouvet J, Rustin P, Taylor DL, Pocock JM, Felderhoff-Mueser U, Mazarakis ND, Sarraf C, Joashi U, Kozma M, Greenwood K, Edwards AD, 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
- Karpel R, Sternfeld M, Ginzberg D, Guhl E, Graessmann A, Soreq H (1996) Overexpression of alternative human acetylcholinesterase forms modulates process extensions in cultured glioma cells. *J Neurochem* 66:114–123
- Kaur T, Pathak CM, Pandhi P, Khanduja KL (2007) Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. *Brain Cogn* 67:25–30
- Keseler IM, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Ingraham J, Paley S, Paulsen IT, Peralta-Gil M, Karp PD (2005) EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 1:334–337

- Krishna S, Andersson AM, Semsey S, Sneppen K (2006) Structure and function of negative feedback loops at the interface of genetic and metabolic networks. *Nucleic Acids Res* 34:2455–2462
- Land JM, Mowbray J, Clark JB (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
- Layer P, Willbold E (1995) Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. *Prog Histochem Cytochem* 29:1–92
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C (1997) Regulation of protein tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen species derivatives. *Free Radic Biol Med* 22:643–656.
- Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Mackenzie DY, Woolf LI (1959) Maple syrup urine disease; an inborn error of the metabolism of valine, leucine, and isoleucine associated with gross mental deficiency. *Br Med J* 1:90–91
- Mello CF, Feksa L, Brusque AM, Wannmacher CM, Wajner M (1999) Chronic early leucine administration induces behavioral deficits in rats. *Life Sci* 65:747–55
- Melo JB, Agostinho P, Oliveira CR (2003) Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neurosci Res* 45:117–127
- Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A (2002) Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110:627–639
- Mesulam MM (2004) The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Prog Brain Res* 145:67–78
- Metz CN, Tracey KJ (2005) It takes nerve to dampen inflammation. *Nat Immunol* 6:756–757
- Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, Puffenberger EG, Kelley RI (2002) Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics* 109:999–1008
- Park SE, Kim ND, Yoo YH (2004) Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Res* 64:2652–2655
- Pilla C, Cardozo RF, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem Res* 28:675–679

- Premsky AL, Moser HW (1967) Changes in the amino acid composition of proteolipids of white matter during maturation of the human nervous system. *J Neurochem* 14:117–121
- Ribeiro CA, Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Grando V, Schmidt AL, Ferreira GC, Perry ML, Dutra-Filho CS, Wajner M (2008) Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res* 33:114–124
- Salgado H, Santos-Zavaleta A, Gama-Castro S, Millan-Zarate D, Diaz-Peredo E, Sanchez-Solano F, Perez-Rueda E, Bonavides-Martinez C, Collado-Vides J, Regulon DB (2001) RegulonDB (version 3.2): transcriptional regulation and operon organization in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 29:72–74
- Schonberger S, Schweiger B, Schwahn B, Schwarz M, Wendel U (2004) Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab* 82:69–75
- Sgaravati AM, Rosa RB, Schuck PF, Ribeiro CAJ, Wannmacher CMD, Wyse ATS, Dutra-Filho CS, Wajner M (2003) Inhibition of brain energy metabolism by the α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 1639:232–238
- Silman I, Sussman JL (2005) Acetylcholinesterase: ‘classical’ and ‘non-classical’ functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 5:293–302
- Snyderman SE, Norton PM, Roitman E, Holt Jr LE (1964) Maple syrup urine disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics* 34:454–472
- Soreq H, Seidman S (2001) Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2:294–302
- Taketomi T, Kunishita T, Hara A, Mizushima S (1983) Abnormal protein and lipid compositions of the cerebral myelin of a patient with maple syrup urine disease. *Jpn J Exp Med* 53:109–116
- Tavares RG, Santos CEF, Tasca C, Wajner M, Souza DO, Dutra-Filho CS (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
- Tōgu V, Kesvatera T (1996) Role of ionic interactions in cholinesterase catalysis. *Biochim Biophys Acta* 1298:12–30
- Treacy E, Clow CL, Reade TR, Chitayat D, Mamer OA, Scriver CR (1992) Maple syrup urine disease: interrelationship between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *J Inher Metab Dis* 15:121–135

- Tribble D, Shapira R (1983) Myelin proteins: degradation in rat brain initiated by metabolites causative of maple syrup urine disease. *Biochem Biophys Res Commun* 114:440–446
- Wajner M, Coelho DM, Barschak AG, Araújo PR, Pires RF, Lulhier FL, Vargas CR (2000) Reduction of large neutral amino acid concentration in plasma and CSF of patients with maple syrup urine disease during crises. *J Inherit Metab Dis* 23:505–512
- Wajner M, Vargas CR (1999) Reduction of plasma concentrations of large neutral amino acids in patients with maple urine disease during crises. *Arch Dis Child* 80:579
- Yudkoff M, Daikhin Y, Lin ZP, Nissim I, Stern J, Pleasure D, Nissim I (1994) Interrelationships of leucine and glutamate metabolism in cultured astrocyts. *J Neurochem* 62:1192–1202
- Zimmerman G, Soreq H (2006) Termination and beyond: Acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res* 326:655–669
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Griffin K, Skvorak KJ, Paul HS, Homanics GE, Bewley MC, Cheng KC, Lanoue KF, Flanagan JM (2009) Dual mechanism of brain injury and novel treatment strategy in maple syrup urine disease. *Brain* 132:903–918

Figuras

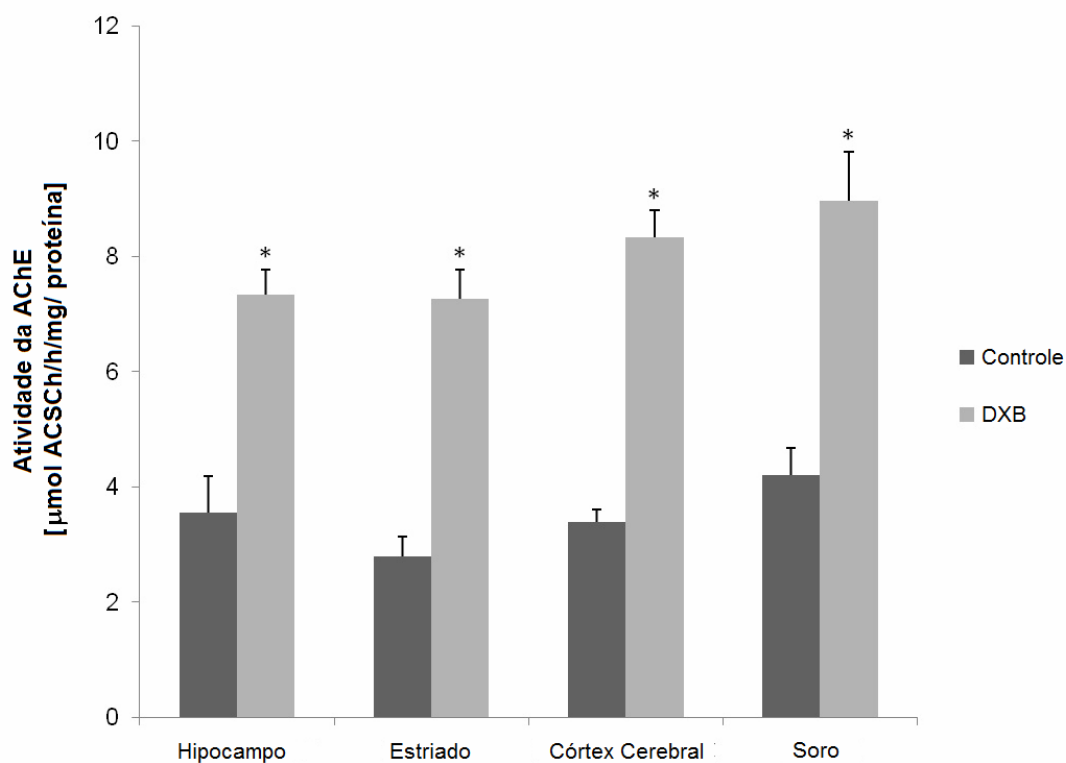


Figura 1: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo, estriado, córtex cerebral e soro de ratos de 10 dias. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. Diferente do controle, * $p < 0,05$ (teste t de Student).

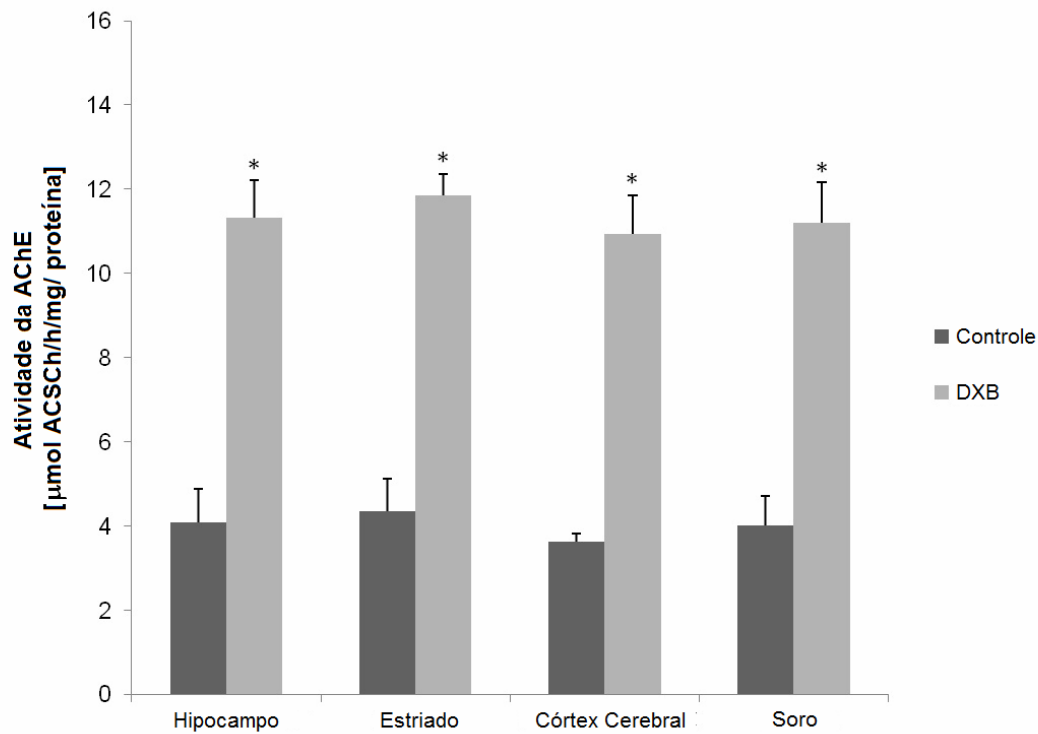


Figura 2: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo, estriado, córtex cerebral e soro de ratos de 30 dias. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. Diferente do controle, * $p < 0,05$ (teste t de Student).

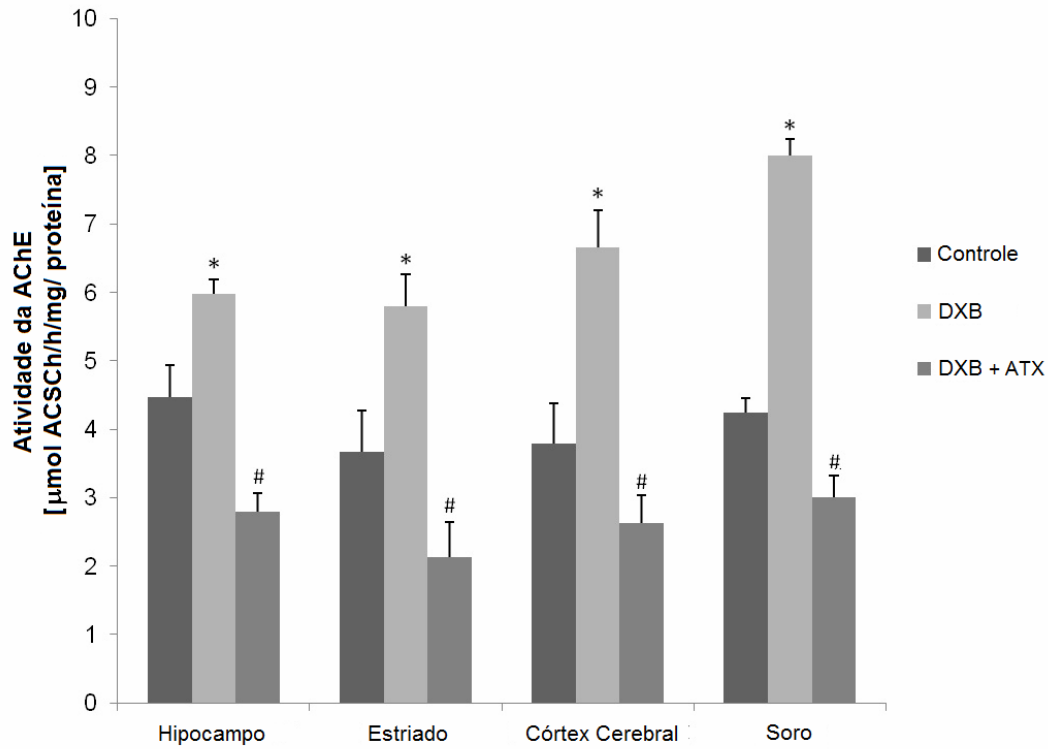


Figura3: Efeito da administração crônica de aminoácidos cadeia ramificada e aqueles tratados com N-acetilcisteína (NAC) e deferoxamina (DFX) sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo, estriado, córtex cerebral e soro de ratos durante seu desenvolvimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. Diferente do controle, * $p < 0,05$; Diferente do DXB, # $p < 0,05$ (teste de Tukey).

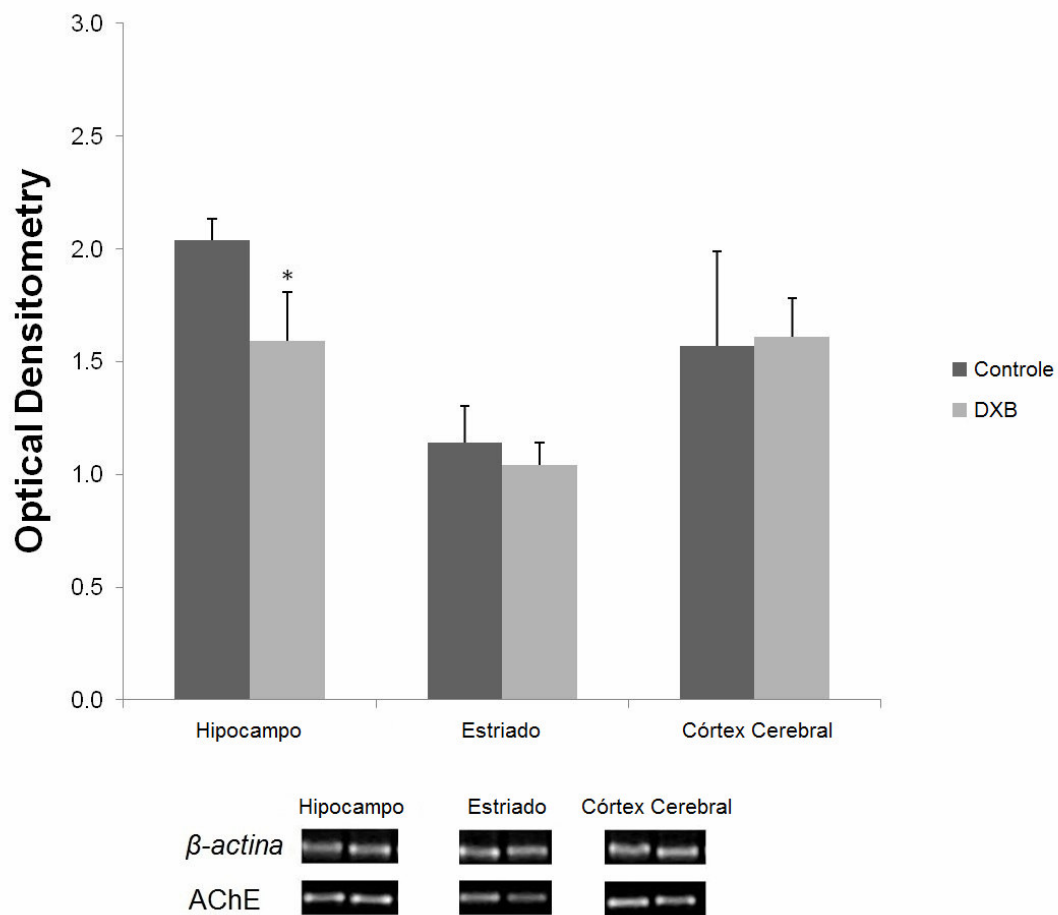


Figura 4: Expressão de mRNA da acetilcolinesterase (AChE) após administração aguda de aminoácidos cadeia ramificada no hipocampo, estriado, córtex cerebral e soro de ratos de 10 dias. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. Diferente do controle, * $p < 0,05$ (teste t de Student).

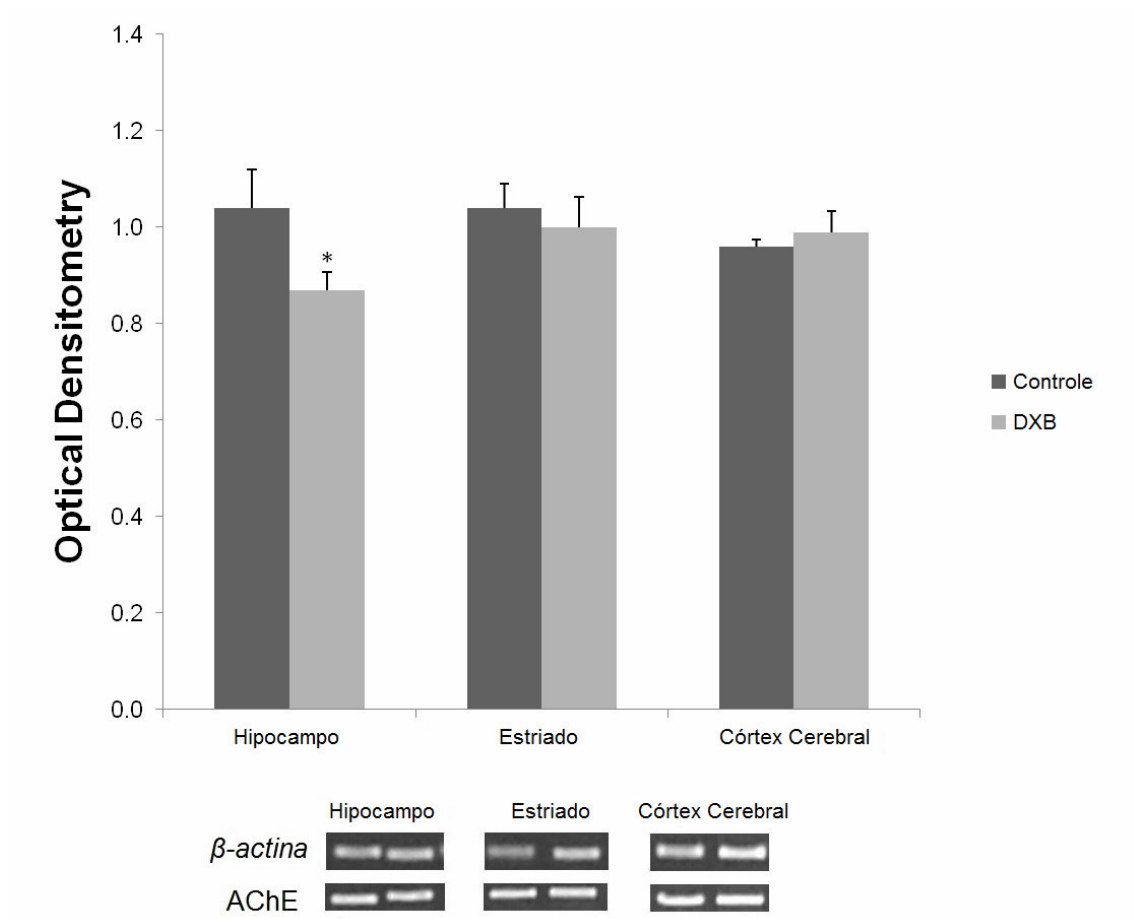


Figura 5: Expressão de RNAm da acetilcolinesterase (AChE), após administração aguda de aminoácidos cadeia ramificada no hipocampo, estriado, córtex cerebral e soro de ratos de 30 dias.

Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. Diferente do controle, * $p < 0,05$ (teste t de Student).

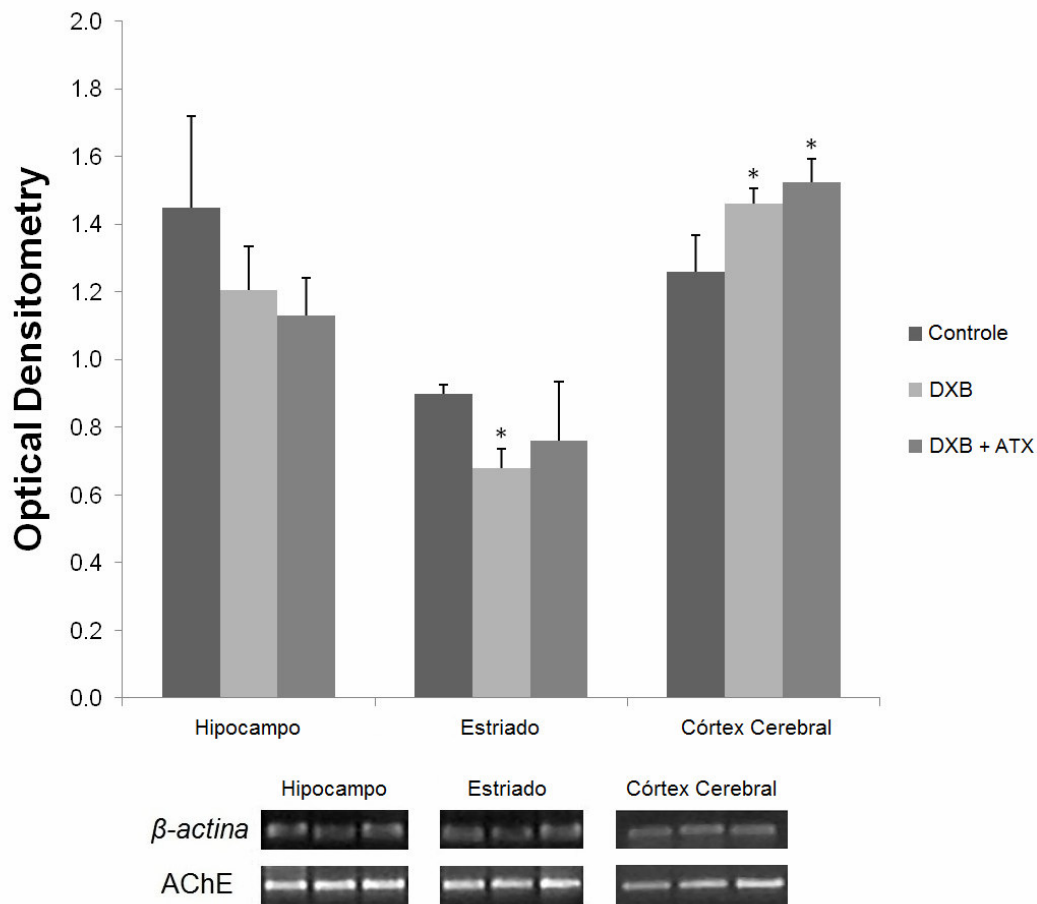


Figura 6: Expressão de RNAm da acetilcolinesterase (AChE) após a administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada e aqueles tratados com N-acetilcisteína (NAC) e deferoxamina (DFX) no hipocampo, estriado, córtex cerebral e soro de ratos durante seu desenvolvimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. Diferente do controle, * $p < 0,05$ (teste de Tukey).