

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

LUCIANA ROSA

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS,
PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E
ATIVIDADE DA Na^+, K^+ -ATPase NO MODELO ANIMAL DA
DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO TRATADO
COM DEXAMETASONA**

**CRICIÚMA
2015**

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

LUCIANA ROSA

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS,
PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E
ATIVIDADE DA Na^+, K^+ -ATPase NO MODELO ANIMAL DA
DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO TRATADO
COM DEXAMETASONA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para
obtenção do título de Doutor em Ciências da
Saúde

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

**CRICIÚMA
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R788a Rosa, Luciana.

Avaliação dos parâmetros inflamatórios, permeabilidade da barreira hematoencefálica e atividade da Na⁺, K⁺-ATPase no modelo animal da doença da urina do xarope do bordo tratado com dexametasona / Luciana Rosa ; orientador : Emílio Luiz Streck. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2015.
101 p. : il. ; 21 cm.

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

1. Doença da urina do xarope do bordo. 2. Aminoácidos de cadeia ramificada – Administração. 3. Dexametasona – Administração. 4. Edema encefálico. 5. Barreira hematoencefálica. 6. Citocinas. I. Título.

CDD 22. ed. 616.042



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

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

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

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Luciana Rosa** sob o título “**Avaliação dos parâmetros inflamatórios, edema cerebral, permeabilidade da barreira hematoencefálica e atividade na Na⁺, K⁺- atpase no modelo animal da doença da urina do xarope do bordo tratada com dexametasona**”, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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

Criciúma, SC, 26 de outubro de 2015.

Prof.ª Dr.ª JOSIANE BUDNI

Membro Relator - UNESC

Prof.ª Dr.ª VANESSA MORAES DE ANDRADE

Membro Interno - UNESC

Prof. Dr. ALEXANDRE UMPIERREZ AMARAL

Membro Externo - UFRGS

Prof.ª Dr.ª PAULA PIEROZAN

Membro Externo - UFRGS

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Orientador

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Bioenergética e Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense, bem como no Laboratório de Neuroproteção e Doenças Metabólicas, Departamento de Bioquímica na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dedico este trabalho ao meu pai Roberto e meu pai Miguel. Seres especiais que estão presentes em todos os momentos de minha vida. Que me ensinam a todo o momento que o mais belo título nesta vida é o amor incondicional regado de uma fé raciocinada e muita humildade.

AGRADECIMENTOS

Esta tese não estaria completa sem um agradecimento a todas as pessoas que me ajudaram a tornar isto possível. Primeiramente gostaria de agradecer ao Nosso Pai Maior, pela grande oportunidade que me foi concedida de retornar para esta terra e apreender um pouco mais sobre nossa ciência que a cada dia é descortinada e novos caminhos são traçados em prol da humanidade.

Aos meus pais, Roberto e Salete, que também fazem parte primordial desta oportunidade. Sem vocês jamais conseguiria chegar até aqui. Ainda lembro como se fosse hoje de meu primeiro dia de aula, no jardim de infância. Toda a força e coragem que possuo, vem do exemplo que vivo ao lado de vocês, a perseverança e principalmente a resignação de continuar no caminho e aguardar o momento certo da realização de um sonho. Muito obrigada por essa jornada terrena de muito amor, carinho e fé! Amarei eternamente vocês!

Aos meus irmãos, Raquel, Betinho e Cristiano, pois diretamente contribuíram para a coragem e persistência em minha caminhada! Meus sobrinhos, Minho, Henrique, Artur e Rafael! Meus anjos! Meu eterno agradecimento!

A minha grande amiga Giselli! Sim, grande amiga! Pois ainda me falta vocabulário específico para colocar um agradecimento ao nível dessa pessoa chamada Giseli. Ser munido de uma extraordinária capacidade de entendimento da ciência atual, porém, com adjetivos específicos para multiplicar este conhecimento ao alcance de pessoas que assim como eu necessitam dessa forte alavanca de raciocínio lógico e descritivo. Coração grande que a todo o momento acolhe mais corações para futuramente brilhar junto a sua luz que resplandece ao nosso redor. Querida Amiga! Humildemente agradeço os grandes momentos de aprendizado proporcionados por você! Sigamos em frente, sempre! Na imensidão deste maravilhoso Universo!

Agradecimento ímpar ao meu orientador, Dr. Emilio Luiz Streck, primeiramente por acolher-me no trajeto da construção do conhecimento já em andamento! Pessoa com um coração de ouro, mesmo ele não admitindo isso! Obrigada Emilio, você tornou a caminhada ainda mais empolgante, tornando essa construção científica, em belo aprendizado, que justificará todo o restante de minha vida profissional.

Aos meus amigos! Meus grandes amigos! Meu agradecimento fraterno! Como é bom olhar ao redor e perceber que temos ao nosso

lado parceiros fiéis para nos impulsionar sempre para frente! Agradecimento especial para minhas duas amigas, parceiras de trabalho, Morgana e Claudia! Com vocês o fardo se torna mais leve e a vida se transforma em gotas de felicidade! Obrigada pela eterna amizade de vocês!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, agradeço pelo muito que aprendi com vocês nesses quatro anos.

A toda a família dos Laboratórios de Bioenergética, Fisiopatologia Experimental, Erros Inatos do Metabolismo pela grande amizade, convivência e troca de experiência. A todos o meu eterno agradecimento.

“Por cada solução encontrada, uma diversidade de novas interrogações nasce. Assim evolui a Ciência, assim progride a vida cotidiana do sujeito humano. O que deixa de constituir problema, de inquietar, de preocupar, perde magicamente o fascínio e passa a ficar retido na valência dos temas dominados...”

Pirokas Ricardo

RESUMO

A doença da urina do xarope do bordo (DXB) é um distúrbio metabólico de caráter autossômico recessivo e, quando não tratada, ocasiona graves sequelas neurológicas. A fisiopatologia da deterioração neurológica na DXB é pouco compreendida; porém as alterações radiológicas estão bem caracterizadas. O objetivo deste trabalho foi investigar se os aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) interferem na regulação de processos imunológicos e inflamatórios no sistema nervoso central e causam edema cerebral bem como avaliar os mecanismos responsáveis por esse efeito e efeitos da administração de dexametasona sobre as alterações provocadas pelos AACR. Os resultados demonstraram que a administração aguda de AACR em ratos infantis diminuiu os níveis de IL-10 e aumentou os níveis de IL-6 no hipocampo, enquanto que no córtex cerebral houve aumento nos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α . A administração de AACR em ratos jovens não alterou os níveis de citocinas nas estruturas cerebrais analisadas. Por outro lado, após a administração crônica houve diminuição nos níveis de IL-1 β e IL-6 no córtex cerebral, enquanto que no hipocampo observou-se diminuição nos níveis de IL-6, IL-10 e IFN- γ . Logo, foi avaliado o efeito da administração aguda de AACR sobre o conteúdo de água, atividade da Na⁺,K⁺-ATPase e a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) no hipocampo e córtex cerebral de ratos infantis, e a influência da administração de dexametasona. Os resultados demonstraram que a administração aguda de AACR causou edema cerebral observado pelo aumento do teor de água no cérebro. Observou-se também uma diminuição na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase e um aumento no conteúdo de fluoresceína de sódio, sugerindo aumento da permeabilidade da BHE a moléculas pequenas, no hipocampo e córtex cerebral. A administração de dexametasona foi capaz de prevenir o edema cerebral, a inibição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase e foi capaz de manter o conteúdo de fluoresceína de sódio similar ao grupo controle nessas estruturas. Por fim, avaliou-se os efeitos do tratamento com dexametasona sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias em ratos infantis submetidos à administração aguda de AACR. Os resultados demonstraram que o tratamento com dexametasona foi capaz de impedir o aumento nos níveis de IL-1 β e TNF- α no córtex cerebral e aumentar os níveis de IL-6 no hipocampo e córtex cerebral. Entretanto, o tratamento com dexametasona não foi capaz de impedir a diminuição nos níveis de IL-10 causada pela administração de AACR. Em conclusão, os resultados

demonstraram que os AACR induzem alterações no sistema imune no cérebro de ratos submetidos ao modelo experimental. Aliado ao processo inflamatório instalado nos animais demonstrou-se que os AACR causam edema cerebral em ratos infantis, e esses efeitos podem estar diretamente relacionados com a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase e com o aumento da permeabilidade da BHE, além disso, foi observado que a administração de dexametasona reverteu estes efeitos.

Palavras-chave: Doença da urina do xarope do bordo; Citocinas; Edema cerebral; Barreira hematoencefálica; Na^+, K^+ -ATPase; Dexametasona.

ABSTRACT

The urine disease maple syrup (MSUD) is a metabolic disorder of autosomal recessive pattern and, if untreated, causes severe neurological impairments. The pathophysiology of neurological deterioration in DXB is poorly understood; however radiological changes are well characterized. The aim of this study was to investigate whether the branched chain amino acids (BCAA) interfere in the regulation of immune and inflammatory processes in the central nervous system and cause brain swelling and effects of responsible mechanisms, and to evaluate the effects of dexamethasone administration on changes caused by the BCAA. The results demonstrate that acute administration of BCAA in infants rats decreased IL-10 levels and increased IL-6 levels in the hippocampus, cerebral cortex, while there was increase in IL-1 β levels of IL-6 and TNF- α . The BCAA administration in young rats did not alter cytokine levels in analyzed brain structures. On the other hand, after chronic administration there was decrease in IL-1 β and IL-6 in the cerebral cortex, the hippocampus while there was a decrease in the levels of IL-6, IL-10 and IFN- γ . Therefore, we evaluated the effect of acute administration of BCAA on the water content, the activity of the Na⁺, K⁺-ATPase and the permeability of the blood-brain barrier (BBB) in the hippocampus and cerebral cortex of rats infants, and the influence of dexamethasone administration. The results demonstrate that acute administration of cerebral edema caused BCAA, with the increase of water content in the brain. It was also observed a decrease in activity of the Na⁺, K⁺-ATPase and an increase in the content of sodium fluorescein, suggesting increased BBB permeability to small molecules, in the hippocampus and cerebral cortex. The dexamethasone administration is capable of preventing cerebral edema, inhibition activity of the Na⁺, K⁺-ATPase and was able to maintain the sodium fluorescein content similar to the control group in these structures. Finally, we evaluated the effects of treatment with dexamethasone on the levels of pro inflammatory cytokines and anti-rat infants undergoing acute administration of BCAA. The results demonstrated that treatment with dexamethasone was able to prevent the increase in IL-1 β and TNF- α levels in the cerebral cortex and increased IL-6 levels in the hippocampus and cerebral cortex. However, treatment with dexamethasone was unable to prevent a decrease in IL-10 levels caused by administration of BCAA. In conclusion, the results showed that the BCAA induce changes in the immune system in the brain of rats

subjected to the experimental model. Coupled with inflammation installed on animals it has been demonstrated that the BCAA cause cerebral edema in rats infants, and these effects may be directly related to inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase and with increasing BBB permeability, furthermore, it was observed that administration of dexamethasone reversed these effects.

Keywords: Maple syrup urine disease; Cytokines; Cerebral edema; Blood-brain barrier; Na^+ , K^+ -ATPase; Dexamethasone.

Lista de Figuras

- Figura 1:** Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada.....37
- Figura 2:** Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis de IL-10 no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 10 e 30 dias de idade.....59
- Figura 3:** Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis de IL-1 β e IL-6 no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 10 e 30 dias de idade.....60
- Figura 4:** Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis de TNF- α e INF- γ no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 10 e 30 dias de idade.....61
- Figura 5:** Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis de IL-10 no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante seu desenvolvimento.....62
- Figura 6:** Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis de IL-1 β e IL-6 no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante seu desenvolvimento.....63
- Figura 7:** Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis de TNF- α e INF- γ no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante seu desenvolvimento.....64
- Figura 8:** Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada e dexametasona sobre o conteúdo de água no cérebro de ratos de 10 dias de idade.....65
- Figura 9:** Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada e dexametasona sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em hipocampo e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade.....66
- Figura 10:** Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada e dexametasona sobre o conteúdo de Evan's Blue e o conteúdo de fluoresceína de sódio em hipocampo e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade.....67

Figura 11: Efeito da administração de dexametasona sobre os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α em hipocampo e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade submetidos à administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada.....68

Figura 12: Figura representativa dos efeitos dos aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis de citocinas em cérebro de ratos durante o seu desenvolvimento.....73

Figura 13: Figura representativa dos efeitos dos aminoácidos de amoniácidos de cadeia ramificada e da dexametasona sobre o edema cerebral em ratos de 10 dias de idade.....78

LISTA DE ABREVIATURAS

- AACR – Aminoácidos de cadeia ramificada
AChE – Acetilcolinesterase (do inglês *acetylcholinesterase*)
Ang-1 – Angiotensina 1 (do inglês *angiotensin 1*)
ANOVA – Análise de variância (do inglês *analise of variance*)
APC – Células apresentadoras de antígeno (do inglês *Antigen Presenting Cell*)
ATP – Adenosina trifosfato (do inglês *adenosine triphosphate*)
BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)
BHE – Barreira hematoencefálica
Ca²⁺ – Cálcio
CDCCR – Complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada
CEUA – Comissão de Ética para o Uso de Animais
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2 – Ciclo-Oxigenase 2
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DXB – Doença da urina do xarope do bordo
EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetra acetic acid*)
EIM – Erros inatos do metabolismo
ERK – Quinase regulada por sinais extracelulares (do inglês *extracellular signal-regulated kinase*)
ERO – Espécies reativas de oxigênio
GABA – Ácido gama-aminobutírico (do inglês *gamma-aminobutyric acid*)
GC – Glicocorticóides
H₂O – Água
HCl – Ácido clorídrico
HCl₂N – Dicloroamina (do inglês *dichloramine*)
HEPES – Ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N-2 etanesulfônico
H-MRS – Espectroscopia de prótons por ressonância magnética (do inglês *Proton magnetic resonance spectroscopy*)
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high-performance liquid chromatography*)
IBM – International business machines
ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular (do inglês *intercellular adhesion molecule*)

IkBa – Inibidor do fator nuclear kappa-B alfa (do inglês *Inhibitor kappa B-alpha*)
IL-10 – Inteileucina 10
IL-12 – Inteileucina 12
IL-13 – Inteileucina 13
IL-1RA – Inteileucina -1 receptor antagonista
IL-1 β – Inteileucina 1 β eta
IL-4 – Inteileucina 4
IL-6 – Inteileucina 6
IL-8 – Inteileucina 8
IL-2 – Inteileucina 2
INF- γ – Interferon gamma (do inglês *Interferon gamma*)
iNOS – Óxido nítrico-sintase induzida (do inglês *Inducible nitric oxide synthase*)
JNK – c-Jun N-terminal quinase (do inglês *Jun N-terminal kinase*)
K⁺ - Potássio
LPS – Lipopolissacarídeo
MHC – Complexo de histocompatibilidade principal (do inglês *major histocompatibility complex*)
MIP-1 α – Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (do inglês *Macrophage inflammatory protein 1 alpha*)
MMP – Metaloproteínas de matriz
MRI – Ressonância magnética (do inglês *Magnetic resonance imaging*)
Na⁺ - Sódio
NF- κ B – Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês *nuclear factor kappa B*)
NGF – Fator de crescimento neural (do inglês *nerve growth factor*)
NK – Natural Killer (do inglês *Natural Killer Cell*)
NO – Óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)
PBS – Tampão fosfato-salina (do inglês *phosphate-buffered saline*)
PI-3-Kinase – Fosfatidilinositol-3-cinase (do inglês *phosphoinositide 3-kinase*)
QI – Quociente de inteligência
SNC – Sistema nervoso central
SPSS – do inglês Statistical Package for the Social Sciences
SUS – Sistema Único de Saúde
TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta (do inglês *transforming growth factor β*)
Th-1 – Células T auxiliares do tipo 1 (do inglês *T helper cell type 1*)
Th-2 – Células T auxiliares do tipo 2 (do inglês *T helper cell type 2*)

TMB – Taxa metabólica basal

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês *tumor necrosis factor alpha*)

VCAM-1 – Proteína de adesão celular vascular (do inglês *vascular cell adhesion protein*)

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês *vascular endothelial growth factor*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	35
1.1 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO	35
1.1.1 Histórico.....	35
1.1.2 Etiologia.....	35
1.1.3 Metabolismo dos Aminoácidos de Cadeia Ramificada.....	37
1.1.4 Manifestações Clínicas.....	39
1.1.5 Diagnóstico e Tratamento.....	41
1.2 EDEMA CEREBRAL E DXB.....	43
1.3 RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	44
1.3.1 Citocinas.....	47
1.4 DEXAMETASONA.....	49
1.5 JUSTIFICATIVA.....	51
2 OBJETIVOS	52
2.1 OBJETIVO GERAL	52
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
3. METODOLOGIA	53
3.1 MODELO QUIMICAMENTE INDUZIDO DE DXB.....	53
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	53
3.3 DOSAGEM DE CITOCINAS.....	55
3.4 CONTEÚDO DE ÁGUA CEREBRAL.....	56
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA Na^+, K^+ -ATPASE.....	57
3.6 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA.....	57
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
4. RESULTADOS	59
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO

1.1.1 Histórico

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças genéticas causadas por um defeito específico (geralmente enzimático), que leva ao bloqueio de uma determinada via metabólica. Esse bloqueio tem como consequência o acúmulo do substrato da enzima deficiente, a diminuição do produto da reação ou o desvio do substrato para uma via metabólica alternativa (Karam et al., 2001; Pontes-Fernandes e Petean, 2011). Sua manifestação envolve um quadro de encefalopatia lenta e progressiva no recém-nascido, uma rápida deterioração clínica ao nascimento ou após um intervalo de boa saúde (Scriver et al., 2001).

A Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB, OMIM 248600) descrita inicialmente em 1954, por Menkes, Hurst e Craig, os quais, identificaram quatro casos de uma doença degenerativa cerebral em uma mesma família, caracterizada por edema cerebral, convulsões, espasticidade e sofrimento respiratório. A manifestação do quadro clínico ocorreu na primeira semana de vida e o prognóstico fatal dentro de três meses. O achado mais proeminente foi o odor forte de açúcar queimado na urina, o que deu a origem ao nome DXB (Menkes et al., 1954).

Por conseguinte, entre 1957 e 1959, Dancis et al. (1959) identificaram os compostos acumulados na urina e no plasma dos pacientes como os aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina e α -cetoácidos de cadeia ramificada derivados destes. Na década de 60 a deficiência do complexo enzimático responsável pela descarboxilação dos α -cetoácidos de cadeia ramificada foi identificada como causa bioquímica da DXB, através de estudos enzimáticos em leucócitos e fibroblastos de pacientes (Dancis et al., 1960).

1.1.2 Etiologia

A DXB é um distúrbio metabólico de início pós-natal, considerado uma patologia rara, de caráter autossômico recessivo e que, quando não tratada, implica em graves sequelas neurológicas (Chuang e Shih, 2001; De Simone et al., 2013). A incidência no mundo é de cerca de 1:185.000 nascidos vivos (Chuang e Shih, 2001).

As proteínas do organismo renovam-se constantemente e do seu catabolismo resultam aminoácidos que, por sua vez, serão reutilizados para a síntese de novas proteínas. Os aminoácidos leucina, isoleucina e valina são classificados como AACR essenciais, visto que o organismo não os consegue sintetizar, sendo obrigado a obtê-los através da alimentação (Chuang e Shih, 2001). Este processo contribui com mais de 60% na concentração de aminoácidos totais no plasma (Rodrigues, 2002).

A DXB é caracterizada pelo acúmulo destes AACR, sendo altamente tóxico para o Sistema Nervoso Central (SNC) (Nagabushana e Benakappa, 2014). O excesso dos AACR resulta de uma deficiente descarboxilação oxidativa dos α -cetoácidos de cadeia ramificada, ácido α -cetoisocapróico, ácido α -ceto- β -metilvalérico e ácido α -hidroxiisocapróico, bem como, dos seus hidroxíácidos correspondentes, ácido α -hidroxiisocapróico, ácido α -hidroxiisovalérico e ácido 2-hidroxi-3-metilvalérico, devido à deficiência do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR) (Figura 1) (Chuang e Shih, 2001).

O complexo CDCCR é um membro do grupo de complexos de desidrogenases de α -cetoácidos bastante conservados, possuindo três componentes catalíticos: uma α -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada heterotetramérica ($\alpha_2\beta_2$), ou E1; uma dihidrolipoil trasacilase (24 subunidades idênticas), ou E2; e uma di-hidrolipoamida desidrogenase homodimérica, ou E3. Os componentes E1 e E2 são específicos para CDCCR enquanto a proteína E3 é também componente dos complexos α -cetoglutarato e piruvato desidrogenase (Reed e Hackert, 1990). Além disso, o complexo CDCCR de mamíferos apresenta duas enzimas regulatórias; uma quinase e uma fosfatase que regulam a atividade do complexo através dos ciclos de fosforilação (inativação)/desfosforilação (ativação) de dois resíduos de serina da subunidade E1 α (Eisenstein et al., 1991; Peinemann e Danner, 1994).

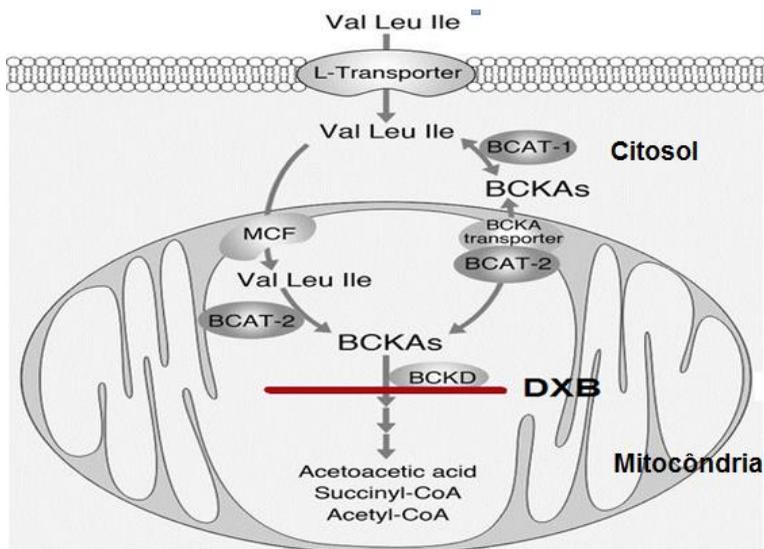


Figura 1: Rota catabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina. As duas primeiras reações comuns são catalisadas pelas seguintes enzimas: transaminação reversível pela aminotransferase dos AACR e a descarboxilação oxidativa dos cetoácidos de cadeia ramificada e esterificação da coenzima A pelo complexo α -cetoácido desidrogenase. Em destaque, demonstrando o bloqueio que ocorre na Doença da Urina do Xarope do Bordo, devido à deficiência do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (Adaptado de Wu et al., 2004).

1.1.3 Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada

Diferentemente de outros aminoácidos, que são oxidados primariamente no tecido hepático, o sistema enzimático mais ativo para a oxidação dos AACR está localizado no músculo esquelético (Shimomura et al., 2006a). Apesar do fígado não poder diretamente catabolizar os AACR, o mesmo apresenta um sistema muito ativo para a degradação dos α -cetoácidos de cadeia ramificada oriundos dos correspondentes AACR (Shimomura et al., 2006b). Essa distribuição tecidual específica do catabolismo dos AACR decorre da distribuição única das duas primeiras enzimas envolvidas no catabolismo dos AACR, ou seja, aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada que catalisa reversivelmente a transaminação dos AACR e o complexo CDCCR que catalisa irreversivelmente a descarboxilação oxidativa dos

α -cetoácidos de cadeia ramificada (Robinson e Srere, 1985; Shimomura e Harris, 2004).

A primeira reação envolvida no catabolismo dos AACR é a transaminação pelas isoenzimas aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada que são enzimas dependentes de piridoxal-fosfato (vitamina B6) e que aceitam os três AACR como substratos (Cynober e Harris, 2006). A partir da reação catalisada pela aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada, os AACR são convertidos nos seus respectivos α -cetoácidos, ou seja, a leucina é convertida em α -cetoisocapróico; a isoleucina em α -ceto- β -metilvalérico; e a valina em α -cetoisovalérico, bem como os seus hidroxíácidos correspondentes (Chuang e Shih, 2001). Concomitantemente, verifica-se que na reação catalisada pela aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada há a conversão de α -cetoglutarato, aceptor de nitrogênio oriundo dos AACR, em glutamato (Harris et al., 2005).

No que concerne à atividade tecidual da enzima aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada, verifica-se elevada atividade no coração e rim, atividade intermediária no músculo esquelético e baixa atividade no fígado. Além disso, cabe ressaltar que em células de mamíferos, duas aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada estão presentes, sendo uma mitocondrial e outra citosólica (Schadewaldt e Wendel, 1997).

Posteriormente à reação catalisada pela enzima aminotransferase de AACR e à consequente formação dos α -cetoácidos de cadeia ramificada, esses sofrem descarboxilação oxidativa irreversível mediada pelo complexo CDCCR presente na superfície interna da membrana interna da mitocôndria (Chuang e Shih, 2001). O CDCCR é o principal complexo enzimático regulatório na via catabólica dos AACR, sendo essa etapa considerada a controladora do fluxo do catabolismo dos AACR. A atividade do complexo CDCCR, diferentemente da atividade da aminotransferase de AACR, é maior no fígado, intermediária no rim e coração, e comparativamente baixa no músculo, tecido adiposo e cérebro (Harper et al., 1984).

Assim, por meio da reação catalisada pelo complexo CDCCR, os α -cetoácidos de cadeia ramificada α -cetoisocapróico, α -ceto- β -metilvalérico e α -cetoisovalérico são convertidos em isovaleryl-CoA, 3-metilbutiril-CoA e isobutiril-CoA, respectivamente. Posteriormente à segunda etapa do catabolismo dos AACR mediada pela CDCCR, os produtos dessa reação derivados de acil-CoA de cadeia ramificada sofrem oxidação por meio de duas diferentes desidrogenases. Após essa etapa, as vias catabólicas de cada um dos AACR passam a divergir,

produzindo os respectivos acil-CoAs ramificados que são metabolizados por vias específicas (Brosnan e Brosnan, 2006). A leucina apresenta como produtos finais a acetil-CoA e o acetoacetato, a valina é convertida exclusivamente a succinil-CoA e a isoleucina produz acetil-CoA e succinil-CoA (Chuang e Shih, 2001). Os AACR são, portanto, tanto cetogênicos, quanto glicogênicos, servindo como precursores para a síntese de ácidos graxos e do colesterol e também servindo como substrato para a produção de energia via succinil-CoA e acetoacetato (Harper et al., 1984; Treacy et al., 1992; Peinemann e Danner, 1994; Chuang e Shih, 2001).

1.1.4 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da DXB são variáveis e dependem da atividade enzimática residual, a qual será responsável por diferentes fenótipos clínicos, classificados em forma clássica, intermediária, intermitente, responsiva à tiamina e deficiência de lipoamida desidrogenase E3 (Casadevall et al., 1992; Chuang e Shih, 2001).

O fenótipo clássico ocorre em torno de 80% dos casos de DXB, sendo a forma mais comum e a mais grave da doença. Os recém-nascidos afetados permanecem estáveis dos 4 aos 7 dias de vida, quando então os efeitos do acúmulo dos AACR e dos α -cetoácidos de cadeia ramificada começam a ser observados. Esses pacientes apresentam apenas 0-2% da atividade normal do CDCCR, podendo resultar em uma concentração de leucina superior a 2000 $\mu\text{mol/L}$. As manifestações clínicas iniciais são inquietude e rejeição ao aleitamento, perda de peso e odor adocicado que lembra o odor do xarope do bordo presente na urina ou no cerúmen. Se não tratados, o quadro clínico pode evoluir para cetoacidose, hipoglicemia, opistótono, convulsões, hipotonia, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e disfunção neurológica em suas diferentes formas de expressão. Além disso, pode ser observada a presença de edema generalizado e hipomielinização/desmielinização no SNC desses pacientes, principalmente durante as crises de descompensação metabólica (Chuang e Shih, 2001; Chakrapani et al., 2001; Volpe, 2001; Schonberger et al., 2004).

O fenótipo intermediário é uma forma mais branda que evolui com os mesmos sintomas da DXB clássica, porém de forma mais lenta. Os pacientes apresentam de 0 a 30% da atividade enzimática do CDCCR (Bodamer e Lee, 2012). Assim, geralmente não são observados sintomas no período neonatal, mas podem ter o odor de xarope do bordo presente na urina e no cerúmen e níveis elevados dos AACR (Chuang e

Shih, 2001). Entretanto, os pacientes são vulneráveis às mesmas sequelas agudas ou crônicas dos pacientes com a forma clássica, incluindo a descompensação metabólica que pode levar ao óbito (Morton et al., 2002).

Na forma intermitente da doença, os pacientes apresentam 5-20% da atividade normal do CDCCR e os sintomas surgem mais tarde. Da mesma maneira que a forma intermediária, nesta forma o diagnóstico é tardio, uma vez que os níveis aumentados de AACR estão presentes apenas nas crises agudas, ocorrendo quando o paciente apresenta atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e/ou crises metabólicas agudas, normalmente precipitadas por um quadro infeccioso ou devido a sobrecarga proteica na dieta (Chuang e Shih, 2001; Wendel e Baulny, 2006). Além disso, o paciente tolera uma dieta normal nos períodos de remissão (Lu et al., 2009).

A DXB responsiva a tiamina é similar à forma intermediária. Os pacientes apresentam 2-40% da atividade normal do CDCCR, e consequentemente não apresentam sintomas no período neonatal. Além disso, os pacientes apresentam melhora clínica com a adição da vitamina B (tiamina) na dieta em concentrações supra fisiológicas que estabilizam o complexo enzimático (Oyarzabal et al., 2012).

A deficiência de E3 é um distúrbio bastante raro, sendo os sinais clínicos semelhantes à forma intermediária, mas acompanhado de acidose láctica grave. O lactato, o piruvato, o α -cetoglutarato, o α -hidroxiiisovalerato e o α -hidroxiglutarato estão aumentados neste fenótipo (Simon et al., 2006). A hiperalaninemia secundária ao acúmulo de piruvato é também frequente. Os AACR estão leve ou moderadamente aumentados no plasma, quando comparados aos níveis encontrados na forma clássica (Hoffmann et al., 2006). Quando surge acidose láctica persistente, entre 8 semanas e 6 meses de idade, ocorre a deterioração neurológica progressiva caracterizada por hipotonia, atraso no desenvolvimento e encefalopatia similar a de Leigh (Chuang e Shih, 2001).

A síndrome de Leigh também é conhecida como encefalomiopatia necrosante subaguda, encefalopatia necrosante de Leigh e encefalomiopatia necrosante de Leigh. É uma doença rara, que foi descrita por Denis Leigh em 1951. É uma enfermidade neurometabólica congênita, que faz parte do grupo das encefalopatias mitocondriais. Sabe-se que a alteração ocorre no metabolismo energético, sendo a principal causa de defeito na fosforilação oxidativa e geração de ATP celular (Roma et al., 2008).

1.1.5 Diagnóstico e Tratamento

Nos países em desenvolvimento, onde não há triagem neonatal para DXB na área da saúde pública, o diagnóstico geralmente é baseado em uma combinação dos sinais e sintomas, como irritabilidade, falta de apetite, letargia, apnéia intermitente e as alterações bioquímicas, em que altos níveis de leucina, isoleucina, ou valina são detectadas no soro por métodos quantitativos, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), autoanalisador de aminoácidos ou por espectrometria de massa em Tandem (Feier et al., 2014). Além disso, outras análises podem ser realizadas, como a avaliação da atividade enzimática do CDCCR em linfócitos, fibroblastos da pele ou biópsia de fígado (Schadewalt et al., 2001; Strauss et al., 2006).

As concentrações plasmáticas normais dos AACR, depois de 2 a 3 horas de ingestão de proteína, são: leucina entre 80-200 $\mu\text{mol/L}$ (1,0-2,6 mg/dl), isoleucina 40-90 $\mu\text{mol/L}$ (0,5-1,2 mg/dl) e valina 200-425 $\mu\text{mol/L}$ (2,3-5,0 mg/dl) (Wendel e Baulny, 2006). Entretanto, em pacientes com DXB não tratados, a leucina, principal metabólito acumulado na doença, pode atingir níveis plasmáticos de até 5 mM, enquanto a isoleucina e a valina atingem 1 mM (Zielke et al., 1996).

A triagem neonatal possibilita o diagnóstico e o tratamento antes das duas semanas de vida e tem melhorado muito o prognóstico de crianças portadoras de DXB. O teste do pezinho expandido tem o potencial de causar um bom impacto sobre o diagnóstico precoce e o tratamento bem sucedido de crianças com DXB (Strauss et al., 2010). Além disso, estudos demonstram que a espectroscopia de prótons por ressonância magnética (H-MRS) tem sido aplicada para fornecer informações adicionais para o diagnóstico radiológico das doenças neurodegenerativas, tumores cerebrais e doenças metabólicas, sendo o dado obtido dentro de 10 minutos, bem como, medidas não-invasivas de níveis de metabólitos diretamente regionais *in vivo* (Wang et al., 1996; Wang et al., 1998). A H-MRS evidencia sua utilidade na crise metabólica, sendo que na DXB clássica esta pode ser capaz de distinguir a DXB de outras doenças graves e iniciar precocemente o tratamento específico, principalmente quando interpretada em conjunto com a evolução clínica, exames físicos e achados laboratoriais de rotina (Silão et al., 2014).

Essencialmente, o tratamento da DXB visa restaurar a homeostase do metabolismo intermediário e evitar a descompensação metabólica através da manutenção da síntese de proteína normal e prevenção de catabolismo proteico, da prevenção de desequilíbrios ou

deficiências de aminoácidos e intermediários metabólicos, da atenuação da disfunção celular, da restauração da homeostase energética e da promoção de anabolismo (Strauss et al., 2006a).

Estes objetivos são alcançados com a restrição dietética dos AACR, através da administração de fórmulas proteicas artificiais livres dos mesmos, e suplementada com uma mistura de outros aminoácidos, carboidratos, vitaminas minerais e oligoelementos (Strauss et al., 2006a), bem como enriquecidas com aminoácidos essenciais (triptofano, tirosina, fenilalanina, metionina e treonina) que competem com os AACR pelo transportador de aminoácidos neutros no cérebro, visando diminuir o aporte de AACR para cérebro, uma vez que estes competem pelo mesmo transportador (Strauss et al., 2010).

Além disso, pode-se incluir ao tratamento o uso auxiliar da tiamina para pacientes responsivos (Danner e Elsas, 1989; Treacy et al., 1992; Jardim et al., 1995). Em casos de crises de desconspensação metabólica, outras estratégias, tais como diálise peritoneal, hemodiálise e hemofiltração podem ser utilizadas (Calvo et al., 2000; Le Roux et al., 2006; Strauss et al., 2006; Muelly et al., 2013). Além disso, estratégias podem ser tomadas para o tratamento do edema cerebral durante a sua evolução aguda, como por exemplo, o uso de diuréticos, solução salina hipertônica, manitol e suporte ventilatório (Morton et al., 2002).

Desta forma, o objetivo do tratamento é manter os níveis plasmáticos de leucina o mais próximo possível dos valores de referência, que se encontram entre 77 e 153 $\mu\text{mol/L}$ (Lepage et al., 1997) ou, preferencialmente, entre 100 e 300 μmol que são limites aceitáveis no sentido de evitar danos (Morton et al., 2002).

Embora a intervenção dietética impeça graves atrasos de desenvolvimento associados com hiperleucinemia crônica, alguns desafios ainda continuam como a manutenção e adesão à dieta e as evidências na evolução e controle dos déficits em longo prazo no desenvolvimento neurocognitivo (Le Roux et al., 2006; Walsh e Scott, 2010). De fato, estudos tem demonstrado que pacientes adultos com DXB, apresentam uma maior propensão para problemas neuropsiquiátricos crônicos, como transtorno de déficit de atenção, depressão e ansiedade, sugerindo que essas alterações podem ser decorrentes do déficit de alguns aminoácidos essenciais e neurotransmissores cerebrais como as catecolaminas e a serotonina (Le Roux et al., 2006; Strauss et al., 2006; Walterfang et al., 2013).

Outra opção terapêutica proposta recentemente é o transplante hepático, que pode deter a progressão da lesão cerebral mantendo os níveis dos AACR dentro dos limites aceitáveis, porém, não é capaz de

reverter os danos já existentes (Diaz et al., 2014). O transplante não pode melhorar o quociente de inteligência (QI) ou reverter os distúrbios psiquiátricos apresentados pelos pacientes com DXB (Muelly et al., 2013).

1.2 EDEMA CEREBRAL E DXB

Por definição, edema é o acúmulo de fluido dentro do parênquima cerebral, sendo classificado por Klatzo (1967) em vasogênico e citotóxico. De acordo com a classificação proposta, o edema vasogênico resulta do rompimento de junções apertadas de membrana das células endoteliais que formam a barreira hematoencefálica (BHE) permitindo a passagem de água, sódio (Na^+) e proteína para dentro do espaço intersticial, podendo acumular-se na substância cinzenta, e também na substância branca. Já o edema citotóxico é um processo intracelular que afeta neurônios e astrócitos. Sua causa é a ausência do aporte de energia, que interfere com os mecanismos da bomba iônica na membrana celular e leva ao acúmulo de sódio intracelular e consequente edema (Rosenberg, 2000; Hemphill et al., 2001; Unterberg et al., 2004).

A fisiopatologia da deterioração neurológica na DXB não é precisamente compreendida. No entanto, as alterações radiológicas estão bem caracterizadas. O padrão típico inicia com um achado de edema cerebral generalizado começando no final da primeira semana de vida (Brismar et al., 1990), este quadro evolui para um edema mais grave, afetando principalmente a substância branca profunda do cerebelo, tronco cerebral dorsal, pedúnculos cerebrais e a cápsula interna. Com o tratamento instituído resolve-se gradualmente o quadro do edema por volta da sexta ou sétima semana de vida (Brismar et al., 1990). Estudos relataram também a ocorrência de hipodensidade difusa no globo pálido e tálamo afetando a substância branca destas regiões o que é um indicativo de hipomielinização (Treacy et al., 1992). A fase aguda do edema também é seguida por alargamento do sulco sobre os lobos frontais e das fissuras inter-hemisférica e silviana, indicando atrofia cerebral. O trato piramidal da medula espinal, a mielina que circunda o núcleo dentado, o corpo caloso e os hemisférios cerebrais são os mais afetados (Chuang e Shih, 2001).

Jan et al. (2003) demonstraram uma difusão protônica marcadamente restrita, compatível com edema citotóxico ou da bainha intramielínica no tronco cerebral, gânglios basais, tálamo, cerebelo e substância branca periventricular e o córtex cerebral. Em 2013, Klee et

al. observaram que o sinal de anormalidade na substância branca dos adolescentes e jovens adultos sob controle dietético pode ser uma consequência de alterações estruturais, incluindo a dismielinização. Estudos de microscopia eletrônica em modelos animais de DXB demonstraram que vacúolos intramielínicos são formados por meio do acúmulo de água entre as lamelas mielínicas para formar o edema intramielínico (Morton et al., 2002). Neste contexto, o edema cerebral que ocorre durante as crises de descompensação metabólica aguda tanto consiste de um edema vasogênico global, que é pensado por ser relacionado com a função comprometida da BHE, como de um edema citotóxico secundário a desregulação enérgica e osmótica (Jan et al., 2003; Righini et al., 2003; Sakai et al., 2005).

Embora o edema cerebral seja comum em pacientes com DXB, os mecanismos envolvidos ainda são pouco entendidos. Strauss et al. (2003) sugerem a hipótese de que a concentração de leucina no plasma se correlaciona apenas indiretamente com o grau de inchaço e edema cerebral grave, e que as lesões neurológicas são mais relacionadas com a taxa de variação da leucina plasmática e com uma diminuição da osmolaridade do sangue. Além disso, os mesmos autores mostraram que os indivíduos com DXB apresentaram aumento da vasopressina plasmática e uma urina concentrada ao máximo, sugerindo que o aumento dos níveis de leucina no sangue e cérebro, a desidratação hiperosmolar e o aumento prolongado da vasopressina são fatores de risco para a absorção excessiva e anormal de água e Na^+ para o desenvolvimento do edema cerebral.

Por fim, Strauss et al. (2010) descreveram que o edema cerebral na DXB é compreendido secundariamente a uma combinação de aumento dos níveis de AACR cerebrais, frente a níveis diminuídos de outros aminoácidos como glutamina e aspartato, bem como dos neurotransmissores glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA).

1.3 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória, um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis (Parkin e Cohen, 2001) com a finalidade de remover o estímulo indutor da resposta e iniciar a recuperação tecidual local (Abbas e Lichtman, 2003). Durante a inflamação, vários sistemas bioquímicos são ativados, como exemplo, as cascatas do sistema complemento e da

coagulação, auxiliando no estabelecimento, evolução e resolução do processo (Barrington et al., 2001).

O sistema imunológico é constituído por uma intrincada rede de órgãos, células e moléculas, e tem por finalidade manter a homeostase do organismo, combatendo as agressões em geral. Sua função imunológica é dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa (Medzhitov e Janeway, 2000). A imunidade inata representa uma resposta rápida e estereotipada a um número grande, mas limitado, de estímulos (Fujiwara e Kobayashi, 2005). É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato (Medzhitov e Janeway, 2000). As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK), tendo como primeiros mecanismos de defesa os processos de fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como, síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (Yokoyama et al., 2004). Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas (Cartier et al., 2005). As principais características da resposta adquirida são: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo (Kalesnikoff e Galli, 2008). Embora as principais células envolvidas na resposta imune adquirida sejam os linfócitos, as células apresentadoras de antígenos desempenham papel fundamental em sua ativação, apresentando antígenos associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) para os linfócitos T (Delves e Roitt, 2000).

A inflamação associada ao SNC, denominada de neuroinflamação, difere da encontrada em outros tecidos e órgãos periféricos, pois o SNC apresenta uma limitada reatividade imune e inflamatória, devido a menor expressão de moléculas do MHC, pelo baixo número de células apresentadoras de antígenos (APC) e pela presença da BHE que previne não somente agentes nocivos, como também leucócitos circulantes e anticorpos de entrarem no cérebro (Petty e Lo, 2002). Durante eventos lesivos, ocorre a ativação de células apresentadoras de antígenos, como células microgliais e dendríticas, que interagem com as células T auto-reativas iniciando uma resposta imunológica capaz de estimular a produção de fatores neurotróficos,

como citocinas, e estabelecer um fenótipo microglial protetor, evitando uma lesão mais pronunciada (Muhallab et al., 2002; Moalem et al., 2005).

A neuroinflamação envolve dois tipos de sistemas imunitários: sistema hematopoiético (linfócitos, monócitos e macrófagos) e células microgliais do SNC. A inflamação de células endoteliais induz a alterações na BHE e consequente aumento da permeabilidade dos capilares (Hansson, 2010). Na imensa maioria dos casos, apenas a microglia e os astrócitos são ativados, sendo esses dois tipos celulares, em especial o primeiro, os responsáveis pela resposta imunológica no SNC (Liberto et al., 2004; Rock et al., 2004). As células microgliais são derivadas a partir de células mielóides na periferia e compreendem aproximadamente 10-20% das células gliais, localizando-se predominantemente na substância cinzenta (Block et al., 2007).

O principal papel da microglia na resposta imune do SNC é promover a fagocitose de restos de tecido após a lesão, sendo considerada como o mais importante tipo de célula na neuroproteção e no reparo do tecido pós-lesões, devido a sua plasticidade e reatividade a um amplo espectro de estímulos (Minghetti e Levi, 1998; Rock et al., 2004; Streit et al., 2005). A microglia contribui para o processo neurodegenerativo através da liberação de uma variedade de fatores neurotóxicos. O glutamato, um importante neurotransmissor excitatório, quando em elevadas concentrações pode levar à excitotoxicidade (Takeuchi et al., 2006). Outras substâncias podem ser liberadas como fatores de crescimento (fator de crescimento tumoral beta (TGF- β)), citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)), espécies reativas de oxigênio (ERO), óxido nítrico (NO), quimiocinas, mediadores lipídicos, fatores de coagulação, componentes da matrix extracelular e prostaglandinas (Rock et al., 2004; Nakamura, 2002; Sommer e Kress, 2004; Ouchi et al., 2009).

Contudo, o processo inflamatório, quando não exacerbado, é benéfico por contribuir para a liberação de fatores neurotróficos (Block et al., 2007). Tendo em vista o papel do sistema imune na recuperação de lesões do SNC, Ziv e Schwartz (2008) propuseram a ideia de que células T autoimunes não são importantes apenas para a recuperação do SNC em processos patológicos, mas também para a sustentação dos estados fisiológicos e do correto funcionamento dos processos cognitivos. Essa proposta foi baseada em estudos anteriores nos quais se evidenciou que camundongos desprovidos de sistema imunológico (SCID e *nude*) apresentam neurogênese hipocampal reduzida em

comparação com o fenótipo selvagem, que poderia ser parcialmente restaurada pela adição de um sistema imune a esses animais (Ziv et al., 2006). Outro dado interessante é o desempenho reduzido desses animais em tarefas de memória espacial (Labirinto aquático de Morris), que dependem de hipocampo, tendo seu desempenho melhorado pelo restabelecimento do sistema imune (Kipnis et al., 2004), similarmente ocorre com o processo de neurogênese, indicando um papel essencial do componente imunológico sobre o correto funcionamento do SNC.

1.3.1 Citocinas

As citocinas são pequenas proteínas, com peso molecular de 8 a 40 kDa, que podem ser produzidas em todos os tecidos e pela maioria das células dos sistemas imune inato e adaptativo (Chiche et al., 2001), formando um grupo de proteínas de sinalização intercelular que regulam respostas inflamatórias e imunológicas locais e sistêmicas. São também, reguladores centrais do crescimento e diferenciação de leucócitos, sendo produzidas durante as fases efetoras da imunidade natural e da específica, mediando e regulando as respostas imunes e inflamatórias. Sua secreção é um evento breve e autolimitante, sendo produzidas por vários tipos celulares distintos e atuando sobre várias células (Goncharova e Tarakanov, 2007).

As citocinas podem ser classificadas de acordo com a sua ação, como citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e IFN- γ) que ativam os macrófagos, células NK, células T e células B e a proliferação de imunoglobulinas, bem como citocinas anti-inflamatórias (IL-1RA, IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) que reduzem a resposta inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão de monócitos (Remick, 2003). Além disso, as citocinas também podem ser classificadas pela fonte de produção do linfócito T helper 1 (Th-1) ou T helper 2 (Th-2). Os linfócitos Th1 liberam citocinas que ampliam a resposta imunológica celular e são principalmente pró-inflamatórias, enquanto que os linfócitos Th-2 liberam citocinas que ampliam a resposta humoral e são principalmente anti-inflamatórias (Goncharova e Tarakanov, 2007).

A ação das citocinas ocorre pela ligação a receptores específicos na superfície da célula alvo e podem desempenhar muitas funções, como, ativação e proliferação celular, quimiotaxia de outras células, imunomodulação, liberação de outras citocinas ou mediadores inflamatórios, favorecendo o crescimento e a diferenciação celular, além de apoptose (Yamagata e Ichinose, 2006). Comprovadamente, muitas

funções originalmente atribuídas a uma citocina são propriedades compartilhadas por diversas citocinas diferentes. Da mesma forma, a síntese de uma citocina pode ser influenciada por outra, levando à formação de cascatas em que uma segunda ou terceira citocina podem mediar às ações biológicas da primeira. Duas citocinas podem interagir, antagonizando mutuamente suas ações, produzindo efeitos aditivos ou, em alguns casos, produzir efeitos superiores ao antecipado, efeitos singulares num tipo de reação conhecida como sinergismo, e podem agir de forma autócrina (na própria célula produtora da citocina) ou parácrina (nas células vizinhas) (Abbas e Lichtman, 2007).

Dentre as diversas citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α possui um importante papel inicial na resposta inflamatória, sendo produzido tanto por células da imunidade natural quanto da imunidade adquirida. As respostas biológicas relacionadas a esta citocina ocorrem por meio de ligação altamente específica a receptores presentes na membrana celular, que diferem nas suas afinidades de ligação e vias de sinalização intracelular, levando a ativação de diversos mecanismos intracelulares, como a ativação de caspases, fator de transcrição nuclear-kapaB (NF-kB), proteína cinase de c-Jun n-terminal (JNK), quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) e fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), bem como a ativação de linfócitos, estimulação da liberação de enzimas proteolíticas pelos macrófagos e produção de outras citocinas pró-inflamatórias (Stanger et al., 1995; Hsu et al., 1996; Kischkel et al., 2000; Dempsey et al., 2003; Popa et al., 2007).

A IL-1 β é uma citocina presente na resposta imune inata, produzida por monócitos e macrófagos (Dinarello, 1996), que atrai e ativa células do sistema imune e controla a expressão da maioria dos genes imunomodulatórios (Bowe e O'Neill, 2000). Esta interleucina tem um papel semelhante ao do TNF- α e são estimuladas pela presença de endotoxinas bacterianas, vírus, fungos e antígenos parasitários (Distefano et al., 2004). O TNF- α e a IL-1 β estimulam a liberação de neutrófilos da medula óssea, aumentando a população de células inflamatórias circulantes. Outra citocina com papel central na resposta inflamatória é a IL-6, essa citocina faz parte dos processos da imunidade inata e da adquirida, sendo produzida por monócitos, macrófagos, células endoteliais, astrócitos, fibroblastos, linfócitos T e B em resposta ao TNF- α e a IL-1 β e a algumas células T ativadas (Sparacio et al., 1992; Beyaert et al., 1996; Hirota et al., 2005). A IL-6 eleva-se após a IL-1 β e seus níveis são ascendentes mesmo 8 horas após a estimulação, quando os níveis de IL-1 β já diminuíram significativamente (Pavcnik-Arnol et al., 2004). As citocinas IL-1 β e IL-6 incrementam a

hematopoiese, ao agir sinergicamente com a IL-3 e outros fatores estimuladores de colônias da medula óssea. Também ativam a produção de anticorpos pelas células B e são importantes reguladoras da função das células T (Anderson e Blumer, 1997).

Por outro lado, a IL-10 é uma citocina com propriedade anti-inflamatória, produzida por células Th2 CD4⁺, células B, monócitos e macrófagos ativados (Couper et al., 2008; Clark et al., 2013). Essa citocina atua reprimindo a expressão de citocinas inflamatórias, por inibir a síntese de vários mediadores inflamatórios normalmente secretados por monócitos e macrófagos ativados, como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α (Thompson-Snipes et al., 1991; Mocellin et al., 2001).

1.4 DEXAMETASONA

A dexametasona é um glicocorticoide (GC) muito potente, com fraca atividade mineralocorticoide. Desde a sua introdução na prática clínica, nos princípios de 1950, os glicocorticóides têm representado importante e muitas vezes decisivo instrumento terapêutico no manejo de várias patologias (Caldas e Schrank, 2001).

Os GC pertencem à classe dos hormônios esteróides, com um núcleo básico derivado do colesterol-ciclopentano perhidrofenantreno. O representante natural é o cortisol ou hidrocortisona, um composto com 21 átomos de carbono. Como característica os GC atravessarem a membrana lipoprotéica das células, ligando-se a receptores citosólicos e exercendo sua ação no interior do núcleo, onde interagem com o ácido desoxirribonucleico (DNA) (ação genômica) ou com outras proteínas implicadas no processo de transcrição (ação não genômica, específica ou inespecífica). Um outro mecanismo envolvido é de uma ação também não dependente de genoma, isto é, não dependente de uma ação intranuclear. Este mecanismo de ação foi observado através dos efeitos *in vitro* na respiração, na síntese de proteínas e na ação da Na⁺,K⁺-ATPase e Cálcio (Ca²⁺)-ATPase em tímócitos. Este mecanismo de ação tem importância clínica, pois, pode explicar a ação rápida de alguns glicocorticóides, justificando seu uso em corticoterapia de pulso (Damiani et al., 2001).

O mecanismo clássico de ação dos GC implica a ligação do esteróide a receptores citosólicos que, dimerizados, dirigem-se ao núcleo celular e ligam-se a regiões promotoras do DNA onde, na maioria das vezes, induzem à transcrição. Os glicocorticóides inibem a transcrição de várias citocinas que são relevantes na resposta inflamatória, como IL-1, IL-2, IL-6, IL-11, TNF- α e quimiocinas que atraem as células

inflamatórias ao local de inflamação (incluindo IL-8 e eotaxina). Inibem a ação da síntese do ácido nítrico, enzima cuja indução por citocinas pró-inflamatórias pode aumentar a produção de ácido nítrico. A inibição desta enzima leva a uma diminuição do fluxo sanguíneo e da exsudação plasmática. Inibem a indução do gene codificador do COX-2 (Ciclo-Oxigenase 2) em monócitos, além de inibir a transcrição de uma forma de fosfolipase A2 induzida por citocinas. Reduzem a ativação, proliferação e a sobrevivência de eosinófilos e linfócitos T, além de bloquear a liberação de várias citocinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13), que são importantes no recrutamento e sobrevivência de células envolvidas no processo inflamatório. Este processo leva à morte celular programada ou apoptose. O mecanismo molecular de indução de apoptose pelos glicocorticóides é incerto. Por outro lado os glicocorticóides diminuem a apoptose e aumentam a sobrevivência de neutrófilos. Ao mesmo tempo, os glicocorticóides inibem o acúmulo de neutrófilos nos sítios da inflamação. Em relação às células envolvidas na resposta inflamatória em si, os glicocorticóides inibem a liberação de citocinas de macrófagos (Barnes, 1998).

Estudos demonstram que a dexametasona promove a reparação de nervos periféricos num modelo animal de lesão do nervo ciático, através da inibição da infiltração de células CD3-positivas, bem como sobre a regulação da expressão de GAP-43. Estes resultados fornecem uma nova visão sobre os efeitos neuroprotetores e neurotróficos da dexametasona e apoia essa terapia clínica em lesão do nervo periférico (Feng e Yuan, 2015). Outro estudo, demonstrou que a dexametasona combinada com outros antibióticos leva a diminuição das concentrações de UIL-6 e UIL-8 durante a fase aguda da pielonefrite em comparação com a terapia de antibiótico padrão (Sharifian et al., 2008).

A dexametasona também pode estar envolvida na regulação tanto transcelular e via paracelular, conforme sugere um estudo realizado para determinar se a mesma teve um efeito nos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} e proteína ocludina na BHE do tumor. Usando um modelo de glioma de cérebro de rato, descobriu-se que a expressão da proteína K e canais de proteína ocludina foi significativamente aumentada no tecido do tumor cerebral depois do tratamento com dexametasona durante 3 dias. Em comparação com o grupo controle, os níveis de corante azul de Evans foi grandemente atenuado nos animais tratados com dexametasona (Gu et al., 2009).

1.5 JUSTIFICATIVA

Pacientes com DXB mostram extensos danos no cérebro, apresentando edema cerebral generalizado, que quando não tratado podem evoluir para disfunção neurológica em suas diferentes formas de expressão. Embora estejam elucidados os vários fenótipos clínicos da DXB, a fisiopatologia dos danos cerebrais dos pacientes com esta doença ainda é pouco conhecida. O equilíbrio correto entre as atividades pró e anti-inflamatórias é fundamental para a preservação da homeostase do tecido. Estudos em animais têm demonstrado que um desequilíbrio nos AACR, principalmente nos níveis de leucina, está associado com uma supressão da resposta imune (Marshall et al., 1987), sendo estes capazes de modular a resposta inflamatória (Coeffier et al., 2001; Huang et al., 2003a; Huang et al., 2003b; Son et al., 2005; Hubert-Buron et al., 2006). Além disso, estudos têm proposto que o edema observado nos pacientes com DXB pode ser caracterizado com um edema vasogênico global e citotóxico. No entanto, o impacto dos AACR sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias e os mecanismos envolvidos com o edema cerebral permanecem obscuros. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da administração aguda e crônica de AACR sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, o edema cerebral, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e a permeabilidade da BHE em cérebro de ratos. Considerando que os AACR, acumulados na DXB, provocam edema cerebral e de que uma terapia mais efetiva é necessária para prevenir os danos causados pelo edema cerebral, também investigou-se a influência da administração de dexametasona sobre as alterações provocadas pelos AACR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desta tese foi investigar se a administração dos AACR, que se acumulam na DXB, interferem na regulação de processos imunológicos/inflamatórios no SNC, causam edema cerebral e os mecanismos responsáveis por esse efeito, bem como avaliar os efeitos da administração de dexametasona sobre as alterações provocadas pelos AACR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

–Avaliar os níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e INF- γ) em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos submetidos à administração aguda e crônica dos AACR.

–Avaliar o efeito da administração aguda de AACR sobre o conteúdo de água em hipocampo e córtex cerebral de ratos com 10 dias de idade, e a influência da administração de dexametasona sobre as alterações provocadas pelos AACR.

–Avaliar o efeito da administração aguda de AACR, sobre a permeabilidade da BHE ao corante Evan's blue e a fluoresceína de Na⁺, a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase e os níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α) em hipocampo e córtex cerebral de ratos com 10 dias de idade, bem como a influência da administração de dexametasona sobre as alterações provocadas pelos AACR.

3 METODOLOGIA

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), lei Arouca nº 11.794/2008. Este projeto foi executado após aprovação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob os protocolos número 83/2012 e 87/2013-2 (anexo 1).

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, infantes (7 e 10 dias de idade) e jovens (30 dias de idade) obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais de 7 e 10 dias de idade foram deixados com suas mães até o dia final do experimento, e os ratos de 30 dias de idade foram desmamados aos 21 dias de vida. Após o desmame, os ratos foram colocados em caixas em grupos de cinco, com ciclo claro - escuro de 12 horas (07:00 às 19:00) (Claro 7:00h) e comida e água *ad libitum*, com ambiente mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.1 MODELO QUIMICAMENTE INDUZIDO DE DXB

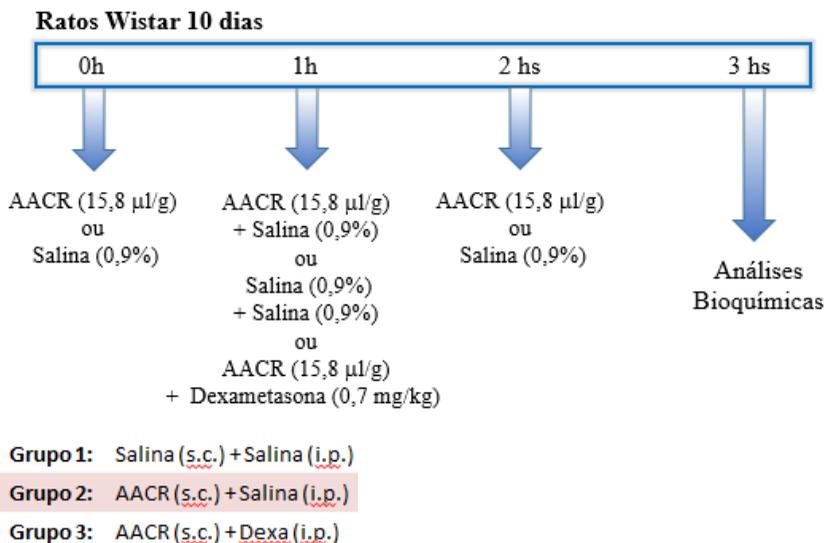
Para o presente estudo foi utilizado um modelo quimicamente induzido proposto por Bridi et al. (2006) através da administração subcutânea de uma associação de AACR, conteúdo leucina (190 mmol/L), isoleucina (59 mmol/L) e valina (69 mmol/L). A administração dos AACR induz um aumento significativo dos AACR (leucina, isoleucina e valina) em ratos com 10 e 30 dias, em valores semelhantes aos observados nos pacientes com DXB, bem como uma diminuição concomitante nas concentrações plasmáticas de metionina, fenilalanina, tirosina, histidina, alanina, lisina, ornitina e triptofano.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento do estudo, os experimentos foram divididos em dois protocolos, conforme descrito abaixo.

Protocolo 1 - Administração aguda e crônica de AACR em ratos durante o seu desenvolvimento: Neste protocolo experimental

Ratos infantis (10 dias) receberam três administrações subcutâneas, com intervalo de uma hora entre elas, de um *pool* de AACR (15,8 µl/g) ou salina (grupo controle). Uma hora após a primeira administração, tanto os animais do grupo AACR, quanto os animais do grupo salina, foram divididos em dois subgrupos, e submetidos a uma única administração intraperitoneal de dexametasona (0,7 mg/kg) ou salina (Cassol et al., 2010; Barichello et al., 2011) (Esquema 3).



Esquema 3: Protocolo agudo em animais de 10 dias de idade, os animais foram submetidos ao tratamento com dexametasona.

3.3 DOSAGEM DE CITOCINAS

Uma hora após a última administração (administração aguda - protocolos experimentais 1 e 2) e doze horas após a última administração (administração crônica – protocolo experimental 1) os animais sofreram eutanásia por decapitação, e o hipocampo, estriado e córtex cerebral foram isolados e homogeneizadas em tampão fosfato-salina (PBS) gelado (pH 7,4). Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 800 x g por 10 minutos, o sobrenadante obtido foi separado e a proteína determinada pelo método de Lowry et al. (1951) usando albumina sérica bovina como padrão.

As concentrações de citocinas foram mensuradas com a utilização de kits comerciais (Peprotech[®] e Life Technologies[®]) por meio dos sobrenadantes. Para tal, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo monoclonal anti-rato IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α e INF-γ (anticorpos de captura) e incubadas *overnight* (a 4°C). Após este período, os poços foram lavados por 3 vezes com tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS pH 7,2). Posteriormente, as placas foram bloqueadas com 200 µL de solução de bloqueio (1% de BSA) em PBS pH 7,2 e incubadas por 4 horas em temperatura ambiente, a fim de evitar ligações inespecíficas. Após o término da incubação, os poços foram novamente lavados conforme anteriormente descritos. Após as lavagens, 100 µL de amostras e/ou padrões diluídos previamente em solução padrão de diluição (0,05% de Tween 20; 0,1% de BSA em PBS pH 7,2) foram adicionados aos poços em duplicata. As placas foram cobertas e novamente incubadas *overnight* (a 4°C). Após este período, os poços foram lavados e adicionados 100 µL dos anticorpos de detecção anti-rato biotinizados IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α e INF-γ, previamente diluídos em solução padrão de diluição. As placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados e após o processo de lavagem, 100 µL do polímero espstreptavidina peroxidase foram adicionados aos poços, sendo as placas cobertas por papel alumínio e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, os poços foram lavados por 5 vezes com o tampão de lavagem e 100 µL da solução substrato TMB foram adicionados, seguido de incubação por mais 30 minutos em temperatura ambiente, evitando contato direto com a luz. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de solução de ácido clorídrico (HCl) 2N sobre os poços, reação esta caracterizada por mudança de coloração azulada para amarelada. Imediatamente após, as placas foram lidas com o auxílio de um espectrofotômetro Spectramax M2 utilizando filtro de 450 nm.

3.4 CONTEÚDO DE ÁGUA CEREBRAL

A avaliação do edema cerebral foi realizada pelo método de secagem e pesagem com base no registro do teor de água no cérebro (Durmaz et al., 2003). Uma hora após a última administração dos AACR, os animais do protocolo experimental 2 sofreram eutanásia por decapitação e o córtex cerebral e hipocampo foram isolados. Imediatamente após, o tecido cerebral foi colocado sobre um papel filtro para a remoção do excesso de água. Posteriormente os mesmos foram

colocados em cápsulas de porcelana, previamente seca em estufa, e pesados. Em seguida, o tecido cerebral na cápsula de porcelana foi colocado em uma incubadora com temperatura e unidade constantes durante 24 horas a 100 °C. Após vinte e quatro horas o cérebro seco na cápsula de porcelana foi pesado novamente. A percentagem de água foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: % de H₂O = [(peso úmido - peso seco) / peso úmido] X 100.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA Na⁺,K⁺-ATPase

Uma hora após a última administração dos AACR, os animais do protocolo experimental 2 sofreram eutanásia por decapitação, o cérebro foi rapidamente removido, e o hipocampo e córtex cerebral isolados e homogeneizados em solução de sacarose 0,32 mM (1:10, p/v), contendo HEPES 5,0 mM e EDTA 1,0 mM, pH 7,5. Os homogeneizados foram centrifugados a 1000 x g durante 10 minutos e os sobrenadantes foram utilizados para determinação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase. A proteína foi medida pelo método de Lowry et al. (1951) utilizando albumina de soro bovino como padrão.

A mistura de reação para a avaliação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase continha MgCl₂ 5,0 mM, NaCl 80,0 mM, KCl 20,0 mM e Tris-HCl 40,0 mM, pH 7,4, em um volume final de 200 µL. Após 10 minutos de pré-incubação a 37°C, a reação foi iniciada pela adição de adenosina trifosfato (ATP) até uma concentração final de 3,0 mM, e foi incubada durante 20 minutos. Os controles foram efetuados sob as mesmas condições, com a adição de 1,0 mM de ouabaina. A atividade da Na⁺,K⁺-ATPase foi calculada pela diferença entre os dois ensaios de acordo com o método de Wyse et al. (2000).

3.6 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

A avaliação da permeabilidade da BHE foi realizada utilizando o corante de Evan's blue (peso molecular de 961 kDA) e o corante fluoresceína de Na⁺ (peso molecular 332 kDA). Após a última administração do *pool* de AACR ou salina, os animais do protocolo experimental 2 receberam uma única injeção de Evan's blue a 1% (peso/volume em PBS, intraperitoneal) (Coimbra et al., 2007) ou fluoresceína de Na⁺ (20 mg/kg em PBS, intraperitoneal) (Yokoo et al., 2012). Uma hora após, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e perfundidos com salina heparinizada (1

U/mL) através do ventrículo esquerdo a uma pressão de 100 mmHg até a obtenção de um líquido de perfusão incolor pelo átrio direito (Belayev et al., 1996).

Imediatamente após a reperfusão, os animais foram decapitados, e o hipocampo e córtex cerebral foram isolados. Posteriormente, as estruturas foram pesadas e homogeneizadas numa solução de tricloroacético a 50% e alíquotas foram separadas para avaliação do teor de Evan's Blue e fluoresceína de Na^+ . Uma alíquota foi neutralizada com NaOH 5N e medida por fluorimetria (excitação 485 nm, emissão 538 nm) para determinação de fluoresceína de Na^+ . A outra alíquota foi centrifugada durante 10 minutos a $10.000 \times g$ (4°C), o sobrenadante foi diluído em etanol (1:3), e a fluorescência foi quantificada usando um leitor de microplacas de fluorescência (SpectraMax M2) (excitação: 620 nm, emissão: 680 nm). Os cálculos do valor de amostra foram baseados em padrões de corante Evan's blue e fluoresceína de Na^+ misturados com o mesmo solvente (Uyama et al., 1988; Yokoo et al., 2012).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como a média \pm desvio padrão. Os testes para determinar a normalidade e igualdade de variância foram realizados para verificar se os dados estavam qualificados para a realização de testes estatísticos paramétricos. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) com variâncias iguais entre as amostras (teste de igualdade de variâncias, $p > 0,05$). Por isso, foi utilizado o teste t de *Student* para a comparação de duas médias. Para comparação de três ou mais médias foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de Post Hoc Tukey e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas em um computador compatível com IBM usando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (Armonk, New York, USA).

4 RESULTADOS

Primeiro, analisou-se os efeitos da administração aguda dos AACR sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no córtex cerebral, hipocampo e estriado em ratos com 10 e 30 dias de idade. Demonstrou-se que a administração aguda de AACR em animais com 10 dias de idade causou uma diminuição significativa nos níveis de IL-10 apenas no hipocampo (Figura 2A). A administração de AACR em animais de 30 dias de idade não causou alterações significativas no hipocampo, córtex cerebral e estriado, quando comparados com o grupo de controle (Figura 2B).

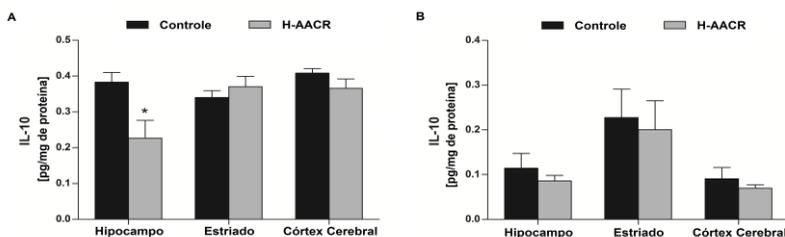


Figura 2: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis de IL-10 no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade (A) e 30 dias de idade (B). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

Posteriormente, observou-se que a administração aguda de AACR em animais com 10 dias de idade aumentou os níveis de IL-1 β e IL-6 no córtex cerebral, enquanto que no hipocampo observou-se um aumento apenas nos níveis de IL-6. Além disso, não foram observadas alterações significativas nos níveis de IL-1 β e IL-6 no estriado, quando comparados com o grupo de controle (Figura 3A e 3C). Por outro lado, os níveis de IL-1 β e IL-6 não foram alterados significativamente no hipocampo, córtex cerebral e estriado após a administração de AACR em animais de 30 dias (Figura 3B e 3D).

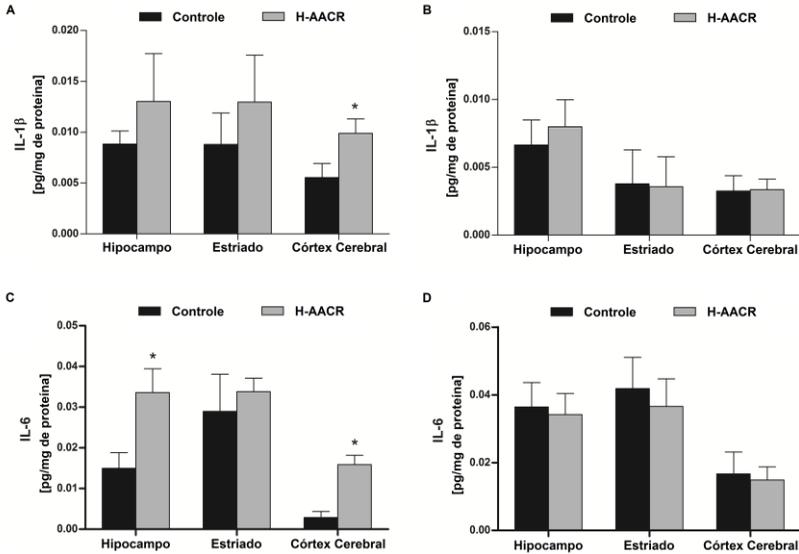


Figura 3: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis de IL-1 β e IL-6 no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade (A/C) e 30 dias de idade (B/D). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

Por fim, observou-se que a administração de aguda AACR causou um aumento nos níveis de TNF- α no córtex cerebral em animais com 10 dias de idade (Figura 4A), enquanto que os níveis de TNF- α não foram alterados nos animais com 30 dias de idade (Figura 4B). Além disso, não foram observadas alterações significativas nos níveis de INF- γ de animais com 10 e 30 dias de idade, quando comparados com o grupo controle (Figura 4C e 4D).

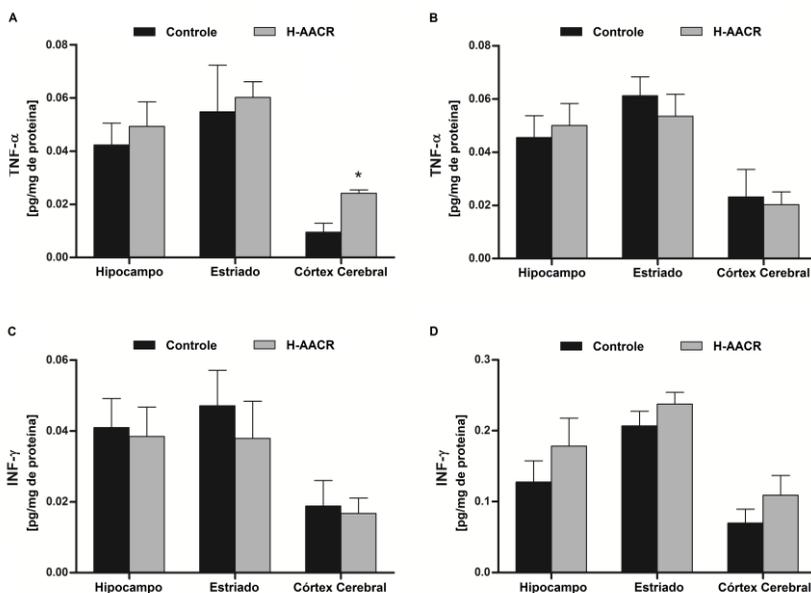


Figura 4: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis de TNF- α e INF- γ no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade (A/C) e 30 dias de idade (B/D). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student).

No presente trabalho também foi investigado o efeito da administração crônica de AACR sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos. A Figura 5 demonstra que após a administração de AACR os níveis de IL-10 foram diminuídos significativamente no hipocampo, quando comparados com o grupo controle. Enquanto que os níveis de IL-10 não foram alterados no estriado e córtex cerebral (Figura 5).

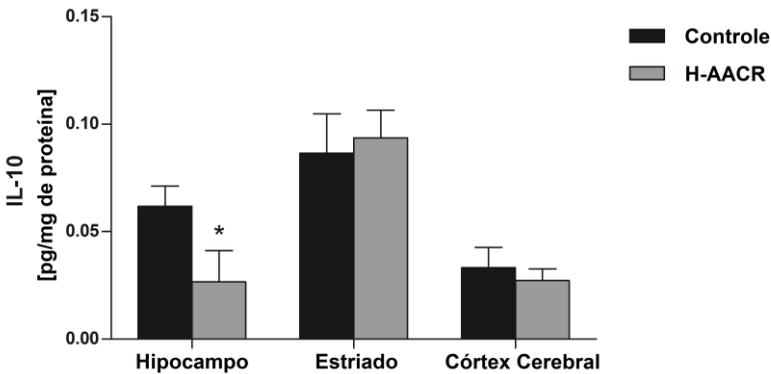


Figura 5: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis de IL-10 no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante seu desenvolvimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste de Tukey).

Quando avaliado os níveis de IL-1 β e IL-6, observou-se que diferentemente da administração aguda, quando os animais foram submetidos à administração crônica de AACR houve uma diminuição significativa nos níveis de IL-1 β no córtex cerebral, enquanto que no hipocampo e no estriado não foram observadas alterações significativas (Figura 6A). Além disso, demonstrou-se também que os níveis de IL-6 foram diminuídos significativamente no hipocampo e no córtex cerebral, quando comparados com o grupo controle (Figura 6B).

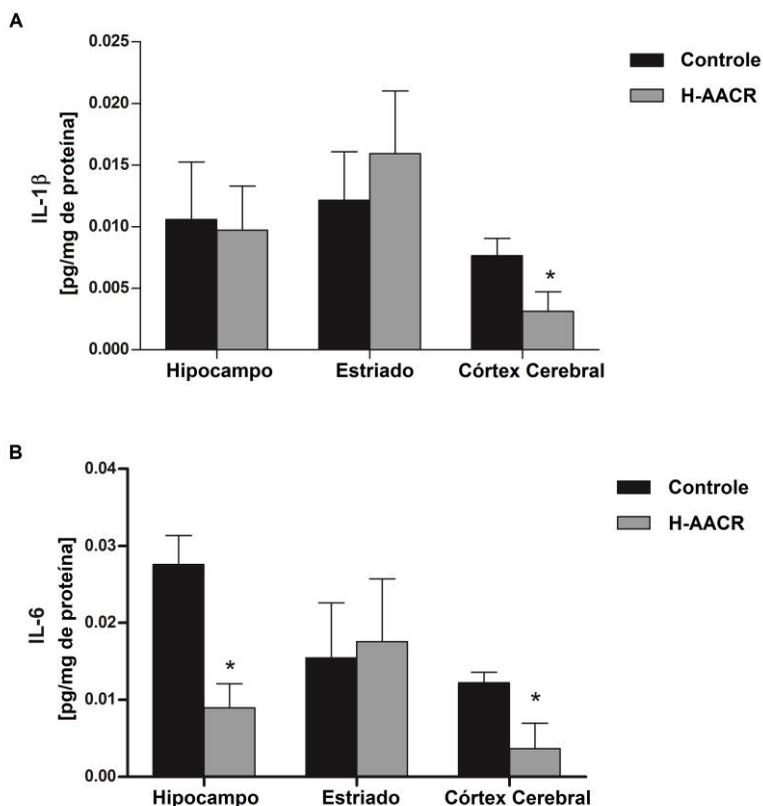


Figura 6: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis de IL-1 β (A) e IL-6 (B) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante seu desenvolvimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste de Tukey).

Com relação aos níveis TNF- α e INF- γ , observou-se que a administração crônica de AACR não alterou os níveis de TNF- α no hipocampo, estriado e córtex cerebral, quando comparados com o grupo controle (Figura 7A). Por outro lado, a administração crônica de AACR causou uma diminuição significativa nos níveis de INF- γ no hipocampo e no córtex cerebral, enquanto que no estriado não foram observadas alterações significativas (Figura 7B).

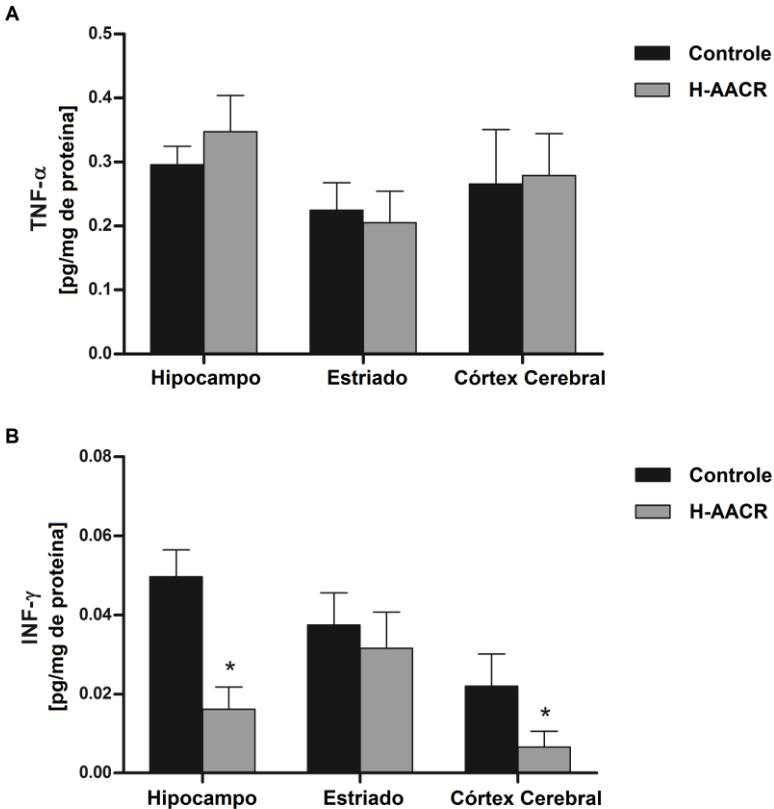


Figura 7: Efeito da administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis de TNF- α (A) e INF- γ (B) no hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos durante seu desenvolvimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste de Tukey).

O próximo passo do estudo foi avaliar o efeito da administração aguda de AACR sobre o conteúdo de água, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e a permeabilidade da BHE aos corantes *Evan's blue* e a fluoresceína de Na^+ em hipocampo e córtex cerebral de ratos com 10 dias de idade, e a influência da administração de dexametasona sobre as alterações provocadas pelos AACR. Os resultados do presente estudo demonstram que a administração de aguda de AACR em animais com 10 dias de idade causou edema cerebral observado pelo aumento do teor

em água no cérebro, e tratamento com dexametasona foi capaz de prevenir o edema cerebral (Figura 8).

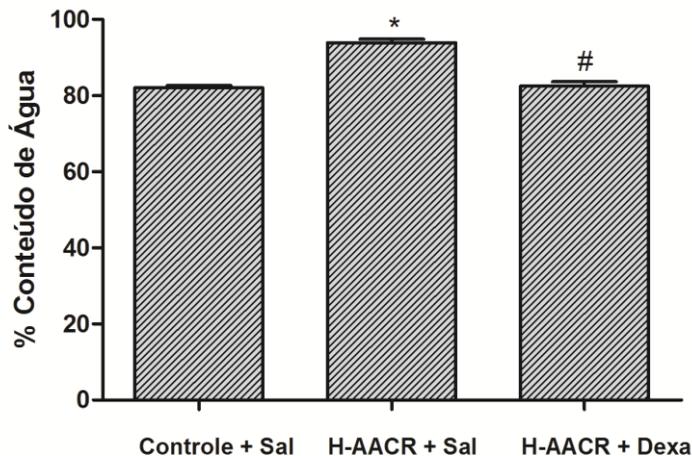


Figura 8: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e dexametasona (Dexa) sobre o conteúdo de água no cérebro de ratos de 10 dias de idade. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle + Sal. # $p < 0,05$ comparado ao grupo H-AACR + Sal (teste de Tukey).

Além disso, demonstrou-se que a administração aguda de AACR em animais com 10 dias de idade causou uma diminuição significativa na atividade da Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo e no córtex cerebral, quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, a administração de dexametasona foi capaz de prevenir a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, tanto no hipocampo, quanto no córtex cerebral (Figura 9).

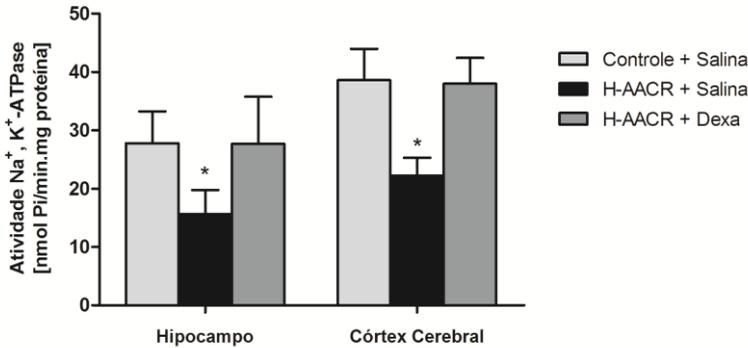


Figura 9: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e dexametasona (Dexa) sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle + Sal. # $p < 0,05$ comparado ao grupo H-AACR + Sal (teste de Tukey).

A permeabilidade da BHE aos corantes *Evan's blue* (peso molecular 961 Da) e a fluoresceína de Na^+ (peso molecular 376 Da) também foi avaliada. A figura 10A demonstra que a administração aguda de AACR não causou alterações significativas no conteúdo de *Evan's Blue* no hipocampo e córtex cerebral, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, quando avaliado o conteúdo de fluoresceína de Na^+ , observou-se um aumento significativo no hipocampo e no córtex cerebral após a administração de AACR, e a administração de dexametasona foi capaz de manter conteúdo de fluoresceína de Na^+ similar ao grupo controle (Figura 10B).

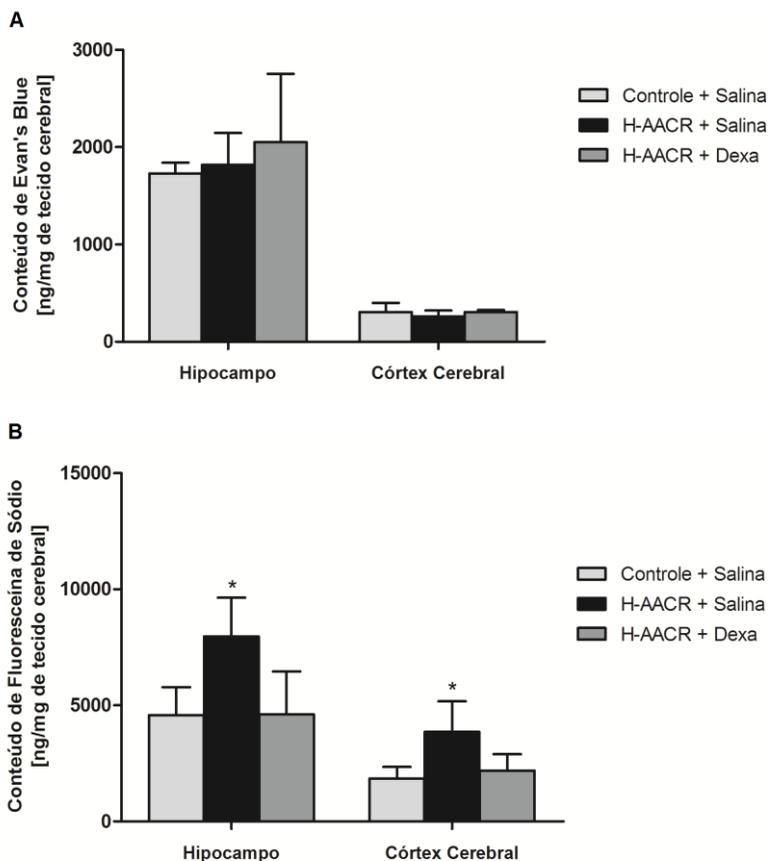


Figura 10: Efeito da administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e dexametasona (Dexa) sobre o conteúdo de *Evan's Blue* (A) e o conteúdo de fluoresceína de sódio (B) em hipocampo e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle + Sal. # $p < 0,05$ comparado ao grupo H-AACR + Sal (teste de Tukey).

Por fim, avaliou-se os efeitos do tratamento com dexametasona sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, em animais com 10 dias de idade submetidos à administração aguda de AACR. Os resultados demonstram que o tratamento com dexametasona foi capaz

de impedir o aumento nos níveis de IL-1 β e TNF- α no córtex cerebral (Figura 11A e 11D, respectivamente), bem como o aumento nos níveis de IL-6 no hipocampo e córtex cerebral (Figura 11B). Entretanto, o tratamento com dexametasona não foi capaz de impedir a diminuição nos níveis de IL-10 causada pela administração de AACR (Figura 11C).

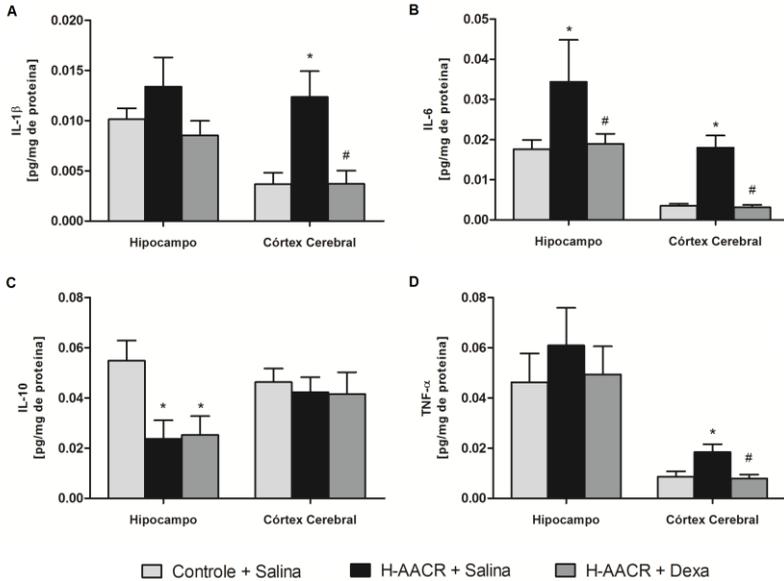


Figura 11: Efeito da administração de dexametasona (Dexa) sobre os níveis de IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C) e TNF- α (D) em hipocampo e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade submetidos à administração aguda de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle + Salina. # $p < 0,05$ comparado ao grupo H-AACR + Salina (teste de Tukey).

5 DISCUSSÃO

Pacientes com DXB apresentam uma manifestação clínica variável, podendo ser observada a presença de edema generalizado, hipomielinização e desmielinização no SNC desses pacientes, resultando em atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e disfunção neurológica em suas diferentes formas de expressão (Chuang e Shih, 2001; Schonberger et al., 2004). Entretanto, o exato mecanismo dos danos provocados pelos AACR permanece incerto, mesmo com muitos estudos realizados na tentativa de melhor compreender as alterações encontradas nessa doença. Estudos têm demonstrado que a leucina e/ou o seu α -cetoácido causam uma síndrome neuroquímica complexa que altera o acúmulo de proteínas do cérebro, a síntese de neurotransmissores, a regulação do volume celular, o crescimento dos neurônios e a síntese de mielina (Gjedde e Crone, 1983; Smith e Takasato, 1986; Kamei et al., 1992; Boado et al., 1999; Araújo et al., 2001; Killian e Chikhale, 2001; Zinnanti et al., 2009). Além disso, estudos têm demonstrado que os AACR e seus respectivos α -cetoácidos causam disfunção mitocondrial e depleção energética (Howeel e Lee, 1963; Danner e Elsas, 1989; Pilla et al., 2003, Sgaravati et al., 2003; Ribeiro et al., 2008; Amaral et al., 2010; de Franceschi et al., 2013), induzem estresse oxidativo (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005; Barschak et al., 2006; Mescka et al., 2011), causam apoptose de células neurais (Jouvet et al., 2000a; Jouvet et al., 2000b), alteram os níveis de neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator de crescimento neural (NGF) (Scaini et al., 2013a; Scaini et al., 2013b; Scaini et al., 2014a), podendo causar alterações comportamentais como comprometimento cognitivo, depressão e deterioração do conhecimento (Scaini et al., 2012a; Scaini et al., 2013a; Scaini et al., 2014b).

Como já mencionado anteriormente, estudos têm demonstrado que vários aminoácidos são capazes de modular a resposta inflamatória (Coeffier et al., 2001; Huang et al., 2003a; Huang et al., 2003b; Son et al., 2005; Hubert-Buron et al., 2006). Marshall et al. (1987) demonstraram que um desequilíbrio nos AACR, principalmente nos níveis de leucina, está associado com uma supressão da resposta imune. Por fim, Calder (2006), em um artigo de revisão, concluiu que AACR são absolutamente essenciais para a capacidade de resposta dos linfócitos e são necessários para apoiar outras funções das células imunes. Entretanto, não há estudos que avaliem o impacto dos AACR sobre a resposta imunológica no SNC.

No presente estudo, observou-se que a administração aguda de AACR aumentou os níveis de IL-1 β e TNF- α no córtex cerebral, mas não o hipocampo de ratos infantis. No entanto, os níveis de IL-6 foram aumentados no hipocampo e no córtex cerebral, enquanto que os níveis de IL-10 diminuíram apenas no hipocampo. Em contraste, os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α não foram significativamente afetados pelos AACR em ratos jovens. As citocinas são mediadores da inflamação, liberadas por tipos celulares diferentes que regulam uma grande variedade de processos metabólicos, inflamatórios e regenerativos (Ott et al., 1994). O TNF- α é considerado um importante indicador de inflamação local e induz a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias (Lucas et al., 2006). A IL-1 β aumenta a expressão de quase todas as outras citocinas, como TNF- α e IL-6, e de quimiocinas, bem como moléculas de adesão, enquanto que a IL-6 faz parte dos processos da imunidade inata e da adquirida, estimulando a secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado (Hirota et al., 2005). Por outro lado, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que afeta a função dos macrófagos promovendo a diminuição de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IFN- γ (Malefyt et al., 1991). Assim, os resultados do presente estudo sugerem um importante papel dos AACR em desencadear uma resposta inflamatória sistêmica causada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias e pela redução de citocinas anti-inflamatórias.

O equilíbrio correto entre as atividades pró e anti-inflamatórias é fundamental para a preservação da homeostase do tecido, e vários estímulos locais podem perturbar este equilíbrio, resultando em danos cerebrais significativos, incluindo prejuízo para os axônios e para mielina e uma perda de oligodendrócitos e neurônios (Tayal e Kalra, 2008; Wee Yong, 2010). Estudos têm demonstrado que citocinas pró-inflamatórias provavelmente contribuem para o dano neuronal observado em algumas doenças neurodegenerativas (Lerouet et al., 2002; Wyss-Coray e Mucke, 2002; Liu e Hong, 2003; Lucas et al., 2006). Deste modo, pode-se sugerir que níveis anormais dessas moléculas durante períodos críticos de desenvolvimento inicial do cérebro podem afetar adversamente os processos de desenvolvimento neurológico e contribuir para uma maior susceptibilidade a distúrbios cerebrais. Assim, é possível que as alterações no perfil das citocinas descritas neste estudo possam contribuir para o prejuízo na memória observado em ratos submetidos à administração de AACR (Scaini et al., 2012a; Scaini et al., 2013a), bem como em pacientes cujo dano cognitivo é frequentemente observado nessa doença (Walsh e Scott, 2010).

Embora os mecanismos precisos da ação dos AACR sobre o processo inflamatório não estejam totalmente compreendidos, sabe-se que o estresse oxidativo possui uma estreita relação com a infiltração de células inflamatórias, uma vez que o estresse oxidativo tem sido relacionado com a ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias, incluindo a via do NF- κ B (Li e Karin, 1999; Gutteridge e Halliwell, 2007). De fato, estudos em pacientes e em modelos animais de DXB demonstram peroxidação lipídica, dano a proteínas e redução das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005; Barschak et al., 2006; Mescka et al., 2011). Assim, pode-se sugerir que o aumento de citocinas pró-inflamatórias observado após a administração aguda de AACR pode estar relacionado ao estresse oxidativo ocasionado pelo acúmulo destes aminoácidos. Outro mecanismo envolvido no aumento dos níveis de citocinas pode estar relacionado com a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Estudos têm sugerido que acetilcolina pode inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, podendo ser considerada um regulador inflamatório (Borovikova et al., 2000; Pollak et al., 2005). Hofer et al. (2008) demonstraram que a administração de inibidores de AChE reduz os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias em um modelo experimental de sepse. Assim um aumento na atividade da AChE pode causar um prejuízo na capacidade da acetilcolina na regulação do processo inflamatório, o que pode estar relacionado com o aumento nos níveis das citocinas observadas nesse estudo. Corroborando com essa hipótese, Scaini et al. (2012b) demonstrou que os AACR aumentam a atividade da AChE em cérebro de ratos.

O próximo passo deste estudo foi avaliar os níveis de citocinas após a administração crônica de AACR. Curiosamente, observações do presente estudo contrastam com a administração aguda, visto que a administração repetida de AACR causou uma diminuição nos níveis de IL-1 β e IL-6 no córtex cerebral, enquanto que no hipocampo observou-se uma diminuição nos níveis de IL-6, IL-10 e IFN- γ . Estes resultados são consistentes com achados anteriores que sugerem que os AACR estão associados com uma supressão da resposta imune.

De Simone et al. (2013) demonstraram que a exposição a níveis elevados de AACR altera as propriedades imunológicas da micróglia, a principal célula imunocompetente do parênquima cerebral. Estes autores demonstraram que culturas de microglias expostas aos AACR apresentam uma menor expressão dos genes do fenótipo microglial pró-inflamatório (IL-1 β , TNF- α e iNOS), e um fenótipo peculiar

caracterizado por uma inclinação parcial para o fenótipo microglial anti-inflamatório, com maior expressão de IL-10 e atividade fagocítica, mas também um aumento na produção de radicais livres e uma diminuição nas funções neuroprotetoras, sugerindo que a alteração nesses fenótipos pode resultar em uma resposta microglial menos eficiente, o que promove a criação de uma inflamação crônica de baixo grau, aumentando a probabilidade de neurodegeneração. Chevalier et al. (1977) também demonstraram que um excesso de leucina em ratos submetidos a uma dieta contendo uma quantidade menor do que o normal de proteínas resulta em disfunção imunológica, observado por uma diminuição marcada no número de células formadoras de placas e na formação de roseta no baço, bem como uma diminuição na resposta de anticorpos no soro para a imunização com glóbulos vermelhos de ovelha.

Tomados em conjunto os resultados deste estudo, pode-se sugerir que o aumento nos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α após a administração aguda de AACR pode ter ocorrido em resposta ao estresse oxidativo e ao aumento da atividade da AChE causados pelos AACR. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de que o aumento no perfil pró-inflamatório tenha ocorrido em resposta a um insulto primário causada pelo excesso de AACR, visto que a neuroinflamação também pode ser benéfica, promovendo a neuroproteção, através da mobilização de precursores neurais para o reparo, bem como a remielinização e a regeneração axonal (Wee Yong, 2010). No entanto, a administração crônica de AACR demonstrou efeitos imunossupressores, podendo resultar em uma resposta menos eficiente a um dano local e ao estabelecimento de um estado inflamatório de baixo grau (Figura 12).

Por fim, o último passo deste estudo buscou avaliar se administração aguda de AACR causam edema cerebral e os mecanismos responsáveis por esse efeito. Embora a fisiopatologia subjacente à deterioração neurológica em pacientes com DXB não seja totalmente entendida, as mudanças radiológicas estão bem caracterizadas. O padrão típico começa com um marcado de edema cerebral generalizado iniciando no final da primeira semana de vida, o que, em seguida, progride para edema mais grave, afetando principalmente a substância branca cerebelar profunda, tronco cerebral dorsal, pedúnculo cerebelar e membro dorsal da cápsula interna (Brismar et al., 1990).

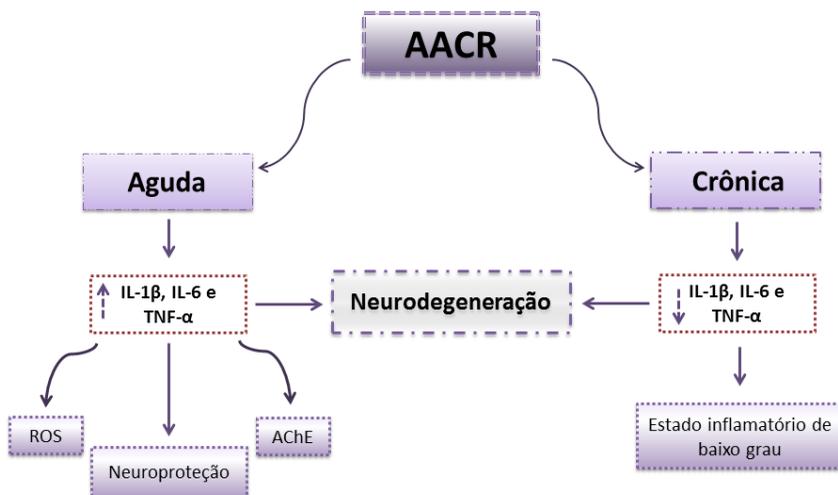


Figura 12: Figura representativa dos efeitos dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) sobre os níveis de citocinas em cérebro de ratos durante o seu desenvolvimento (do autor, 2015).

Neste trabalho, foi demonstrado que os animais submetidos a um modelo animal de DXB apresentaram um aumento no teor de água no cérebro, sugerindo edema cerebral. Ao investigar os mecanismos responsáveis pela formação do edema cerebral, descobriu-se uma associação entre os AACR, a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ e a permeabilidade da BHE, visto que administração aguda de AACR causou uma inibição na atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$, bem como aumentou a permeabilidade da BHE a moléculas pequenas. Assim, os nossos resultados corroboram com estudos anteriores que mostram que o edema cerebral, que ocorre durante as crises de descompensação metabólica em pacientes com DXB, inclui tanto o edema vasogênico, quanto o edema citotóxico (Jan et al., 2003; Righini et al., 2003).

Os mecanismos responsáveis pela inibição da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ causada pelos AACR são pouco conhecidos, entretanto, é tentador especular, que a inibição da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ pode ser um resultado do excesso de ERO, resultando na oxidação de grupos tióis na estrutura da enzima que são fundamentais para a sua função. De fato, estudos têm demonstrado que a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ é diminuída pela peroxidação lipídica (Mishra et al., 1989; Viani et al., 1991) e que os grupos tióis presentes na estrutura da enzima são

altamente susceptíveis ao estresse oxidativo (Yufu et al., 1993). Além disso, autores também sugerem que as propriedades estruturais e composição lipídica da membrana de sinaptossomas são essenciais para a atividade da enzima, assim alterações na fluidez da membrana são capazes de reduzir a atividade desta enzima (Yousef et al., 2002; Kamboj et al., 2009). Outro possível mecanismo está relacionado com a disfunção mitocondrial e depleção energética, uma vez que a diminuição nos níveis de ATP podem prejudicar a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase, visto que essa enzima consome 40-50% do ATP produzido no cérebro (Less, 1991; Ericinska et al., 2004). Corroborando com esta hipótese, estudos anteriores demonstraram que os AACR são inibidores do metabolismo oxidativo, resultando na disfunção do Ciclo de Krebs e da cadeia respiratória mitocondrial, e esta depleção de energia pode resultar em perda da função da Na^+, K^+ -ATPase levando a um inchaço celular e edema cerebral (Zinnanti et al., 2009). Além disso, uma das principais características da DXB é um aumento da produção de ERO nos órgãos afetados, incluindo o cérebro (Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005; Fontella et al., 2002; Barschak et al., 2006; Mescka et al., 2011).

Apesar do exato mecanismo através do qual os AACR alteram a permeabilidade da BHE em ratos ainda ser desconhecido, estudos em modelos animais têm demonstrado uma correlação entre o aumento do estresse oxidativo e a diminuição da resistência elétrica do endotélio cerebral, o que indica um aumento na permeabilidade da BHE. Além disso, ERO também fornecem um gatilho comum para muitas vias que mediam diretamente a ruptura da BHE, tais como danos oxidativos, modificação da junção apertada e ativação das metaloproteinases de matriz (de Vries et al., 1993; Overall e Lopez, 2002; Banks, 2005; Pun et al., 2009). Outro possível mecanismo pode estar relacionado com as funções imunológicas, visto que as citocinas podem induzir o rompimento da BHE em cultura bovina, indicando que todas as citocinas ativam as células endoteliais cerebrais para produzirem eicosanóides que, subsequentemente, induzirão a ruptura da BHE (de Vries et al., 1993). Além disso, durante as condições inflamatórias ocorre o aumento da pinocitose, resultando na disfunção das junções apertadas da BHE (Risau e Wolburg, 1990; Huber et al., 2001a; Huber et al., 2001b). Por fim, alterações na permeabilidade da BHE também pode ser consequência da hiperativação das metaloproteinases de matriz (MMP), uma família de proteases de zinco e cálcio-dependentes, extracelulares que degradam a matriz extracelular e outras proteínas extracelulares (Romanic et al., 1998; Gidday et al., 2005). Neste sentido, um estudo publicado por Scaini et al. (2014a) demonstrou que a

administração isolada de AACR ou lipopolissacarídeo (LPS) não causou um aumento nos níveis de MMP-2 e MMP-9, mas a coadministração de AACR com LPS demonstrou uma ativação dessas MMPs em ratos infantis, sugerindo que a ativação de um processo inflamatório associado a altos níveis de AACR pode levar a hiperativação das MMP-2 e MMP-9.

Considerando que o acúmulo de metabólitos na DXB provoca edema cerebral e que uma terapia mais efetiva é necessária para melhor prevenir a característica da doença, o presente estudo também investigou se a dexametasona é capaz de prevenir o edema cerebral causado pelos AACR.

A dexametasona é rotineiramente utilizada para o controle do edema cerebral em pacientes com tumores cerebrais, meningite, acidente vascular cerebral hemorrágico e isquemia cerebral (Galicich e French, 1961; Martos et al., 1995; Bertorelli, 1998; Kaal e Vecht, 2004; Irazuzta et al., 2005; Bastina et al., 2006; Shaikh et al., 2011; Kostaras et al., 2014) devido a seu tempo de meia vida mais longo e ao seu baixo efeito mineralocorticoide, minimizando a retenção de Na^+ e água (Nahaczewski et al., 2004; Raslan e Bhardwaj, 2007).

Além disso, estudos têm demonstrado que a dexametasona atua sobre o receptor de glucocorticoide e é altamente eficaz na redução da permeabilidade BHE (Romero et al., 2003; Weksler et al., 2005; Calabria et al., 2006; Förster, 2008), da ativação de cascatas inflamatórias (Auphan et al., 1995; Sapolsky et al., 2000; Raison e Miller, 2003), do estresse oxidativo (Demopoulos et al., 1972; Hall e Braugher, 1992; Suzuki et al., 1985; Rajashree e Puvanakrishnan, 1998) e também na modulação da Na^+, K^+ -ATPase (Kim et al., 2006; Hatou et al., 2009; Hatou, 2011). Corroborando esses dados, os resultados do presente estudo demonstraram que a administração de dexametasona foi capaz de prevenir o edema cerebral causado pelos AACR, impedindo a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase e o aumento da permeabilidade da BHE.

Várias vias são propostas estar envolvidas nos efeitos da dexametasona sobre a ruptura da BHE. Estudos têm demonstrado que a dexametasona influencia na expressão das junções apertadas, levando a uma redução da permeabilidade da BHE em ratos (Romero et al., 2003; Calabria et al., 2006), murinos (Förster et al., 2005; Weidenfeller et al., 2005) e em células endoteliais humanas (Weksler et al., 2005; Förster, 2008). Além disso, a dexametasona também é capaz de aumentar a regulação e fosforilação de proteínas das junções apertadas, incluindo a occludina e ZO-1, em cultura de células endoteliais

(Stelwagen et al., 1999; Underwood et al., 1999). Estudos *in vitro* revelaram que a dexametasona regula positivamente o inibidor de MMP-1 e preserva a integridade funcional das junções apertadas sob condições pró-inflamatórias, principalmente por manter os níveis de componentes das junções apertadas (occludina, claudina-1, claudina-12 e ZO-1) na linha de células endoteliais microvasculares de murino. Além disso, o tratamento com dexametasona reduz a expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e da proteína de adesão celular vascular (VCAM-1) (Gelati et al., 2000; Sloka e Stefanelli, 2005) e regula positivamente a angiotensina 1 (Ang-1), um fator de estabilização da BHE, ao passo que regula negativamente o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), um fator de desestabilização da BHE (Kim et al., 2008).

Com relação aos efeitos sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, estudos têm demonstrado que os efeitos reguladores de glucocorticóides, como a dexametasona, sobre o gene da Na^+, K^+ -ATPase são complexos e pode ocorrer através de múltiplos mecanismos específicos, incluindo transcrição, pós-transcrição, tradução e regulação da atividade de proteínas (Celsi et al., 1991, 1992; Devarajan e Benz, 2000). Kim et al. (2006) mostraram que o tratamento pós-natal de cordeiros recém-nascidos com doses relativamente elevadas (0,5 mg/kg) de dexametasona aumentou a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e a expressão da subunidade $\alpha 1$ no córtex cerebral. Estudos também têm mostrado que a dexametasona estimula a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em células endoteliais da córnea de camundongos através da promoção da síntese da Na^+, K^+ -ATPase, do aumento da atividade enzimática, estimulando a desfosforilação da subunidade $\alpha 1$ dessa enzima (Hatou et al., 2009; Hatou, 2011). Além disso, como descrito anteriormente, a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase pode ser um resultado do excesso de EROs (Mishra et al., 1989; Viani et al., 1991; Yufu et al., 1993). Deste modo, é tentador especular que a dexametasona pode impedir a inibição de Na^+, K^+ -ATPase por diminuir o estresse oxidativo (Tsai et al., 2007; Lozovoy et al., 2011; Seven et al., 2013), uma vez que a dexametasona apresenta atividade antiOXIDANTE e aumenta os níveis de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, tais como superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase (Demopoulos et al., 1972; Hall e Braugher, 1992; Suzuki et al., 1985; Rajashree e Puvanakrishnan, 1998).

A dexametasona também demonstrou efeitos sobre o sistema imunitário, através da inibição da síntese, liberação e/ou eficácia de citocinas e outros mediadores que promovem reações imunes e

inflamatórias (Sapolsky et al., 2000). Estes efeitos são devidos à inibição das vias de sinalização do NFκB (Raison e Miller, 2003), visto que os glucocorticóides induzem a transcrição do gene IκBα, o inibidor citoplasmático do NFκB, bloqueando assim a translocação de NFκB para o núcleo da célula (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995), resultando na inibição da transcrição de genes de citocinas responsivas ao NFκB, tais como TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12p40 e MIP-1α (Baeuerle, 1991; Grilli et al., 1993; Grove e Plumb, 1993). Além disso, a dexametasona pode regular negativamente a cascata inflamatória através da inibição de migração induzida por MIP-1α e a ativação dos neutrófilos (Wolpe e Cerami, 1989). Portanto, os resultados do presente estudo demonstraram que a administração de dexametasona foi capaz de impedir o aumento nos níveis de IL-1β, IL-6 e TNF-α, mas não a diminuição dos níveis de IL-10.

Tomados em conjunto, os resultados desse estudo revelaram que a administração de AACR em ratos infantis causa edema cerebral, ruptura da BHE e redução da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase. Além disso, o tratamento com dexametasona reduziu edema cerebral através da modulação da atividade da Na⁺K⁺-ATPase, da permeabilidade da BHE e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

Entretanto, várias limitações deste estudo devem ser consideradas, uma vez que estudos têm demonstrado que a dexametasona altera o metabolismo dos AACR, por inibir a síntese de proteína muscular, estimular a quebra de proteína muscular e diminuir o transporte de aminoácidos no músculo (Shoji e Pennington, 1977; Rannels et al., 1980; Kayali et al., 1987; Hickson et al., 1995; Auclair et al., 1997). Por outro lado, estudos também tem demonstrado que a dexametasona promove o catabolismo de AACR e aumenta os níveis proteicos de subunidades do CDCCR mitocondrial (Wang et al., 1997), através da estimulação da transcrição dos genes das subunidades E2 e E1α do CDCCR, e também por aumentar o estado da ativação da CDCCR diminuindo os níveis da quinase da desidrogenase dos α-cetoácidos de cadeia ramificada, enzima responsável por regular a atividade desse complexo (Wang et al., 2001).

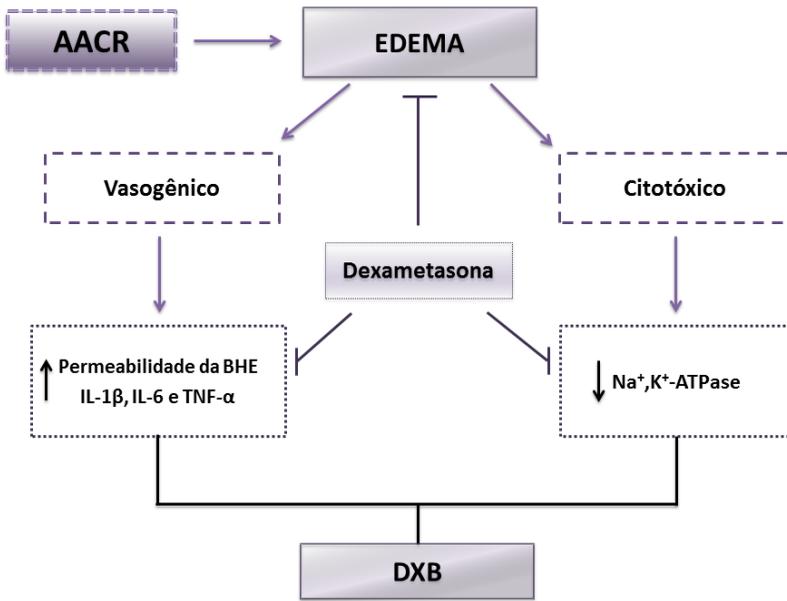


Figura 13: Figura representativa dos efeitos dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e da dexametasona sobre o edema cerebral em ratos de 10 dias de idade (Do autor, 2015).

Foi demonstrado ao longo desse trabalho que os AACR induzem uma alteração no sistema imune no cérebro de ratos submetidos ao modelo experimental. Aliado ao processo inflamatório instalado nos animais também demonstramos que os AACR causam edema cerebral em ratos infantis, e esse efeito pode estar diretamente relacionado com a inibição da atividade da Na⁺K⁺-ATPase e com o aumento da permeabilidade da BHE, além disso, demonstramos que a administração de dexametasona apresentou efeitos benéficos sobre essas alterações. Assim, os resultados do presente estudo são de grande relevância e somam-se a outros estudos buscando investigar mecanismos e possíveis agentes terapêuticos que visam prevenir ou minimizar as alterações neurológicas encontradas nos pacientes com DXB.

6 CONCLUSÃO

Diante dos objetivos iniciais da tese, chegou-se às seguintes conclusões:

- A administração de AACR diminui os níveis de IL-10 e aumenta os níveis de IL-6 no hipocampo após a administração aguda em ratos de 10 dias de idade;

- A administração de AACR aumenta os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no córtex cerebral após a administração aguda em ratos de 10 dias de idade;

- A administração de AACR não causou alterações significativas nos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ após a administração aguda em ratos de 30 dias de idade;

- A administração de AACR diminui os níveis de IL-1 β e IL-6 no córtex cerebral de ratos após a administração crônica;

- A administração de AACR diminui os níveis de IL-6, IL-10 e IFN- γ no hipocampo de ratos após a administração crônica;

- A administração de AACR causa edema cerebral pelo aumento do teor de água e diminuição na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase no córtex cerebral e hipocampo de ratos infantis após a administração aguda e o tratamento com dexametasona foi capaz de prevenir tais alterações;

- A administração de AACR aumentou o conteúdo de fluoresceína de sódio no hipocampo e córtex cerebral de ratos infantis após a administração aguda, e o tratamento com dexametasona foi capaz de prevenir essas alterações;

- O tratamento com dexametasona foi capaz de impedir o aumento nos níveis de IL-1 β e TNF- α no córtex cerebral bem como o aumento nos níveis de IL-6 no hipocampo e córtex cerebral de ratos infantis após a administração aguda de AACR;

- O tratamento com dexametasona não foi capaz de impedir a diminuição nos níveis de IL-10 no hipocampo de ratos infantis após a administração aguda de AACR.

- Nossos resultados sugerem que uma melhor compreensão do estado imunológico em pacientes com DXB possa ser útil para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para modular o eixo da hiperinflamação e hipoinflamação.

- Uma investigação mais aprofundada dos efeitos da dexametasona sobre a quebra de proteína muscular e o catabolismo de AACR em pacientes com DXB é necessária. No futuro, ela será importante para determinar se a administração de dexametasona provoca

um aumento nos níveis de AACR nestes pacientes, proporcionando provas para apoiar a utilização deste glicocorticoide para o tratamento do edema cerebral durante a crises de descompensação aguda.

REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Saunders; 2003.
- Abbas AK, Lichtman AH. Imunologia básica. 2nd ed. Elsevier; 2007.
- Amaral AU, Leipnitz G, Fernandes CG, Seminotti B, Schuck PF, Wajner M. Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Res.* 2010; 1324:75-84.
- Anderson MR, Blumer JL. Advances in the therapy for sepsis in children. *Pediatr Clin North Am.* 1997; 44:179-205.
- Araújo P, Wassermann GF, Tallini K, Furlanetto V, Vargas CR, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M. Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem Int.* 2001; 38:529-37.
- Auclair D, Garrel DR, Chaouki Zerouala A, Ferland LH. Activation of the ubiquitin pathway in rat skeletal muscle by catabolic doses of glucocorticoids. *Am J Physiol.* 1997; 272:C1007-16.
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmborg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science.* 1995; 270:286-90.
- Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF- κ B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1072:63-80.
- Banks WA. Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Curr Pharm Des.* 2005; 11(8):973-84.
- Barichello T, Santos AL, Silvestre C, Generoso JS, Cipriano AL, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Comim CM, Quevedo J. Dexamethasone treatment reverses cognitive impairment but increases brain oxidative stress in rats submitted to pneumococcal meningitis. *Oxid Med Cell Longev.* 2011; 2011(173035):1-7.
- Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci.* 1998; 94:557-72.
- Barrington R, Zhang M, Fischer M, Carroll MC. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2001; 180:5-15.
- 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; 21:279-86.
- Bastina ME, Carpenterb TK, Armitageb PA, Sinhab S, Wardlawb JM, Whittleb IR. Effects of dexamethasone on cerebral perfusion and water

diffusion in patients with high-grade glioma. *Am J Neuroradiol.* 2006; 27:402-8.

Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg WD. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 1996; 739(1-2):88-96.

Bertorelli R. MK 801 and dexamethasone reduce both tumor necrosis factor levels and infarct volume after focal cerebral ischemia in the rat brain. *Neurosci Lett.* 1998; 246:41-4.

Beyaert R, Cuenda A, Berghe WV, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P, Fiers W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J.* 1996; 15(8):1914-23.

Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8(1):57-69.

Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:12079-84.

Bodamer OA, Lee B. Maple syrup urine disease, emedicine medscape reference. *WebMD Health Professional Network;* 2012.

Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 2000; 405:458-62.

Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol.* 2000; 67(4):508-14.

Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Wajner M, Dutra-Filho CS. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Dev Neurosci.* 2003; 21:327-32.

Bridi R, Braun CA, Zorzi GK, Wannmacher CM, Wajner M, Lissi EG, Dutra-Filho CS. Alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defences in cerebral cortex from young rats. *Metab Brain Dis.* 2005; 20:155-67.

Bridi R, Fontella FU, Pulrolnik V, Braun CA, Zorzi GK, Coelho D, Wajner M, Vargas CR, Dutra-Filho CS. A chemically-induced acute model of maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies. *J Neurosci Methods.* 2006; 155:224-30.

- Brismar J, Aqeel A, Brismar G. Maple syrup urine disease: findings on CT and MR scans of the brain in 10 infants. *Am J Neuroradiol.* 1990; 11:1219-28.
- Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J Nutr.* 2006; 136:207S-11S.
- Calabria AR, Weidenfeller C, Jones AR, de Vries HE, Shusta EV. Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier properties in response to glucocorticoid induction. *J Neurochem.* 2006; 97:922-33.
- Caldas D, Schrank Y. Síndrome de Cushing por uso abusivo de descongestionante nasal contendo dexametasona: Relato de caso. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2001; 67(6):868-71.
- Calder PC. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(6):S1505-19S.
- Calvo M, Artuch R, Macia E, Luaces C, Vilaseca MA, Pou J, Pineda M. Diagnostic approach to inborn errors of metabolism in an emergency unit. *Pediatr Emerg Care.* 2000; 16:405-8.
- Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005; 48:16-42.
- Casadevall I, Ogier H, Germain JF, Daoud P, Hartmann JF, Mercier JC, Beaufils F. Continuous arteriovenous hemofiltration. Management in case of neonatal leucinoses. *Arch Fr Pediatr.* 1992; 49(9):803-5.
- Cassol OJ Jr, Comim CM, Petronilho F, Constantino LS, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Low dose dexamethasone reverses depressive-like parameters and memory impairment in rats submitted to sepsis. *Neurosci Lett.* 2010; 473(2):126-30.
- Celsi G, Nishi A, Akusjarvi G, Aperia A. Abundance of Na(+)-K(+)-ATPase mRNA is regulated by glucocorticoid hormones in infant rat kidneys. *Am J Physiol.* 1991; 260:F192-7.
- Celsi G, Stahl J, Wang ZM, Nishi A. Adrenocorticoid regulation of Na+, K+-ATPase in adult rat kidney: effects on post-translational processing and mRNA abundance. *Acta Physiol Scand.* 1992; 145:85-91.
- Chakrapani A, Cleary MA, Wraith JE. Detection of inborn errors of metabolism in the newborn [Review]. *Arch Dis Childhood Fetal Neonatal Ed.* 2001; 84:F205-10.
- Chevalier R. Evolution pharmacologique, biochimique et lésionnelle de l'inflammation provoquée par injection d'oxyde de zinc chez le rat [Tese de Doutorado]. 1977.

- Chiche JD, Siami S, Dhainaut JFD, Mira JP. Cytokine polymorphisms and susceptibility to severe infectious diseases. *Sepsis*. 2001; 4(3):209-15.
- Chuang DT, Shih VE. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editores. *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1971–2005.
- Clark AK, Old EA, Malcangio M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J Pain Res*. 2013; 6:803-14.
- Coëffier M, Miralles-Barrachina O, Le Pessot F, Lalaude O, Daveau M, Lavoine A, Lerebours E, Déchelotte P. Influence of glutamine on cytokine production by human gut in vitro. *Cytokine*. 2001; 13(3):148-154.
- Coimbra RS, Loquet G, Leib SL. Limited efficacy of adjuvant therapy with dexamethasone in preventing hearing loss due to experimental pneumococcal meningitis in the infant rat. *Pediatr Res*. 2007; 62:291-4.
- Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*. 2008; 180(9):5771-7.
- Cynober L, Harris RA. Symposium on branched-chain amino acids: conference summary. *J Nutr*. 2006; 136:333S-6S.
- Damiani D, Kuperman H, Dichtchekian V, Manna TD, Setian N. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo-benefício. *Pediatrics*. 2001; 1:71-82.
- Dancis J, Hutzler J, Levitz M. Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine disease. *Biochim Biophys Acta*. 1960; 23:342-3.
- Dancis J. Phenylketonuria and maple sugar urine disease. *Bull NY Acad Med*. 1959; 35:427-32.
- Danner DJ, Elsas LJ. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editores. *Metabolic basis of inherited disease*. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 1989. p. 671-92.
- de Franceschi ID, Rieger E, Vargas AP, Rojas DB, Campos AG, Rech VC, Feksa LR, Wannmache CMD. Effect of leucine administration to female rats during pregnancy and lactation on oxidative stress and enzymes activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res*. 2013; 38(3):632-43.
- De Simone R, Vissicchio F, Mingarelli C, De Nuccio C, Visentin S, Ajmone-Cat MA, Minghetti L. Branched-chain amino acids influence the immune properties of microglial cells and their responsiveness to pro-inflammatory signals. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1832(5):650-9.

- de Vries N, De Flora S. N-Acetylcysteine. *J Cell Biochem.* 1993; 17F:270-7.
- Delves PJ, Roitt D. The immune system – first of two parts. *N Engl J Med.* 2000; 343:37-50.
- Demopoulos HB, Milvy P, Kakaris S, Ransohoff J. Molecular aspects of membrane structure in cerebral edema. In: Reulen HJ, Schurmann K, editores. *Steroids and Brain Edema.* Springer-Verlag: New York; 1972, p. 29-39.
- Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14(3-4):193-209.
- Devarajan P, Benz Jr EJ. Translational regulation of Na-K-ATPase subunit mRNAs by glucocorticoids. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 279:F1132-8.
- Díaz VM, Camarena C, de la Vega Á, Martínez-Pardo M, Díaz C, López M, Hernández F, Andrés A, Jara P. Liver transplantation for classical maple syrup urine disease: long-term follow-up. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 59(5):636-9.
- Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996; 87(6): 2095-147.
- Distefano G, Curreri R, Betta P, Romeo MG, Amato M. Procalcitonin serum levels in perinatal bacterial and fungal infection of preterm infants. *Acta Paediatr.* 2004; 93:216-9.
- Dumaz N, Marais R. Protein kinase a blocks raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking raf-1 interaction with ras. *J Biol Chem.* 2003; 278(32):29819-23.
- Eisenstein RS, Hoganson G, Miller RH, Harper AE. Altered phosphorylation state of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase in a branched-chain acyltransferase deficient human fibroblast cell line. *J Inherit Metab Dis.* 1991; 14:37-44.
- Erecinska M, Cherian S, Silver IA. Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol.* 2004; 73(6):397-445.
- Feier FH, Miura IK, Fonseca EA, Porta G, Pugliese R, Porta A, Schwartz IV, Margutti AV, Camelo Jr JS, Yamaguchi SN, Taveira AT, Candido H, Benavides M, Danesi V, Guimaraes T, Kondo M, Chapchap P, Neto JS. Successful domino liver transplantation in maple syrup urine disease using a related living donor. *Braz J Med Biol Res.* 2014; 47(6):522-6.
- Feng X, Yuan W. Dexamethasone Enhanced Functional Recovery after Sciatic Nerve Crush Injury in Rats. *BioMed Res Int.* 2015; 2015:627923.

- Fontella FU, Gassen E, Pulrolnik V, Wannmacher CM, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS. Stimulation of lipid peroxidation *in vitro* in rat brain by metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*. 2002; 17:47-54.
- Forster C, Burek M, Romero IA, Weksler B, Couraud PO, Drenckhahn D. Differential effects of hydrocortisone and TNF α on tight junction proteins in an *in vitro* model of the human blood-brain barrier. *J Physiol*. 2008; 586(7):1937-49.
- Forster C, Silwedel C, Golenhofen N, Burek M, Kietz S, Mankertz J, Drenckhahn D. Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine *in vitro* system. *Physiol J*. 2005; 565(2):475-86.
- Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4:281-8.
- Galicich JH, French LA. Use of dexamethasone in the treatment of cerebral edema resulting from brain tumors and brain surgery. *Am Pract Dig Treat*. 1961; 12:169-74.
- Gelati M, Corsini E, Dufour A, Massa G, Giombini S, Solero CL, Salmaggi A. High-dose methylprednisolone reduces cytokine-induced adhesion molecules on human brain endothelium. *Can J Neurol Sci*. 2000; 27:241-4.
- Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289(2):H558-68.
- Gjedde A, Crone C. Biochemical modulation of blood-brain barrier permeability. *Acta Neuropathol Suppl (Berl)*. 1983; 8:59-74.
- Goncharova LB, Tarakanov AO. Molecular networks of brain and immunity. *Brain Res Rev*. 2007; 55:155-66.
- Grilli M, Chiu JJ, Lenardo MJ. NF- κ B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol*. 1993; 143:1-62.
- Grove M, Plumb M. C/EBP, NF- κ B, and c-Ets family members and transcriptional regulation of the cell-specific and inducible macrophage inflammatory protein 1 alpha immediate-early gene. *Mol Cell Biol*. 1993; 13:5276-89.
- Gu YT, Qin LJ, Qin X, Xu F. The molecular mechanism of dexamethasone-mediated effect on the blood-brain tumor barrier permeability in a rat brain tumor model. *Neurosci Lett*. 2009; 13;452(2):114-8.

- Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 393(4):561-4.
- Hall ED, Braughler JM. Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury: A review and therapeutic rationale. *Surg Neurol.* 1992; 18:320-7.
- Hansson E. Long-term pain, neuroinflammation and glial activation. *Scand J Pain.* 2010; 1(2):67-72.
- Harper AE, Miller RH, Block KP. Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1984; 4:409-54.
- Harris RA, Joshi M, Jeoung NH, Obayashi M. Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J Nutr.* 2005; 135:1527S-30S.
- Hatou S, Yamada M, Mochizuki H, Shiraishi A, Joko T, Nishida T. The effects of dexamethasone on the Na,K-ATPase activity and pump function of corneal endothelial cells. *Curr Eye Res.* 2009; 34:347-54.
- Hatou S. Hormonal regulation of Na⁺/K⁺-dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells. *Cornea.* 2011; 30:S60-6.
- Hemphill JC, Beal MF, Gress DR. Critical care in neurology. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. *Harrison's principles of internal medicine.* 15th ed. New York: Mc Graw Hill. 2001; 2491-8.
- Hickson RC, Czerwinski SM, Wegrzyn LE. Glutamine prevents downregulation of myosin heavy chain synthesis and muscle atrophy from glucocorticoids. *Am J Physiol.* 1995; 268:E730-4.
- Hofer SH, Eisenbach C, Lukic IK, Schneider L, Bode K, Brueckmann M, Mautner S, Wenthe MN, Encke J, Werner J, Dalpke AH, Stremmel W, Nawroth P, Martin E, Krammer PH, Bierhaus A, Weigand MA. Pharmacologic cholinesterase inhibition improves survival in experimental sepsis. *Crit Care Med.* 2008; 36(2):404-8.
- Hoffmann B, Helbling C, Schadewaldt P, Wendel U. Impact of longitudinal plasma leucine levels on the intellectual outcome in patients with classic MSUD. *Pediatr Res.* 2006; 59:17-20.
- Howell RK, Lee M. Influence of α -keto acids on the respiration of brain in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1963; 113:660-3.
- Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity.* 1996; 4(4):387-96.
- Huang CH, Kuo IC, Xu H, Lee YS, Chua KY. Mite allergen induces allergic dermatitis with concomitant neurogenic inflammation in mouse. *J Invest Dermatol.* 2003a; 121:289-93.
- Huang SL, Hsu MK, Chan CC. Effects of submicrometer particle compositions on cytokine production and lipid peroxidation of human

bronchial epithelial cells. *Environ Health Perspect.* 2003b; 111(4):478-82.

Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 2001a; 24(12):719-25.

Huber JD, Witt KA, Hom S, Egleton RD, Mark KS, Davis TP. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001b; 280(3):H1241-8.

Hubert-Buron A, Leblond J, Jacquot A, Ducrotté P, Déchelotte P, Coëffier M. Glutamine pretreatment reduces IL-8 production in human intestinal epithelial cells by limiting I κ B α ubiquitination. *J Nutr.* 2006; 136(6):1461-5.

Irazuzta J, Pretzlaff RK, DeCourten-Myers G, Zemlan F, Zingarelli B. Dexamethasone decreases neurological sequelae and caspase activity. *Intensive Care Med.* 2005; 31:146-50.

Jan W, Zimmerman RA, Wang ZJ, Berry GT, Kaplan PB, Kaye EM. MR diffusion imaging and MR spectroscopy of maple syrup urine disease during acute metabolic decompensation. *Neuroradiology.* 2003; 45:393-9.

Jardim LB, Martins CS, Pires RF, Sanseverino MT, Refosco L, Vieira RC, Trotta EA, Vargas C, Neto EC, Giugliani R. Uma experiência terapêutica no manejo da doença da urina do xarope de bordo. *J Pediatr.* 1995; 71(5): 279-84.

Jouvet P, Kozma M, Mehmet H. Primary human fibroblasts from a maple syrup urine disease patient undergo apoptosis following exposure to physiological concentrations of branched chain amino acids. *Ann N Y Acad Sci.* 2000b; 926:116-21.

Jouvet P, Rustin P, Taylor DL, Pocock JM, Felderhoff-Mueser U, Mazarakis ND, Sarraf C, Joashi U, Kozma M, Greenwood K, Edwards AD, Mehmet H. 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.* 2000a; 11:1919-32.

Kaal EC, Vecht CJ. The management of brain edema in brain tumors. *Curr Opin Oncol.* 2004; 16:593-600.

Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol.* 2008; 9:1215-23.

Kamboj SS, Chopra K, Sandhir R. Hyperglycemia-induced alterations in synaptosomal membrane fluidity and activity of membrane bound

- enzymes: beneficial effect of N-acetylcysteine supplementation. *Neuroscience*. 2009; 162(2):349-58.
- Kamei A, Takashima S, Chan F, Becker LE. Abnormal dendritic development in maple syrup urine disease. *Pediatr Neurol*. 1992; 8:145-7.
- Karam SM, Schwartz IVD, Giugliani R. Introdução e aspectos clínicos. In: Carakushansky G, editor. *Doenças genéticas em pediatria*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p. 155-8.
- Kayali AG, Young VR, Goodman MN. Sensitivity of myofibrillar proteins to glucocorticoid-induced muscle proteolysis. *Am J Physiol*. 1987; 252(5):E621-6.
- Killian DM, Chikhale PJ. Predominant functional activity of the large, neutral amino acid transporter (LAT1) isoform at the cerebrovasculature. *Neurosci Lett*. 2001; 306:1-4.
- Kim H, Lee JM, Park JS, Jo SA, Kim YO, Kim CW, Jo I. Dexamethasone coordinately regulates angiopoietin-1 and VEGF: a mechanism of glucocorticoid-induced stabilization of bloodbrain barrier. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 372:243-8.
- Kim JH, Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol*. 2006; 39:339-45.
- Kipnis J, Cohen H, Cardon M, Ziv Y, Schwartz M. T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: Implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:8180-5.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*. 2000; 12(6):6611-20.
- Klatzo I. Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1967; 26:1-14.
- Klee D, Thimm E, Wittsack HJ, Schubert D, Primke R, Pentang G, Schaper J, Mödder U, Antoch A, Wendel U, Cohnen M. Structural white matter changes in adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis*. 2013; 36:945-53.
- Kostaras X, Cusano F, Kline GA, Roa W, Easaw J. Use of dexamethasone in patients with high-grade glioma: a clinical practice guideline. *Curr Oncol*. 2014; 21:e493-503.
- le Roux C, Murphy E, Lilburn M, Lee PJ. The longest-surviving patient with classical maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis*. 2006; 29:190-4.

- Lepage N, McDonald N, Dallaire L, Lambert M. Age-specific distribution of plasma aminoacid concentration in healthy pediatric population. *Clin Chem*. 1997; 43:2397-402.
- Lerouet D, Beray-Berthet V, Palmier B, Plotkine M, Margail I. Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 2002; 958(1):166-75.
- Less JR, Skalak TC, Sevick EM, Jain RK. Microvascular Architecture in a Mammary Carcinoma: Branching Patterns and Vessel Dimensions. *Cancer Res*. 1991; 51:265.
- Li N, Karin M. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? July 1999 *The FASEB Journal*. 1999; 13(10):1137-43.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Wee Yong V, Levison SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem*. 2004; 89(5):1092-100.
- Liu B, Hong JS. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 304(1):1-7.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-75.
- Lozovoy MA, Simão AN, Panis C, Rotter MA, Reiche EM, Morimoto HK, Lavado E, Cecchini R, Dichi I. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2011; 20:1250-9.
- Lu G, Sun H, Sh P, Youn JY, Warburton S, Ping P, Vondriska TM, Cai H, Lynch CJ, Wang Y. Protein phosphatase 2C α is a critical regulator of branched-chain amino acid catabolism in mice and cultured cells. *J Clin Invest*. 2009; 119:1678-87.
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Clin Pharmacol*. 2006; 147(S1):S232-40.
- Malefyt RW, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *JEM*. 1991; 174(5):1209-20.
- Marshall JC, Lee C, Meakins JL, Michel RP, Christou NV. Kupffer cell modulation of the systemic immune response. *Arch Surg*. 1987; 122(2):191-6.
- Martos A, Cabellos C, Martínez-Lacasa J, Viladrich PF, Gudiol F. Protective effect of dexamethasone and phenytoin in the treatment of experimental pneumococcal meningitis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1995; 13:146-50.

- Medzhitov R, Janeway JRC. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000; 343:338-44.
- Menkes JH, Hurst PL, Craig JM. A new syndrome: Progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics*. 1954; 14:462.
- Mescka C, Moraes T, Rosa A, Mazzola P, Piccoli B, Jacques C, Dalazen G, Coelho J, Cortes M, Terra M, Regla Vargas C, Dutra-Filho CS. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*. 2011; 26:21-8.
- Minghetti L, Levi G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobio*. 1998; 54(1):99-125.
- Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M, Cahillane G, Wagerle LC. Lipid peroxidation as the mechanism of modification of the affinity of the Na⁺, K⁺-ATPase active sites for ATP, K₁, Na₁, and strophanthidin in vitro. *Neurochem Res*. 1989; 14:845-51.
- Moalem G, Grafe P, Tracey DJ. Chemical mediators enhance the excitability of unmyelinated sensory axons in normal and injured peripheral nerve of the rat. *Neuroscience*. 2005; 134(4):1399-411.
- Mocellin S, Wang E, Marincola FM. Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *J Immunother*. 2001; 24(5):392-407.
- 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.
- Muelly ER, Moore GJ, Bunce SC, Mack J, Bigler DC, Morton DH, Strauss KA. Biochemical correlates of neuropsychiatric illness in maple syrup urine disease. *J Clin Invest*. 2013; 123:1809-20.
- Muhallab S, Lundberg C, Gielen AW, Lidman O, Svenningsson A, Piehl F, Olsson T. Differential Expression of Neurotrophic Factors and Inflammatory Cytokines by Myelin Basic Protein-Specific and Other Recruited T Cells Infiltrating the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Scand J Immunol*. 2002; 55(3):264-73.
- Nagabushana D, Benakappa A. Maple syrup urine disease and oculocutaneous albinism in twins. *J Clin Neonatol*. 2014; 3(1):55-6.
- Nahaczewski AE, Fowler SB, Hariharan S. Dexamethasone therapy in patients with brain tumors-a focus on tapering. *J Neurosci Nurs*. 2004; 36:340-3.
- Nakamura R, Egashira K, Machida Y, Hayashidani S, Takeya M, Utsumi H, Tsutsui H, Takeshita A. Probucol attenuates left ventricular

dysfunction and remodeling in tachycardia-induced heart failure. *Circulation*. 2002; 106:362-7.

Ott L, McClain CJ, Gillespie M, Young B. Cytokines and metabolic dysfunction after severe head injury. *J Neurotrauma*. 1994; 11(5):447-72.

Ouchi Y, Yagi S, Yokokura M, Sakamoto M. Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009; 15(3):S200-4.

Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the posttrial era. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:657-72.

Oyarzabal A, Martinez-Pardo M, Merinero B, Navarrete R, Desviat LR, Ugarte M, Rodriguez-Pombo P. A novel regulatory defect in the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex due to a mutation in the *ppm1k* gene causes a mild variant phenotype of maple syrup urine disease. *Hum mutat*. 2012; 34(2):355-62.

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001; 357:1777-89.

Pavcnik-Arnol M, Hojker S, Derganc M. Lipoprotein-binding protein in critically ill neonates and children with suspected infection: comparison with Procalcitonin, interleukin 6 and C-reactive protein. *Intensive Care Med*. 2004; 30:1454-60.

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

Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol*. 2002; 68:311-23.

Pilla C, Cardozo RF, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem Res*. 2003; 28:675-9.

Pollak Y, Gilboa A, Ben-Menachem O, Ben-Hur T, Soreq H, Yirmiya R. Acetylcholinesterase inhibitors reduce brain and blood interleukin-1 β production. *Ann Neurol*. 2005; 57(5):741-5.

Pontes-Fernandes AC, Petean EBL. Sobrecarga emocional e qualidade de vida em mães de crianças com erros inatos do metabolismo. *Psic Teor e Pesq*. 2011. 27(4):459-65.

Popa C, Netea MG, van Riel PLCM, van der Meer JWM, Stalenhoef AFH. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res*. 2007; 48:751-60.

Pun PB, Lu J, Moochhala S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic Res*. 2009; 43:348-64.

- Raison CL, Miller AH. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry*. 2003; 160:1554-65.
- Rajashree S, Puvanakrishnan R. Dexamethasone induced alterations in enzymatic and nonenzymatic antioxidant status in heart and kidney of rats. *Mol Cell Biochem*. 1998; 181:77-85.
- Rannels DE, Rannels SR, Li JB, Pegg AE, Morgan HE, Jefferson LS. Effects of glucocorticoids on peptide chain initiation in heart and skeletal muscle. *Adv Myocardiol*. 1980; 1:493-501.
- Raslan A, Bhardwaj A. Medical management of cerebral edema. *Neurosurg Focus*. 2007; 22(5):E12.
- Reed LJ, Hackert ML. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *J Biol Chem*. 1990; 265:8971-4.
- Remick DG. Cytokines and cytokine receptors: principles of action. In: Kronfol Z. editor. *Cytokines and mental health*. Boston: Kluwer Academic; 2003.
- Ribeiro CA, Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Grando V, Schmidt AL, Ferreira GC, Perry ML, Dutra-Filho CS, Wajner M. Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res*. 2008; 33:114-24.
- Righini A, Ramenghi LA, Parini R, Triulzi F, Mosca F. Água coeficiente de difusão e T2 aparente mudanças na fase aguda da doença da urina do xarope de bordo: Evidência de edema intramielínico e vasogénico-intersticial. *J Neuroimaging*. 2003; 13:162-5.
- Risau W, Wolburg H. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*. 1990; 13(5):174-8.
- Robinson JB, Srere PA. Organization of Krebs tricarboxylic acid cycle enzymes in mitochondria. *J Biol Chem*. 1985; 260:10800.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17(4):942-64.
- Rodrigues CAF. Leucínose [Dissertação de mestrado]. Porto: Universidade do Porto, Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação; 2002.
- Roma AC, Pereira PRA de A, Dantas AM. Síndrome de Leigh: relato de caso. *Arq Bras Oftalmol*. 2008; 71(1):118-21.
- Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats. *Stroke*. 1998; 29:1020-30.

- Romero IA, Radewicz K, Jubin E, Michel CC, Greenwood J, Couraud PO, Adamson P. Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett.* 2003; 344(2):112-6.
- Rosenberg GA. Brain edema and disorders of cerebrospinal fluid circulation. In: Bradley WG, Daroff RB, Ferichel GM, Marsden CD, editores. *Neurology in clinical practice.* 3rd ed. Boston: Butterworth Heinmann; 2000. p. 1545-59.
- Sakai H, Inoue Y, Oba H, Ishiguro A, Sekiguchi K, Tsukune Y. Dependência Idade da ressonância magnética achados de imagem ponderada em difusão em encefalopatia na doença da urina do xarope de bordo. *J Comput Assist Tomogr.* 2005; 29:524-7.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000; 21:55-89.
- Scaini G, Comim CM, Oliveira GMT, Pasquali MAB, Quevedo J, Gelain DP, Moreira JCF, Schuck PF, Ferreira GC, Bogo MR. Chronic administration of branched-chain amino acids impairs spatial memory and increases brain-derived neurotrophic factor in a rat model. *J Inherit Metab Dis.* 2013a; 36(5):721-30.
- Scaini G, Jeremias GC, Furlanetto CB, Domingui D, Comim CM, Quevedo J, Schuck PF, Ferreira CG, Streck EL. Behavioral responses in rats submitted to chronic administration of branched-chain amino acids. *JMD.* 2014b; 13:159-87.
- Scaini G, Jeremias IC, Morais MO, Borges GD, Munhoz BP, Leffa DD, Andrade VM, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. DNA damage in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab.* 2012b. 106:169-74.
- Scaini G, Mello-Santos LM, Furlanetto CB, Jeremias IC, Mina F, Schuck PF, Ferreira GC, Kist LW, Pereira TCB, Bogo MR. Acute and chronic administration of the branched-chain amino acids decreases nerve growth factor in rat hippocampus. *Mol Neurobiol.* 2013b; 48(3):581-9.
- Scaini G, Morais MOS, Galant LS, Vuolo F, Dall'Igna DM, Pasquali MAB, Ramos VM, Gelain DP, Moreira JCF, Schuck PF. Coadministration of branched-chain amino acids and lipopolysaccharide causes matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown. *Mol Neurobiol.* 2014a; 50(2):358-67.
- Scaini G, Teodorak BP, Jeremias IC, Morais MO, Mina F, Domingui D, Pescador B, Comim CM, Schuck PF, Ferreira GC, Quevedo J, Streck EL. Antioxidant administration prevents memory impairment in an

- animal model of maple syrup urine disease. *Behav Brain Res.* 2012a; 231(1):92-6.
- Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U. Whole-body L-leucine oxidation in patients with variant form of maple syrup urine disease. *Pediatr Res.* 2001; 49:627-35.
- Schadewaldt PL, Wendel U. Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr.* 1997; 156:S62-6.
- Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin Jr AS. Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science.* 1995; 270:283-6.
- Schönberger S, Schweiger B, Schwahn B, Schwarz M, Wendel U. Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab.* 2004; 82(1):69-75.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill Inc; 2001. p. 3-45.
- Seven A, Aslan M, Incir S, Altintas A. Evaluation of oxidative and nitrosative stress in relapsing remitting multiple sclerosis: effect of corticosteroid therapy. *Folia Neuropathol.* 2013; 51:58-64.
- Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Ribeiro CA, Wannmacher CM, Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wajner M. Inhibition of brain energy metabolism by the alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1639:232-8.
- Shaikh AK, Mohammad QD, Ullah MA, Ahsan MM, Rahman A, Shakoor MA. Effect of dexamethasone on brain oedema following acute ischemic stroke. *Mymensingh Med J.* 2011; 20:450-8.
- Sharifian M, Anvaripour N, Karimi A, Fahimzad A, Mohkam M, Dalirani R, Gholikhani F, Rafiee MA. The role of dexamethasone on decreasing urinary cytokines in children with acute pyelonephritis. *Pediatr Nephrol.* 2008; 23(9):1511-6.
- Shimomura Y, Harris RA. Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: discussion of session 1. *J Nutr.* 2006a; 136:232S-3S.
- Shimomura Y, Honda T, Shiraki M, Murakami T, Sato J, Kobayashi H, Mawatari K, Obayashi M, Harris RA. Branched-chain amino acid catabolism in exercise and liver disease. *J Nutr.* 2006b; 136:250S-3S.
- Shimomura Y, Murakami T, Nakai N, Nagasaki M, Harris RA. Exercise promotes BCAA catabolism: effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise. *J Nutr.* 2004; 134:1583S-7S.

- Shoji S, Pennington RJ. The effect of cortisone on protein breakdown and synthesis in rat skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol.*1977; 6:159-69.
- Silao CLT, Padilla CD, Matsuo M. Early diagnosis of maple syrup urine disease using polymerase chain reaction-based mutation detection. *Pediatr Int.* 2014; 56(1):112-5.
- Simon E, Fingerhut R, Baumkötter J, Konstantopoulou V, Ratschmann R, Wendel U. Maple syrup urine disease: favourable effect of early diagnosis by newborn screening on the neonatal course of the disease. *J Inherit Metab Dis.* 2006; 29(4):532-7.
- Sloka JS, Stefanelli M. The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2005; 11:425-32.
- Smith QR, Takasato Y. Kinetics of amino acid transport at the blood-brain barrier studied using an in situ brain perfusion technique. *Ann N Y Acad Sci.* 1986; 481:186-201.
- Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett.* 2004; 361(1-3):184-7.
- Son DO, Satsu H, Shimizu M. Histidine inhibits oxidative stress- and TNF- α -induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *Febs Letters.* 2005; 579(21):4671-7.
- Sparacio SM, Zhang Y, Vilcek J, Benveniste EN. Cytokine regulation of interleukin-6 gene expression in astrocytes involves activation of an NF- κ B-like nuclear protein. *J Neuroimmunol.* 1992; 39(3):231-42.
- Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP: A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell.* 1995; 81(4):513-23.
- Stelwagen K, McFadden HA, Demmer J. Prolactin, alone or in combination with glucocorticoids, enhances tight junction formation and expression of the tight junction protein occludin in mammary cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1999; 156:55-61.
- Strauss KA, Puffenberger EG, Morton DH. Maple syrup urine disease. In: Pagon R, Bird T, Dolan C, Stephens K, Adam M, editors. *GeneReviews.* Seattle, Washington, USA: University of Washington, 2006.
- Strauss KA, Puffenberger EG, Robinson DL, Morton DH. Type I glutaric aciduria, part 1: Natural history of 77 patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2003; 121C(1):38-52.
- 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; 99:333-45.
- Streit WJ, Conde JR, Fendrick SE, Flanary BE, Mariani CL. Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurol Res.* 2005, 27(7):685-91.
- Suzuki J, Imaizumi S, Kayama T, Yushimoto T. Chemiluminescence in hypoxic brain – The second report: Cerebral protective effect of mannitol, vitamin E and glucocorticoid. *Stroke.* 1985; 16:695-700.
- Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A. Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem.* 2006; 281(30):21362-8.
- Tayal V, Kalra BS. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics — An update. *Eur J Pharmacol.* 2008; 579(1-3):1-12.
- Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mos-mann TR, Moore KW, Rennick DM. Interleukin 10: a novel stimulatory factor mast cells and their progenitors. *J Exp Med.* 1991; 173:507-10.
- 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; 15:121-35.
- Tsai CC, Kao SC, Cheng CY, Kau HC, Hsu WM, Lee CF, Wei YH. Oxidative stress change by systemic corticosteroid treatment among patients having active graves ophthalmopathy. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125:1652-6.
- Underwood JL, Murphy CG, Chen J, Franse-Carman L, Wood I, Epstein DL, Alvarado JA. Glucocorticoids regulate transendothelial fluid flow resistance and formation of intercellular junctions. *Am J Physiol.* 1999; 277:C330-42.
- Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience.* 2004; 129(4):1021-9.
- Uyama O, Okamura N, Yanase M, Narita M, Kawabata K, Sugita M. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using evans blue fluorescenc. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988; 8:282-4.
- Viani P, Cervato G, Fiorilli A, Cestaro B. Age-related differences in synaptosomal peroxidative damage and membrane properties. *J Neurochem.* 1991; 56:253-8.
- Vogel KR, Arning E, Wasek B, Mcpherson B, Bottiglieri T, Gibson KM. Brain–blood amino acid correlates following protein restriction in murine maple syrup urine disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2014; 9:73.

- Volpe JJ. Neurology of the newborn: major problems in clinical pediatrics. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001. p.357.
- Walsh KS, Scott MN. Neurocognitive profile in a case of maple syrup urine disease. *Clin Neuropsychol*. 2010; 24:689-700.
- Walterfang M, Bonnot O, Mocellin R, Velakoulis D. The neuropsychiatry of inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis*. 2013; 36:687-702.
- Wang X, Chinsky JM, Costeas PA, Price SR. Acidification and glucocorticoids independently regulate branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase subunit genes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280:C1176-83.
- Wang X, Jurkovitz C, Price SR. Regulation of branched-chain ketoacid dehydrogenase flux by extracellular pH and glucocorticoids. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1997; 272:C2031-6.
- Wang ZJ, Zimmerman RA, Sauter R. Proton MR spectroscopy of the brain: Clinically useful information obtained in assessing CNS diseases in children. *Am J Roentgenol*. 1996; 167:191-9.
- Wang ZJ, Zimmerman RA. Proton MR spectroscopy of pediatric brain metabolic disorders. *Neuroimaging Clin N Am*. 1998; 8:781-807.
- Wee Yong V. Inflammation in neurological disorders: a help or a hindrance? *Neuroscientist*. 2010; 16(4):408-20.
- Weidenfeller C, Schrot S, Zozulya A, Galla HJ. Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone. *Brain Res*. 2005; 1053(1-2):162-74.
- Weksler BB, Subileau E, Perriere N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. Blood brain barrier specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J*. 2005; 19:1872-4.
- Wendel U, Baulny HO. Branched-Chain Organic Acidurias/Acidemias. In: Fernandes J, Saudubray JM, Berghe GV, editores. *Inborn Metabolic diseases*. 3rd ed. 2006. p. 247-51.
- Wolpe SD, Cerami A. Macrophage inflammatory protein 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J*. 1989; 3:2565-73.
- Wendel U, Baulny HO. Branched-Chain Organic Acidurias/Acidemias. In: Fernandes J, Saudubray JM, Berghe GV, editores. *Inborn Metabolic diseases*. 3th ed. 2006. p. 247-251.
- Wu JY, Kao HJ, Li SC, Stevens R, Hillman S, Millington D, Chen YT. ENU mutagenesis identifies mice with mitochondrial branched-chain

- aminotransferase deficiency resembling human maple syrup urine disease. *J Clin Invest.* 2004; 113(3):434-40.
- Wyse ATS, Streck EL, Worm P, Wajner A, Ritter F, Netto CA. Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res.* 2000; 25(7):971-5.
- Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease-A double-edged sword. *Neuron.* 2002; 35(3):419-32.
- Yamagata T, Ichinose M. Agents against cytokine synthesis or receptors. *Eur J Pharmacol.* 2006; 533(1-3):289-301.
- Yokoo H, Chiba S, Tomita K, Takashina M, Sagara H, Yagisita S, Takano Y, Hattori Y. Neurodegenerative evidence in mice brains with cecal ligation and puncture-induced sepsis: preventive effect of the free radical scavenger edaravone. *PLoS One.* 2012; 7(12):e51539.
- Yokoyama WM, Kim S, French AR. The Dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:405-29.
- Youssef S, Stüve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ, Radosevich JL, Hur EM, Bravo M, Mitchell DJ, Sobe RA, Steinman L, Zamvil SS. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune diseases. *Nature.* 2002; 420:78-84.
- Yufu K, Itoh T, Edamatsu R, Mori A, Hirakawa M. Effect of hyperbaric oxygenation on the Na⁺,K⁺-ATPase and membrane fluidity of cerebrocortical membranes after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurochem Res.* 1993; 16:1033-9.
- Zielke HR, Huang Y, Tildon JT, Zielke CL, Baab PJ. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: alpha-ketoisocaproate infusion. *Dev Neurosci.* 1996; 18:420-5.
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Griffin K, Skvorak KJ, Paul HS, Homanics GE, Bewley MC, Cheng KC, Lanoue KF, Flanagan JM. Dual mechanism of brain injury and novel treatment strategy in maple syrup urine disease. *Brain.* 2009; 132:903-18.
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci.* 2006; 9:268-75.
- Ziv Y, Schwartz M. Immune-based regulation of adult neurogenesis: Implications for learning and memory. *Brain Behav Immun.* 2008; 22:167-76.

ANEXOS



Resolução



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

Protocolo: 087/2013-2

Professor Responsável: Emílio Luiz Streck.

Equipe: Felipe Dal Pizzol, Giselli Scaini, Franciele Vuolo e Larissa de Souza Constantino.

Título: “Avaliação de parâmetros inflamatórios, edema cerebral, permeabilidade da barreira hematoencefálica e atividade da Na⁺, K⁺-ATPase em um modelo animal da doença da urina do xarope de bordo tratados com dexametasona”.

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização de 140 Ratos heterogênicos 10 dias 20 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.*

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

Protocol number: 087/2013-2

Principal Investigator: Emílio Luiz Streck.

Researchers: Felipe Dal Pizzol, Giselli Scaini, Franciele Vuolo e Larissa de Souza Constantino.

Project title: “Evaluation of inflammatory parameters, cerebral edema, blood brain barrier permeability and activity of Na⁺, K⁺-ATPase in a model animal disease of urine of maple syrup treated with dexamethasone.”

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

Criciúma, 12 de novembro de 2013.

Patricia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA