

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

**LETICIA BURATO WESSLER**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MODELO  
ANIMAL QUIMICAMENTE INDUZIDO DE DOENÇA DA  
URINA DO XAROPE DO BORDO EM PEIXE-ZEBRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico

**CRICIÚMA  
2017**

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

W515d Wessler, Letícia Burato.

Desenvolvimento e validação de um modelo animal quimicamente induzido de doença da urina do xarope do bordo em peixe-zebra/ Letícia Burato Wessler. - 2017.  
80 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: Emilio Luiz Streck.

Coorientação: Eduardo Pacheco Rico.

1. Doença da urina do xarope do bordo. 2. Estresse oxidativo. 3. Aminoácidos de cadeia ramificada. 4. Leucinose. I. Título.

CDD 23. 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

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 302

Com início às 10h00 (dez horas) do dia vinte e um do mês de dezembro de 2017 (dois mil e dezessete), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Leticia Burato Wessler**, sob a orientação do Prof. Dr. Emílio Luiz Streck, intitulada "**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL QUIMICAMENTE INDUZIDO DE DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO EM PEIXE-ZEBRA**". A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof.<sup>a</sup> Dra. Samira da Silva Valvassori (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof.<sup>a</sup> Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof. Dr. Gustavo da Costa Ferreira (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 11h00 (onze horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Inês da Rosa, Coordenadora do Programa. Criciúma, 21 (vinte e um) de dezembro de 2017 (dois mil e dezessete).

Prof.<sup>a</sup> Dra. **Maria Inês da Rosa**  
Coordenadora do PPGCS  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Inês Rosa  
Coordenadora do PPGCS

*Diana Ghisi Daniel*  
Auxiliar Administrativo PPGCS

*Diana Ghisi*  
Diana Ghisi Daniel  
Secretária



## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver, sendo apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Bioenergética, Laboratório de Sinalização Neural e Psicofarmacologia e Laboratório Multiusuários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na Universidade do Extremo Sul Catarinense.



Dedico este trabalho aos meus pais, avós, madrinhas Mila e Mari, que tanto me apoiaram e incentivaram nessa conquista.





## AGRADECIMENTOS

Á Deus, que me proporcionou o dom da vida e sempre me deu forças para alcançar meus objetivos. Á Nossa Senhora do Caravaggio, que por tantas vezes, fui ao seu pé clamar por piedade e serenidade.

Ao meu pai, que mesmo em outro plano, sempre foi o meu melhor amigo e porto seguro. Obrigada por todo cuidado e incentivo, por me mostrar que podemos perder tudo, mas que o conhecimento ninguém nos tira. À minha mãe, pela vida, por mostrar que a garra nos leva longe e por todas as experiências proporcionadas que modularam minha personalidade.

Aos meus avós Lúcia Gamba e Domingos Burato, fonte de inspiração para toda família. Obrigada por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim. Por cada palavra de incentivo, cuidado e zelo. Obrigada por me acolherem quando mais precisei na vida.

À minha madrinha Mila e ao Tio Juliano, que nunca mediram esforços em me ajudar, me acolhendo como filha em sua casa, me incentivando a ser uma pessoa melhor e a correr atrás dos meus sonhos. Muito obrigada, “bichos”!

À minha madrinha Mari, famosa Didi, que me mostrou o quanto posso ser forte na vida, o tamanho da minha capacidade. Obrigada por ser uma mãe para mim, por sempre estar ao meu lado, apoiando, puxando a orelha e lutando comigo. Teu amor me fez chegar até aqui!

Ao meu irmão Victor Felipe, que por tantas vezes me escutou e deu colo quando precisei.

Ao meu orientador Dr. Emilio Luiz Streck, por me acolher no laboratório desde a iniciação científica. Obrigada pela compreensão, ensinamentos e paciência.

Ao meu coorientador Dr. Eduardo Pacheco Rico, por todo auxílio quando precisei. Obrigada por me mostrar o universo do peixe-zebra!

Aos alunos de iniciação científica, Paulo César Luiz dos Santos, Giselle Ghislandi Vitorette, Karine Vieira, Isabela da Silva Lemos, Cauane Teixeira Presse, Débora Mazzuco e Ketheryn Minatto, que



auxiliaram na realização desse projeto. Obrigada por toda troca de experiências e momentos de descontração.

À Rahisa, do MULTILAB, que insistiu para que conseguíssemos realizar as leituras dos aminoácidos por CLAE. Muito obrigada pela ajuda e paciência!

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

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

À CAPES, pelo apoio financeiro. .



“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência”.

Henry Ford



## RESUMO

A doença da urina do xarope do bordo (DXB) constitui em um distúrbio de herança autossômica recessiva, causada pela deficiência na atividade do complexo  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada, resultando no acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina e de seus respectivos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada e hidroxíácidos correspondentes. Estudos demonstram um grau variável de retardo mental e outros sintomas neurológicos estando relacionados com alterações no estado redox, sugerindo dessa forma, que os danos estejam associados ao estresse oxidativo. Em vista que o Danio rerio, conhecido como peixe-zebra, vem sendo amplamente utilizado como modelo experimental em diversas áreas do conhecimento por apresentar características favoráveis que complementam os modelos experimentais existentes, esse projeto teve como objetivo geral desenvolver um modelo, quimicamente induzido, da Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) em peixes-zebra, avaliando as concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada e possíveis alterações no estresse oxidativo em tecido cerebral. Para isso, utilizou-se peixe-zebra jovens, expostos às concentrações de 1,58  $\mu\text{L/g}$ , 15,80  $\mu\text{L/g}$  e 158,0 $\mu\text{L/g}$ , além do grupo controle, por períodos de 1 hora e 24 horas. Ao fim da indução, os animais passaram por um protocolo de eutanásia com tricafina dissolvida em água, tendo seu conteúdo cerebral dissecado e armazenado adequadamente para as análises. Posteriormente, determinaram-se as concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada por cromatografia líquida de alta eficiência, e avaliaram-se os parâmetros de estresse oxidativo: dosagem de sulfidril, medida de oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína, medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, atividades de superóxido dismutase e catalase. Identificaram-se acúmulos significativos de aminoácidos de cadeia ramificada, na exposição de 24 horas, na dose 158,0 $\mu\text{L/g}$ , em tecido cerebral de peixe-zebra. Ademais, observou-se que a mesma dose, no mesmo período, foi capaz de ocasionar aumento de espécies reativas e dano lipídico. Assim, sugere-se que o modelo animal para a Doença da Urina do Xarope do Bordo, utilizando peixe-zebra, auxilie na melhor compreensão do perfil de toxicidade da exposição a aminoácidos de cadeia ramificada, além de contribuir para um melhor entendimento da utilização do mesmo em futuras investigações e estratégias relacionadas a estudos fisiopatológicos envolvidos nessas condições.





**Palavras-chave:** Doença da urina do xarope do bordo; Estresse oxidativo; Peixe-zebra; Aminoácidos de cadeia ramificada; Leucínose.



## ABSTRACT

Maple syrup urine disease (MSUD) constitutes an autosomal recessive inheritance disorder, caused by deficiency in branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complex activity, resulting in the accumulation of branched-chain amino acids (BCAAs) leucine, isoleucine and valine and their corresponding branched-chain  $\alpha$ -keto acids and corresponding hydroxy acids. Studies demonstrate a variable degree of mental retardation and other neurological symptoms being related to changes in the redox state, thus suggesting that the damage is associated with oxidative stress. In view of the fact that *Danio rerio*, known as zebrafish, has been widely used as an experimental model in several areas of knowledge because it presents favorable characteristics that complement the existing experimental models, this project had the general objective to develop a chemically induced model of the maple syrup urine disease (MSUD) in zebrafish, evaluating branched-chain amino acid concentrations and possible changes in oxidative stress in brain tissue. For this, young zebrafish, exposed to concentrations of 1.58  $\mu\text{L/g}$ , 15.80  $\mu\text{L/g}$  and 158.0  $\mu\text{L/g}$  were used, in addition to the control group, for periods of 1 hour and 24 hours. At the end of the induction, the animals underwent a euthanasia protocol with tricaine dissolved in water, their brain content dissected and stored appropriately for the analyzes. Subsequently, the concentrations of branched-chain amino acids were determined by high performance liquid chromatography, and the parameters of oxidative stress were evaluated: sulfhydryl dosage, oxidation measurement of 2', 7'-dichlorofluorescein, measure of reactive substances thiobarbituric acid, superoxide dismutase and catalase activities. Significant accumulations of branched-chain amino acids were identified in the 24-hour exposure at 158.0  $\mu\text{L/g}$  in brain zebrafish tissue. In addition, it was observed that the same dose, in the same period, was able to cause increase of reactive species and lipid damage. Thus, it is suggested that the animal model for the maple syrup urine disease using zebrafish helps to better understand the toxicity profile of branched-chain amino acid exposure, and contributes to a better understanding of the use of the even in future investigations and strategies related to pathophysiological studies involved in these conditions.

**Keywords:** Maple syrup urine disease; Oxidative stress; Zebrafish; Branched Chair Amino Acids; Leucinosis.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada.....	35
Figura 2: Desenho esquemático representativo do protocolo experimental. Fonte: Do autor.....	53
Figura 3: Determinação das concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada, em tecido cerebral de peixe-zebra, separada por tipo de aminoácidos, nas diferentes doses empregadas.....	59
Figura 4: Determinação das concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada, em tecido cerebral de peixe-zebra, separados por grupos (doses).....	60
Figura 5: Efeito das exposições de 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre o conteúdo de sulfidrilas em tecido cerebral de peixe-zebra.....	61
Figura 6: Efeitos das exposições 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre a oxidação de DCFH em tecido cerebral de peixe-zebra.....	62
Figura 7: Efeitos das exposições de 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em tecido cerebral de peixe-zebra.....	63
Figura 8: Efeitos das exposições de 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (A), da catalase (CAT) (B), e razão entre as atividades de CAT/SOD, em tecido cerebral de peixe-zebra.....	65



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Classificação dos fenótipos da Doença da Urina do Xarope do Bordo levando em consideração as manifestações clínicas e a atividade da enzima CACR.....	41
Tabela 2: Número de animais por procedimentos experimentais.....	58





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AACR - Aminoácidos de cadeia ramificada  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
CO - Graus Celsius  
CAT - Catalase  
CDCCR - Complexo  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada  
CEUA - Comissão de ética no uso de animais  
CG-MS - Cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa (do inglês, gas chromatography/mass spectrometry).  
CIC - Ácido  $\alpha$ - cetoisocapróico  
CIV - Ácido  $\alpha$ -cetoisovalérico  
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência  
CMV - Ácido  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalérico  
CoA – Coenzima A DCFH - 2',7'-diclorofluoresceína (do inglês, 2'7'-*dichlorofluorescein*)  
DCF - 2',7' diclorofluoresceína fluorescente (do inglês, *fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein*)  
DCFH- DA - diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (do inglês, *dichlorofluorescein diacetate*)  
DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)  
Dpf - Dia pós-fertilização  
DTNB - Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (do inglês, 5,5'-*Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*)  
DXB - Doença da urina do xarope do bordo  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EIM - Erros inatos do metabolismo  
ERN - Espécie reativa de nitrogênio  
ERO - Espécie reativa de oxigênio  
FAD - Flavina-adenina-dinucleotídeo  
G6PD - Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (do inglês, *glucose-6-phosphate dehydrogenase*)  
GABA - Ácido gama-aminobutírico (do inglês, *gamma-aminobutyric acid*)  
GPx - Glutaciona peroxidase  
GR - Glutaciona redutase  
GSH - Glutaciona reduzida  
GSSG - Glutaciona oxidada  
HIC - Ácido  $\alpha$ -hidroxiisocapóico  
HIV - Ácido  $\alpha$ - hidroxiisvalérico  
HMV - Ácido 2-hidroxi 3-metilvalérico



KCl - Cloreto de potássio  
MDA - Malondialdeído  
MULTILAB - Laboratório Multiusuários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
NAD<sup>+</sup> - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada (do inglês, *dinucleotide of nicotinamide and adenine*)  
NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida (do inglês, *dinucleotide of nicotinamide and adenine*)  
PBS - Tampão fosfato-salina (do inglês, *phosphate buffered saline*)  
pH - Potencial hidrogeniônico  
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada  
RNA - Ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)  
rpm - Rotações por minuto  
SIEM - Serviço de Informação Sobre Erros Inatos do Metabolismo  
SNC - Sistema nervoso central  
SOD - Superóxido dismutase  
SPSS - Pacote estatístico para análises estatísticas (do inglês, *software package used for statistical analysis*)  
SUS - Sistema Único de Saúde  
TAR - reatividade antioxidante total (do inglês, *total antioxidant reactivity*)  
TBA - Ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid*)  
TBA - RS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid-reactive species*)  
TCA - Ácido tricloroacético (do inglês, *trichloroacetic acid*)  
TNB<sup>2-</sup> - Ânion 2-nitro-5-tiobenzoato (do inglês, *2-nitro-5-thiobenzoate anion*)  
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>33</b>
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO .....	33
1.2 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO .....	34
1.3 HISTÓRICO .....	36
1.4 METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA .....	36
1.5 COMPLEXO DOS A-CETOÁCIDOS DESIDROGENASE DE CADEIA RAMIFICADA .....	37
1.6 ASPECTOS GENÉTICOS.....	38
1.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	38
1.8 DIAGNÓSTICO.....	41
1.9 TRATAMENTO .....	42
1.10 ACHADOS NEUROLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS .....	43
1.11 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO .....	44
1.12 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO .....	46
1.13 MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DO XAROPE DO BORDO .....	47
<b>1.13.1 Modelos existentes da Doença da Urina do Xarope do Bordo</b> .....	<b>47</b>
<b>1.13.2 Modelo animal com peixe-zebra na pesquisa.....</b>	<b>47</b>
1.14 JUSTIFICATIVA.....	49
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>50</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	50
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>51</b>
3.1 ANIMAIS.....	51
3.2 GRUPOS.....	51
3.3 MODELO DA DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO .....	52
3.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	53
3.5 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	53
<b>3.5.1 Preparo da amostra.....</b>	<b>53</b>
<b>3.5.2 Preparo da solução padrão.....</b>	<b>54</b>
<b>3.5.3 Preparo da solução de derivatização .....</b>	<b>54</b>
<b>3.5.4 Condições cromatográficas.....</b>	<b>54</b>
3.6 ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	55
<b>3.6.1 Preparo das Amostras.....</b>	<b>55</b>



<b>3.6.2</b>	<b>Dosagem do conteúdo de sulfidrilas.....</b>	<b>55</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Medida da oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) .....</b>	<b>55</b>
<b>3.6.4</b>	<b>Medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....</b>	<b>56</b>
<b>3.6.5</b>	<b>Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) .....</b>	<b>56</b>
<b>3.6.6</b>	<b>Atividade da Catalase (CAT) .....</b>	<b>57</b>
<b>3.7</b>	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</b>	<b>57</b>
<b>3.8</b>	<b>LOCAL DE REALIZAÇÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>3.9</b>	<b>CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA.....</b>	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>ANÁLISES DAS CONCENTRAÇÕES DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2</b>	<b>ANÁLISES DAS TÉCNICAS DE ESTRESSE OXIDATIVO .....</b>	<b>60</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Efeitos das exposições aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre o conteúdo de sulfidrilas em tecido cerebral de peixe-zebra. 60</b>	
<b>4.2.2</b>	<b>Efeitos das exposições aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre a oxidação de DCFH em tecido cerebral de peixe-zebra. ....</b>	<b>61</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Efeitos das exposições aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em tecido cerebral de peixe-zebra. ....</b>	<b>62</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Efeitos das exposições aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em tecido cerebral de peixe-zebra.....</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>88</b>
	<b>ANEXO A – PARECERES DA COMISSÃO ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....</b>	<b>89</b>





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Archibald Garrod (1908), propôs pela primeira vez o termo Erros Inatos do Metabolismo (EIM), diante de estudos realizados em pacientes com alcaptonúria, observando que os mesmos excretavam na urina grandes quantidades de ácido homogentísico, com uma maior frequência da doença em familiares e maior incidência em casos de consanguinidade. Assim, propôs um modelo de herança autossômica resseciva para doença, obedecendo as Leis de Mendel, relacionando o acúmulo do metabólito a uma deficiência catabólica. Com o avanço de novos estudos, diversos EIM foram descritos, onde esses afetam diferentes rotas do metabolismo humano (Garrod, 1909; Scriver et al., 2001).

Os EIM são identificados como defeitos hereditários, em grande parte de herança autossômica resseciva, geralmente causados pela deficiência na atividade de uma determinada enzima, onde a diminuição da atividade enzimática ocasiona um bloqueio parcial ou total da rota metabólica em questão, ocasionando o acúmulo do substrato e a falta do produto final. Indivíduos afetados pelo EIM possuem sintomatologia diversificada devido aos sintomas e gravidade estarem relacionados com a rota metabólica afetada, sendo geralmente o sistema nervoso central o mais afetado (Scriver et al., 2001; Gotti e Clementi 2004). Quando diagnosticados e tratados precocemente, evitam-se graves sequelas que podem até mesmo levar o indivíduo ao óbito (Saudubray e Charpentierc, 2001).

A classificação dos EIM ocorre de acordo com repercussão celular e metabólica, apresentando quatro tipos de distúrbio. Os distúrbios de transporte afetam o transporte renal e/ou intestinal de moléculas orgânicas ou inorgânicas, sendo em grande parte desencadeados por dieta, levando à depleção tecidual e desnutrição. Nos distúrbios de armazenamento, degradação e secreção ocorre o acúmulo de substratos que são depositados nas células em quantidades anormais, levando à alteração da forma e funcionamento. Nos distúrbios de síntese, a síntese de moléculas ocorre de forma incompleta ou anormal. Já os distúrbios do metabolismo intermediário, há uma deficiência enzimática das rotas de metabolização de pequenas moléculas, levando ao acúmulo do substrato da enzima deficiente e seus metabólicos e a deficiência do produto final da rota, caso esse não seja suprido por outra via metabólica (Karam et al., 2001).

Essas doenças são consideradas raras, entretanto, quando analisados em um todo, afetam 1: 1.000 nascidos vivos (Scriver et al., 2001), correspondendo a cerca de 10% das doenças genéticas. Já foram descritos cerca de 500 distúrbios envolvendo defeitos na síntese, transporte, armazenamento e degradação de moléculas no organismo (Jimenez-Sanchez et al., 2001).

O Brasil conta com o Serviço de Informação Sobre Erros Inatos do Metabolismo (SIEM) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Criado em 2001, o serviço é um centro de referência nacional para o diagnóstico e tratamento de erros inatos do metabolismo e dos registros dos mesmos. Além disso, conta com um serviço telefônico gratuito, que presta informações para médicos e profissionais da saúde envolvidos no diagnóstico e tratamento de pacientes com suspeita ou diagnóstico confirmado de EIM, através de uma equipe multidisciplinar. O tratamento necessário para essas doenças é fornecido sem nenhum custo para o paciente, e geralmente é financiado por pesquisas (Herber et al., 2015).

## 1.2 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO

A Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) é um erro inato de metabolismo originado da deficiência da atividade do complexo  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR), a segunda enzima no caminho para a degradação dos três aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) (Chuang e Shih, 2001; Atwal et al. 2015). Essa deficiência ocorre devido às mutações nas proteínas da subunidade E1 $\alpha$  ou E1 $\beta$  da enzima E1 ou da proteína da enzima E2 do CDCCR, sendo responsáveis pela o desencadeamento da doença (Sperringer et al., 2017).

Tal alteração no CDCCR é responsável pelo acúmulo tecidual dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina, além dos seus respectivos  $\alpha$ -cetoácidos correspondentes, ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico (CIC),  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalérico (CMV) e  $\alpha$ -cetoisovalérico (CIV), além dos hidroxíácidos correspondentes, ácido  $\alpha$ -hidroxiiisocapróico (HIC), ácido  $\alpha$ -hidroxiiisovalérico (HIV) e ácido 2-hidroxi 3-metilvalérico (HMV) (Figura 1) (Meister, 1965; Chuang e Shih, 2001, Harris et al., 2004; Bouchereau et al., 2017; Sperringer et al., 2017).

Estima-se a incidência mundial da DXB em 1:185.000 nascidos vivos, entretanto essa incidência é maior em comunidades Menonitas, onde estima-se 1: 200 nascidos vivos, devido a fatores de

consanguinidade (Chuang e Shih, 2001). No Brasil, considera-se uma incidência média de 1: 100.000, nascidos vivos (Herber et al.,2015).

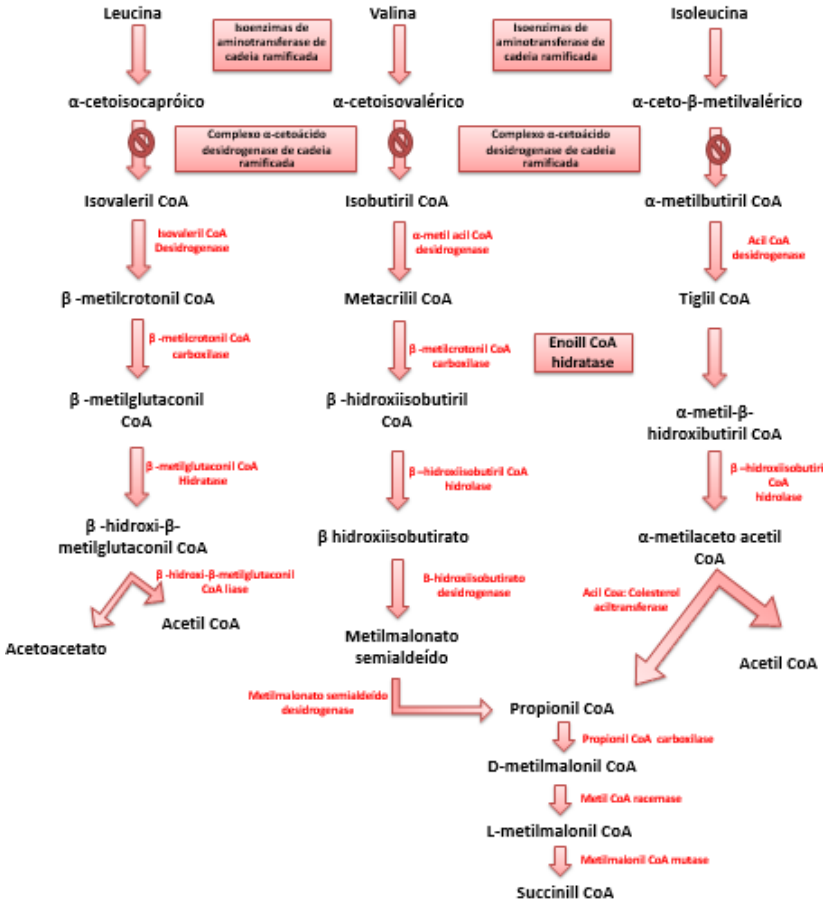


Figura 1: Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada. A transaminação por isoenzimas de aminotransferase de cadeia ramificada e descarboxilação oxidativa por complexo  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada são as etapas iniciais comuns no catabolismo de AACR. É possível visualizar o bloqueio do metabolismo que ocorre na Doença da Urina do Xarope do Bordo, devido à deficiência do complexo  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada. Fonte: Adaptado Sperringer et al.,2017.

### 1.3 HISTÓRICO

Menkes et al. (1954), relataram quatro casos de uma doença cerebral degenerativa familiar, tendo início na primeira semana de vida e evoluindo para óbito dentro de três meses, sendo caracterizada por edema cerebral, convulsões, espasticidade e dificuldade respiratória. Observou-se também a características mais marcantes da doença, a urina apresentando um odor semelhante ao do xarope do bordo, com um cheiro adocicado parecido com açúcar queimado ou caramelo, originando assim o nome Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB). O odor é atribuído à elevação dos níveis de aminoácidos e  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada, que são identificados nos fluídos corporais destes pacientes, sugerindo na década de 50, um bloqueio metabólico no catabolismo destes compostos (Menkes, 1954; Westall et al.,1957; Menkes et al., 1959).

Na década 60, observou-se a deficiência do complexo enzimático, responsável pela descarboxilação dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada, como causa bioquímica da doença, por meio de estudos enzimáticos em leucócitos e fibroblastos de pacientes afetados (Dancis et al., 1960). Em 1964, Snyderman et al., sugeriram o primeiro tratamento para a doença, sendo baseado em uma dieta com restrição dos aminoácidos de cadeia ramificada.

### 1.4 METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA

Os AACR leucina, isoleucina e valina são nutricionalmente essenciais, sendo necessários para a síntese protéica. Também são utilizados como fonte de energia alternativa quando consumidos em excesso de necessidades anabólicas ou durante catabolismo de proteína muscular endógena (Frazier et al.,2014; Sperringer et al.,2017). As enzimas responsáveis pela degradação desses aminoácidos são encontradas em diversos tecidos e geralmente requerem o deslocamento dos metabólitos para o catabolismo completo (Sperringer et al.,2017).

A oxidação dos aminoácidos de cadeia ramificada inicia com o transporte deles para dentro da célula por meio do sistema de transporte L, localizado na membrana plasmática. As etapas iniciais são comuns aos aminoácidos. Primeiramente, ocorre a transaminação reversível nos tecidos extra-hepáticos, sendo catalizada pelas isoenzimas de aminotransferase de cadeia ramificada, produzindo  $\alpha$ -cetoisocapróico da leucina,  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalérico da isoleucina e  $\alpha$ -cetoisovalérico da

valina. Posteriormente, os  $\alpha$ -cetoácidos são translocados para dentro da mitocôndria através de um transportador específico, sofrendo descarboxilação oxidativa catalisada pelo complexo multienzimático dos  $\alpha$ -cetoácidos desidrogenase de cadeia ramificada. Assim, ocorre a desidrogenação pela isovaleril-CoA desidrogenase ou pela acil-Coa  $\alpha$ -metil desidrogenase de cadeia ramificada. A sequência de reações dos respectivos acil CoA de cadeia ramificada possuem vias distintas a partir desse momento. Sugere-se que o fígado é um local primário de oxidação (Chuang e Shih, 2001; Sperringer et al.,2017).

A leucina é unicamente cetogênica, produzindo acetoacetato e acetil CoA, enquanto que a valina é unicamente gluconeogênica, produzindo succinil CoA. Quando analisamos a isoleucina, percebe-se que a mesma é tanto cetogênica como gluconeogênica, produzindo acetil CoA e succinil CoA (Sperringer et al.,2017). Por serem tanto cetogênicos quanto glicogênicos, esses aminoácidos são precursores para a síntese de ácidos graxos e do colesterol, servindo também como substrato para a produção de energia via succinil-CoA e acetoacetato (Chuang e Shih, 2001).

### 1.5 COMPLEXO DOS A-CETOÁCIDOS DESIDROGENASE DE CADEIA RAMIFICADA

O Complexo dos  $\alpha$ -cetoácidos desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR) consiste em um complexo com múltiplas cópias de três enzimas, localizado na membrana mitocondrial interna das células de mamíferos, envolvido na descarboxilação dos AACR. A atividade do complexo é controlada através da fosforilação/desfosforilação das subunidades E1, por meio de uma quinase e uma fosfatase específicas (Chuang e Shih, 2001, Burrage et al.,2014; Sperringer et al.,2017).

A atividade do complexo é responsável por regular o fluxo dos AACR usados para a produção de energia, sendo também um passo irreversível da via catabólica. O complexo, compreendido como uma macromolécula possui três componentes catalíticos: uma  $\alpha$ -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada heterotetramérica ( $\alpha 2\beta 2$ ) ou E1 (12 cópias); uma di-hidrolipoil transacilase (24 cópias), ou E2; e uma di-hidrolipoamida desidrogenase homodimérica, ou E3 (6 cópias) (Reed e Hackert, 1990; Sperringer et al.,2017). Os componentes E1 e E2 são específicos para complexo dos  $\alpha$ -cetoácidos desidrogenase de cadeia ramificada, já a proteína E3 é também componente dos complexos  $\alpha$ -cetogluturato e piruvato desidrogenase (Reed e Hackert, 1990).

O componente E1 catalisa uma descarboxilação dos  $\alpha$ -cetoácidos mediada pela tiamina pirofosfatase (Treacy et al., 1992; Peinemann e Danner, 1994; Chuang e Shih, 2001), reduzindo a molécula de lipoil que é covalentemente ligada a E2. A molécula do lipoil reduzida e o seu domínio são utilizados para transferir o grupo acil do E1 para a CoA, aumentando assim a quantidade de acil-CoA. O componente E3, ligado fortemente ao FAD, reoxida o resíduo de di-hidrolipoil do E2 tendo o NAD<sup>+</sup> como último aceptor de elétrons (Reed e Hackert, 1990; Chuang e Shih, 2001). Esse processo tem como resultado final a produção de acil CoA de cadeia ramificada, CO<sub>2</sub> e NADH (Danner et al., 1979).

## 1.6 ASPECTOS GENÉTICOS

O complexo  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada humano é codificado por seis lócus genéticos: E1 $\alpha$ , E1 $\beta$ , E2, E3, CDCCR quinase e CDCCR fosfatase. Baseando-se na subunidade afetada do CDCCR, a Doença da Urina do Xarope do Bordo é classificada em quatro grupos moleculares, que demonstram a heterogeneidade genética (Chuang e Shih, 2001; Chuang et al., 2008). Entre os tipos, cita-se: tipo I $\alpha$  para as mutações no gene BCKDHA (subunidade E1 $\alpha$ ); tipo I $\beta$  para as mutações encontradas no gene BCKDHB (subunidade E1 $\beta$ ), tipo II para mutações no gene DBT (subunidade E2) e tipo III para mutações no gene DLD (subunidade E3) (Fisher et al., 1991; Nellis e Danner, 2001; Quental et al., 2008). Os genes que codificam as subunidades catalíticas (E1 $\alpha$ , E1 $\beta$ , E2, E3, CDCCR quinase e CDCCR fosfatase) foram mapeados para os locus cromossômicos: 19q13.1-13.2; 6q14; 1p31; 7q31-32, 16p11.2 e 4q22.1, respectivamente (Frazier et al., 2014). De acordo com a Base de Dados de Mutação Genética Humana, relataram-se, até o momento, 259 mutações causadoras da Doença da Urina do Xarope do Bordo (Imtiaz et al., 2017).

## 1.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas dos indivíduos afetados com DXB são variadas e dependem da atividade enzimática residual a qual será responsável por diferentes fenótipos clínicos. Esses fenótipos clínicos são classificados em forma clássica e variantes, podendo essas ser intermediária, intermitente, responsiva à tiamina e deficiência de lipoamida desidrogenase E3 (Tabela 1). A classificação da doença leva

em consideração a idade de início dos sintomas e gravidade da doença (Chuang e Shih, 2001; Serra et al., 2010)

A forma neonatal clássica consiste na mais comum e grave da doença, correspondendo a cerca de 80% dos casos de DXB. Esses pacientes apresentam sucção débil, letargia, perda de peso, além do odor característico da doença presente na urina ou no cerúmen. Casos não tratados podem evoluir para edema cerebral, convulsões, opistótono, coma e óbito (Pires, 2001; Chuang et al., 2006). O aumento da concentração plasmática de leucina está relacionado diretamente com a intensidade do odor na urina, sendo esse mais evidente em episódios de descompensação metabólica (Chuang e Shih, 2001).

O período assintomático da forma clássica varia de um dia a duas semanas, dependendo do grau da deficiência CDCCR e da quantidade de proteína ingerida. O jejum das primeiras horas de vida, que ocasiona o catabolismo endógeno proteico, pode levar a um aumento nos níveis de leucina, podendo esse ser superior a 2.000  $\mu\text{mol/L}$  (Morton et al., 2002; Serra et al., 2010).

Os pacientes que apresentam a forma intermediária frequentemente são assintomáticos no período neonatal, porém podem exibir o odor de xarope do bordo presente no cerúmen, níveis elevados dos aminoácidos, distúrbios alimentares e de crescimento, atraso do desenvolvimento durante a infância, ou apresentar um quadro de retardo mental progressivo e inespecífico, além de apresentar entre 0% a 30% de atividade normal do CDCCR (Chuang e Shih, 2001). O diagnóstico da forma intermediária ocorre geralmente entre cinco meses e sete anos de idade. Vale ressaltar que os afetados são vulneráveis às mesmas sequelas agudas ou crônicas dos pacientes com a forma clássica (Strauss et al., 2010).

A forma intermitente da doença possui um diagnóstico e sintomas mais tardios, sendo detectados perante a um atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e/ou crises metabólicas agudas, tendo de 5% a 25% da atividade normal do CDCCR. As descompensações metabólicas ocorrem perante a um quadro infeccioso ou devido à sobrecarga proteica na dieta (Chuang e Shih, 2001; Wendel e Baulny, 2006). Neste tipo de forma, os pacientes frequentemente toleram a ingestão de leucina proveniente de uma dieta normal. Os níveis de aminoácidos e ácidos orgânicos podem ser normais ou então apresentarem leves elevações, embora nos períodos de estresse fisiológico os pacientes apresentem características clínicas e bioquímicas da forma clássica (Strauss et al., 2010).

Na forma responsiva à tiamina os pacientes apresentam um melhor quadro clínico, uma vez que cerca de 2% a 40% da atividade enzimática funciona normalmente. Os afetados não demonstram sintomas neonatais, entretanto, na vida adulta, podem ter um curso semelhante à forma intermediária. Devido à dificuldade na classificação das formas, inicia-se geralmente o tratamento do paciente com tiamina e restrição de AACR, não sendo possível afirmar uma melhora do mesmo apenas com a tiamina (Chuang et al., 2004).

Na forma originada pela deficiência da subunidade E3, os sintomas podem apresentar-se tanto no período neonatal como de forma mais tardia, sendo associados à acidose láctica grave (Chuang e Shih, 2001). Levando em consideração que a subunidade E3 do CDCCR é componente dos complexos da piruvato desidrogenase e da desidrogenase do  $\alpha$ -cetoglutarato, essa forma possui fenótipos clínico e bioquímico distintos, sendo caracterizada por elevações plasmáticas de lactato, piruvato e alanina (Chuang e Shih, 2001; Strauss et al., 2006).

Além da atividade enzimática residual, outros fatores influenciam na expressividade da doença, como ingestão de calorias, quantidade e qualidade das proteínas ingeridas, frequência e gravidade das infecções, estresse fisiológico e fase de crescimento em que está o paciente nos quadros de descompensações metabólicas. Vale lembrar que pacientes com o mesmo genótipo podem variar na resposta cerebral à crise metabólica, onde alguns são mais vulneráveis do que os outros para as complicações neurológicas (Chuang e Shih, 2001; Strauss et al., 2010).



Tabela 1: Classificação dos fenótipos da Doença da Urina do Xarope do Bordo levando em consideração as manifestações clínicas e a atividade da enzima CACR.

<b>Fenótipo clínico</b>	<b>Manifestações clínicas</b>	<b>Atividade enzimática</b>
Clássica	Dificuldade de alimentação, letargia, hipoglicemia cetoacidose, alterações neurológicas, convulsões, coma.	0-2%
Intermediária	Atraso no desenvolvimento físico e psicomotor, cetoacidose pouco frequente.	0-30%
Intermitente	Episódios de ataxia / cetoacidose precipitado por infecções.	5-20%
Responsivo á tiamina	Similar á forma intermediária.	2-40%
Deficiência de E3	Sem sintomas neonatais, hipotonia, acidose láctica, atraso no desenvolvimento.	0-25%

Fonte: Adaptado de Chuang e Shih, 2001.

## 1.8 DIAGNÓSTICO

A DXB pode ser identificada em um teste de triagem neonatal, conhecido como Teste do Pezinho. O teste realizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) não completa a DXB, sendo ofertado apenas por laboratórios particulares. O teste pode ser realizado em papel filtro por cromatografia de aminoácidos, tendo um resultado semi-quantitativo, ou por espectrometria de massa em Tandem (Tandem MS/MS), com

resultado quantitativo (Souza et al.,2002). Os cetoácidos de cadeia ramificada possuem detecção através da análise de ácidos orgânicos na urina por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-MS) (Wajner e Vargas, 2002; Chuang et al., 2006).

O teste diagnóstico, baseado em análises laboratoriais, é frequentemente realizado em três situações: paciente com teste de triagem positivo para DXB, pacientes com sintomas sugestivos de DXB ou pacientes com história familiar positiva para DXB; tendo como objetivo detectar concentrações séricas aumentadas dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina no sangue (Chuang e Shih, 2001; Strauss et al.,2006)

Exames complementares como avaliação da atividade enzimática CDCCR em linfócitos, biópsia do fígado, fibroblastos da pele, podem ser realizados no diagnóstico da doença. Exames de imagem são usados para avaliar o grau de envolvimento neurológico e definição do prognóstico (Strauss et al., 2006).

## 1.9 TRATAMENTO

O tratamento para a Doença da Urina do Xarope do Bordo é realizado conforme a fase da doença em que o paciente se encontra, baseando-se nos valores dos aminoácidos no plasma do paciente (Ramon e Jauregui, 2005; Serra et al., 2010), podendo ocorrer de forma exógena, através de diálise e hemofiltração, por exemplo, ou por via endógena, através de dieta específica (Cardoena et al.,2016).

Na restrição dietética dos AACR, usada na fase de manutenção, os pacientes recebem uma fórmula específica para a doença, consistindo em um complemento alimentar isento de AACR, possuindo outros aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais e oligoelementos (Ramon e Jauregui, 2005). Tal restrição é adotada objetivando outros aminoácidos a competirem com os AACR pelo transportador de aminoácidos neutros no cérebro, acarretando em uma redução do aporte de AACR para o cérebro (Strauss et al., 2010).

A dieta deve ser calculada a partir dos níveis séricos de AACR que o paciente apresenta (Valadares et al., 2006), além de se levar em conta a necessidade calórica diária. Com isso, as concentrações plasmáticas devem variar para a leucina entre 100-300  $\mu\text{mol/L}$ , isoleucina de 200-400  $\mu\text{mol/L}$  e valina 200-400  $\mu\text{mol/L}$ , sendo que níveis plasmáticos normais desses aminoácidos, após 2 a 3 horas da ingestão de proteínas, 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).

No entanto, o excesso de restrição dietética pode ocasionar um atraso no crescimento e desenvolvimento, anemia, imunodeficiência, desmielinização e lesões de pele (Morton et al., 2002). Ademais, mesmo com uma dieta cuidadosamente monitorada, doenças secundárias podem levar a crise metabólica e danos neurológicos. Sabe-se ainda, que a restrição alimentar dos indivíduos com DXB, podem ocasionar uma diminuição da ingestão de antioxidantes, como selênio e L-carnitina, contribuindo para o dano oxidativo já descrito na doença (Sitta et al., 2014). Dessa forma, um tratamento alternativo para a DXB é o transplante hepático eletivo (Mazariegos et al., 2012).

O transplante hepático possibilita ao paciente uma dieta livre (Serra et al., 2010), uma vez que levaria a um aumento de cerca de 10% do normal do CDCCR sobre o organismo, podendo ser suficiente para manter a homeostase dos aminoácidos e aumentar a tolerância do paciente na ingestão de proteínas. Isso ocorre, pois, a enzima tem como objetivo a regulamentação, adaptando assim as taxas de oxidação e condições fisiológicas, mantendo dessa forma as concentrações de AACR no plasma em jejum e doenças infecciosas (Strauss et al., 2006; Mazariegos et al., 2012). Infelizmente, a escassez de fígados para transplante, riscos cirúrgicos e uso de imunossupressores ao longo da vida limitam esta opção de tratamento (Mazariegos et al., 2012).

Pesquisadores estudam novas terapias para o tratamento de DXB, utilizando substâncias como a norleucina, antioxidantes, fenilbutirato de sódio e L-carnitina. Entretanto, os dados são limitados para indicar como essas terapias adjuvantes irão impactar ou alterar as recomendações dietéticas. Futuramente, novas diretrizes para o tratamento podem ser esperadas a fim de melhorar o prognóstico desses pacientes (Frazier et al., 2014).

## 1.10 ACHADOS NEUROLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS

Mecanismos de neurotoxicidade são responsáveis por sequelas neurológicas observadas em pacientes afetados com DXB. Tais mecanismos incluem privação de energia, desregulação osmótica, alterações nas concentrações do glutamato, GABA, aspartato e aminobutírico no cérebro, redução da absorção de aminoácidos essenciais no tecido cerebral, apoptose de células neurais, estresse oxidativo, aumento da atividade da acetilcolinesterase no cérebro,

alterações dos níveis de neurotrofina e da neurotransmissão excitatória / inibitória através do SNC (Walterfang et al.,2013; Scaini et al., 2014).

Também se percebe, através de estudos, que os altos níveis de AACR e seus respectivos  $\alpha$ -cetoácidos são responsáveis por alterações comportamentais em pacientes acometidos pela DXB. É relatado que as deficiências na aprendizagem, memória e comportamento são causadas, pelo menos em parte, por alterações na função do sistema colinérgico (Scaini et al.,2012). Ademais, pacientes com DXB possuem altos riscos de problemas como depressão e ansiedade (Strauss e Morton, 2003; Muelly et al.,2013;Walterfang et al., 2013).

### 1.11 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres compreendem estruturas químicas que apresentam um elétron desemparelhado, tornando-os mais instáveis, reativos e com maior capacidade de combinação inespecífica com moléculas integrantes da estrutura celular (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) engloba os radicais formados pela redução do oxigênio (superóxido ( $O_2 \bullet^-$ ), hidroxila ( $OH\bullet$ ), como também alguns não radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlet ( $1O_2$ ), existindo ainda espécies reativas de nitrogênio (ERN), representadas principalmente pelo óxido nítrico ( $NO\bullet$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007). Ressalta-se que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, apresentam grande variedade de espécies reativas quimicamente distintas com diversas reatividades biológicas, podendo ser mensuradas através de técnicas quimioluminescência e fluorescência (Gilbert, 1981; Halliwell e Gutteridge, 2007; Winterbourn, 2008; Murphy et al., 2011; Kalyanaraman et al.,2012). A 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), por exemplo, é utilizada como medida de espécies reativas de oxigênio em meio aquoso (LeBel et al.,1992).

Vale lembrar, que tanto as ERO, como as ERN, em baixos níveis, são necessárias para processos bioquímicos, porém a produção excessiva dessas espécies ou a deficiência na remoção, ocasionam um estado pró-oxidante, favorecendo o aparecimento de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares. Assim, os radicais livres são capazes de promover a lipoperoxidação, oxidação de proteínas e interação com o DNA e RNA, ocasionando alterações celulares, mutações ou distúrbios de transcrição (Halliwell, 1996; Delanty e Dichter, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Já os antioxidantes, substâncias endógenas ou exógenas, atuam na redução da formação de radicais livres, ou então, promovendo sua inativação, evitando dessa forma, danos celulares. Tais substâncias, podem ser classificadas como não enzimáticas e enzimáticas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Os compostos não enzimáticos agem sem degradar diretamente o radical livre, onde se pode citar, a coenzima Q, ácido úrico, glutatona reduzida (GSH), ácido lipoico e bilirrubina. Já antioxidantes enzimáticos, atuam na detoxificação celular das espécies reativas de oxigênio, onde se pode citar a enzima superóxido dismutase (SOD), catalisando a dismutação do radical superóxido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; a enzima catalase (CAT) responsável pela decomposição direta do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formando água (H<sub>2</sub>O) e oxigênio (O<sub>2</sub>); e a enzima glutatona peroxidase (GPx), catalisando a decomposição de peróxidos através da oxidação da GSH, formando dessa forma, a glutatona oxidada(GSSG). Do ponto de vista fisiológico, a GPx funciona acoplada a enzima glutatona redutase (GR), que catalisa a redução da GSSG, usando assim, o NADPH como coenzima (Halliwell, 2001; Bonnefoy et al., 2002; Salvador e Henriques 2004, Halliwell e Gutteridge, 2007, Viña et al., 2013).

Observa-se em organismos saudáveis um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. Entretanto, situações patológicas podem ocasionar perturbações do equilíbrio, por meio da diminuição das defesas antioxidantes, ou pelo aumento na produção de espécies reativas. Há então, modificações diretas de macromoléculas tanto intracelulares, como extracelulares, ou alteração do estado redox dessas moléculas, levando dessa forma, ao estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007; Ristow et al., 2010; Dai et al., 2014; Halliwell e Gutteridge, 2015).

Decorrente do estresse oxidativo, há o favorecimento de ocorrência de lesões oxidativas em biomoléculas, como lipídios, DNA e proteínas, por meio da lipoperoxidação na membrana celular, oxidação de proteínas, lesões ao DNA e RNA, morte celular por apoptose ou necrose (Dexter et al., 1989; Halliwell, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Apesar de todos os tecidos humanos serem suscetíveis ao dano oxidativo, evidências sugerem que o cérebro apresente maior sensibilidade aos seus danos. Tal fato se daria devido ao alto consumo de oxigênio apresentado por este tecido, grande quantidade de lipídios poliinsaturados em suas membranas neuronais, autooxidação de neurotransmissores, alto conteúdo de ferro e baixo nível de defesas antioxidantes (Halliwell 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Dados relatam a atuação do estresse oxidativo em doenças degenerativas, incluindo doenças metabólicas, como na Doença da Urina do Xarope do Bordo (Colomé et al., 2000; Bridi et al., 2003; Fontella et al., 2002; Wajner et al., 2004; Ribas et al., 2010; Mescka et al., 2013; Taschetto et al., 2017).

## 1.12 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO

Observam-se em estudos com animais, que tanto os aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) como seus respectivos  $\alpha$ -cetoácidos, foram capazes de estimular a lipoperoxidação em homogeneizado de cérebro de ratos (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003). Principalmente a leucina e o ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico, reduziram a capacidade do cérebro em modular o dano associado ao aumento na produção de radicais livres e que a lipoperoxidação estimulada pela leucina pode ser atenuada por antioxidantes como vitaminas C e E, glutathione reduzida e superóxido dismutase (Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005a; Bridi et al., 2005b).

Evidências sugerem ainda, que a restrição dietética, tratamento utilizados por esses pacientes, leve a uma redução nas defesas antioxidantes devido à deficiência de nutrientes essenciais, como vitaminas e minerais, aterando parâmetros de estresse oxidativo (Artuch et al., 2004; Barschak et al., 2006).

Verificou-se um aumento acentuado das medidas de TBA - RS em plasma de pacientes com DXB (Barschak et al., 2006; Barschak et al., 2008a; Barschak et al., 2008b; Barschak et al., 2009). Mescka e colaboradores (2011) demonstraram que animais submetidos ao modelo quimicamente induzido de DXB apresentaram peroxidação lipídica e dano a proteína. Observaram também uma diminuição na atividade da catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) em córtex cerebral de ratos.

Já em 2013, Mescka et al., relatam em seus estudos, um aumento significativo de malondialdeído (MDA) em pacientes com DXB, sendo esses níveis diminuídos, após a suplementação de L-carnitina. Stadtman e Levine (2003), assim como Mescka et al. (2013), demonstram além das modificações dos níveis de MDA, alterações nos níveis de carbonila, indicando dano de proteína em pacientes acometidos.

Em 2016, Mescka et al., demonstram um aumento significativo de medidas de TBA - RS, teor de carbonila, níveis de DCF e CAT. Em contrapartida, relatam diminuição dos níveis de SOD, GPx, G6PD e

GSH. Ademais, Taschetto et al. (2017) observaram que a administração de CIC induziu aumento nos níveis de TBA - RS, teor de proteína carbonila, alterações na atividade de SOD e diminuição significativa da atividade da CAT em tecido cerebral de ratos jovens.

## 1.13 MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DO XAROPE DO BORDO

### 1.13.1 Modelos existentes da Doença da Urina do Xarope do Bordo

Modelos animais semelhantes à Doença da Urina do Xarope do Bordo já foram descritos na literatura em camundongos, ratos e peixe-zebra. Relatou-se um modelo experimental em camundongo com uma deficiência enzimática semelhante à DXB humana, com elevações de aminoácidos de cadeia ramificada, além de arginina e glicina (Morton et al., 2002). Percebe-se ainda, a descrição de um modelo agudo quimicamente induzido de DXB em ratos de 10 dias de idade (Morton et al., 2002), assim como um modelo com ratos de 10 e 30 dias de idade, com elevações dos níveis de leucina, isoleucina e valina (Bridi et al., 2006). Já Homanics et al. (2006), descreveram um modelo animal com ratos geneticamente modificados, apresentando sintomas semelhantes às variantes de DXB clássica e intermediária. Ademais, Friedrich et al. (2012), relatam um modelo animal utilizando morfólino com mutação no gene E2, possuindo dessa forma, alterações semelhantes as encontradas na Doença da Urina do Xarope do Bordo.

### 1.13.2 Modelo animal com peixe-zebra na pesquisa

O peixe-zebra (*Danio rerio*) consiste em um pequeno teleosteo, medindo entre 3 a 4 cm, de água doce, pertencente à família Cyprinidae. Tal animal vem sendo amplamente utilizado como modelo experimental em diversas áreas do conhecimento, como genética e genômica, teratologia, biologia do desenvolvimento, comportamento e toxicologia (Vascotto et al., 1997). Este peixe apresenta características favoráveis como pequeno espaço requerido para manutenção, rápido desenvolvimento e grande prole (Lele e Krone, 1996). Ademais, os grandes segmentos dos cromossomos do peixe-zebra estão em sintonia com os cromossomos humanos e dos camundongos, sendo que muitos genes apresentam um alto grau de similaridade, quando analisado em sua sequência (Barbazuk et al., 2000). Em 2001, o Instituto Sanger iniciou o sequenciamento do genoma total do peixe-zebra, observando uma homologia de aproximadamente 70-80% com o genoma humano

(Stern e Zon, 2003). Ademais, o genoma mitocondrial já está sequenciado, servindo de base para estudos filogenéticos (Broughton et al., 2001).

O peixe-zebra vem se tornando um animal complementar aos roedores, principalmente para estudos translacionais em larga escala. Observa-se seu uso em estudo das bases moleculares da neurobiologia, auxiliando na identificação de genes envolvidos na formação de circuitos neuronais, no comportamento e nos mecanismos envolvidos na neuropatogênese (Barbazuk et al., 2000; Goldsmith, 2004; Guo, 2004; Gerlai et al., 2006; Lieschke e Currie, 2007; Ebarasi et al., 2011). Seu sistema de absorção de componentes diretamente da água pelas suas brânquias, leva ao acúmulo de substâncias em diferentes tecidos, dentre os quais o SNC (Grosell e Wood, 2002; Blank et al., 2009; Froehlicher et al., 2009; Yang et al., 2009).

Identificaram-se e descreveram-se diversos sistemas de neurotransmissão amplamente estudados em mamíferos em peixe-zebra, como o colinérgico (Behra et al., 2002), dopaminérgico (Boehmler et al., 2004), GABAérgico (Kim et al., 2004), glutamatérgico (Edwards e Michel, 2002), histaminérgico (Kaslin e Panula, 2001), serotoninérgico (Rink e Guo, 2004) e purinérgico (Kucenas et al., 2003; Rico et al., 2003; Senger et al., 2004; Rosemberg et al., 2010; Savio et al., 2012; Vuaden et al., 2016).

Além disso, o modelo animal utilizando peixe-zebra em Erros Inatos de Metabolismo vem sendo empregado, como se percebe num estudo de Friedrich et al. (2012), onde usaram morfolinóis para avaliação de mutação no gene E2, anormalidades no SNC, disfunção motora e níveis aumentados de AACR, percebendo aspectos moleculares, bioquímicos, celulares e comportamentais semelhantes aos indivíduos acometidos pela Doença da Urina do Xarope do Bordo. Observou-se ainda que os animais apresentavam mecanismos semelhantes que regulam o metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada. Já Vuaden et al. (2016), descreveram um modelo de Hipermetioninemia, analisando a captação de glutamato e a hidrólise de nucleotídeos.

Diante disso, busca-se desenvolver e validar um modelo quimicamente induzido da Doença da Urina do Xarope do Bordo, avaliando as concentrações de AACR e parâmetros de estresse oxidativo, contribuindo dessa forma, para um melhor entendimento da utilização do peixe-zebra em pesquisas futuras, além de contribuir para o melhor entendimento da fisiopatologia da doença.



## 1.14 JUSTIFICATIVA

Estudos indicam que pacientes com DXB apresentam danos cerebrais e comportamentais, onde alterações dos níveis de aminoácidos de cadeia ramificada e estresse oxidativo, por exemplo, possam estar envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos. Entretanto, mais estudos são necessários para uma explicação satisfatória para os sintomas que acometem pacientes com DXB. Dessa forma, levando-se em consideração que o peixe-zebra vem sendo utilizado em estudos translacionais em larga escala, torna-se necessário desenvolver e validar um novo modelo animal, quimicamente induzido, semelhante à Doença da Urina do Xarope do Bordo em peixe-zebra, por meio da avaliação das concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada, em tecido cerebral, e por meio de parâmetros de estresse oxidativo, onde suas alterações são encontradas tanto em pacientes afetados, como em modelos animais com ratos. Assim, pretendeu-se melhor compreender a complexidade da fisiologia celular e molecular envolvida em torno dos danos neuroquímicos, relacionados aos altos níveis de aminoácidos de cadeia ramificada e seus respectivos  $\alpha$ -cetoácidos. Ademais, almejou-se contribuir para a análise de estresse oxidativo, buscando melhor compreender as alterações causadas nesse, uma vez que há uma escassez de explicações satisfatórias para as alterações dos danos neurológicos que acometem tais pacientes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um modelo quimicamente induzido da Doença da Urina do Xarope do Bordo em peixe-zebra.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada necessária para a indução de um modelo semelhante à Doença da Urina do Xarope do Bordo em peixe-zebra;

- Avaliar os efeitos da administração de aminoácidos de cadeia ramificada sobre parâmetros antioxidantes, por meio dos níveis de sulfidril em um modelo semelhante à Doença da Urina do Xarope do Bordo em peixe-zebra;

- Avaliar os efeitos da administração de aminoácidos de cadeia ramificada sobre espécies reativas não específicas pela oxidação da diclorofluoresceína DCFH em um modelo semelhante à Doença da Urina do Xarope do Bordo em peixe-zebra;

- Avaliar os efeitos da administração de aminoácidos de cadeia ramificada sobre os marcadores de dano oxidativo, como os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em um modelo semelhante à Doença da Urina do Xarope do Bordo em peixe-zebra;

- Avaliar os efeitos da administração de aminoácidos de cadeia ramificada sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em um modelo semelhante à Doença da Urina do Xarope do Bordo em peixe-zebra.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 ANIMAIS

Os animais utilizados no experimento foram os peixes-zebra (*Danio rerio*) short-fin, provenientes do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O transporte ocorreu de forma terrestre e os animais foram acondicionados em bolsa plástica vedada e inflada com oxigênio. Após o transporte, os animais foram mantidos no Laboratório de Pesquisa da UNESC em local adequado para aclimatação por duas semanas antes do início dos experimentos. Os animais estiveram em local adequado, tendo um ciclo claro/escuro de 14/10h, condições de salinidade, níveis de amônia e de condutividade adequados na água, alimentação duas vezes ao dia com paramécio a partir do 6º dia pós-fertilização (dpf) e temperatura de  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Os animais foram transferidos, após esse período, para aquários com filtração mecânica auto-limpante e limpeza automática de resíduos sólidos, sendo todos os parâmetros de qualidade da água devidamente controlados. Os aquários apresentaram densidade de um animal para cada 0,5 litro. Os procedimentos experimentais desse estudo estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (CONCEA, 2013), sendo o projeto deste trabalho de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob o protocolo número 030/2017-01 (ANEXO A).

#### 3.2 GRUPOS

Para o experimento foram utilizados sete grupos, sendo seis deles visando mimetizar modelos quimicamente semelhantes à pacientes com DXB e um grupo controle. Para isso foram utilizadas três doses diferentes do pool de aminoácidos de cadeia ramificada: 1,58  $\mu\text{L/g}$ , 15,80  $\mu\text{L/g}$  e 158,0 $\mu\text{L/g}$ , além do grupo controle. Sendo assim, as exposições de 1 hora eram compostas pelos grupos com doses de 1,58  $\mu\text{L/g}$ , 15,80  $\mu\text{L/g}$  e 158,0  $\mu\text{L/g}$  do pool de aminoácidos de cadeia ramificada, sendo a mesma divisão de grupos para as exposições de 24 horas. O mesmo grupo controle foi utilizado para os dois tempos, visto que não foram expostos a nenhuma substância. Cada grupo de exposição ao pool de aminoácidos de cadeia ramificada foi composto por 36 animais, já contabilizando a mortalidade, enquanto que o grupo

controle teve um n total de 30 animais. No total foram utilizados 246 peixes-zebra.

### 3.3 MODELO DA DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO

O desenho experimental consistiu na administração de um tratamento de uma hora e 24 horas de exposições ao pool de aminoácidos de cadeia ramificada em três concentrações diferentes, para cada tempo de indução: 1,58  $\mu\text{L/g}$ , 15,80  $\mu\text{L/g}$  158,0 $\mu\text{L/g}$  da solução contendo respectivamente 19,0 mM/L de Leucina, 5,9 mM/L de isoleucina e 6,9 mM/L de Valina; 190 mM/L de Leucina, 59 mM/L de isoleucina e 69 mM/L de Valina; 1900,0 mM/L de Leucina, 590 mM/L de isoleucina e 690 mM/L de Valina. O grupo controle não foi exposto ao pool de aminoácidos de cadeia ramificada. As presentes concentrações se assemelham as doses de modelos pré-estabelecidos em roedores de acordo com Bridi e colaboradores (2006).

Os animais tiveram seu conteúdo cerebral dissecado, após a eutanásia por triclaína dissolvida na água do aquário (160mg/L), para as análises neuroquímicas. As amostras foram armazenadas em eppendorfs, guardados em caixas específicas para armazenamento de material biológico, em um freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Dessa forma, procedeu-se a determinação das concentrações dos AACR por CLAE, buscando-se saber se as concentrações encontradas nesse tecido condiziam com aquelas encontradas em pacientes humanos afetados pela doença e outros modelos, além da realização das técnicas de estresse oxidativo (Figura 2).

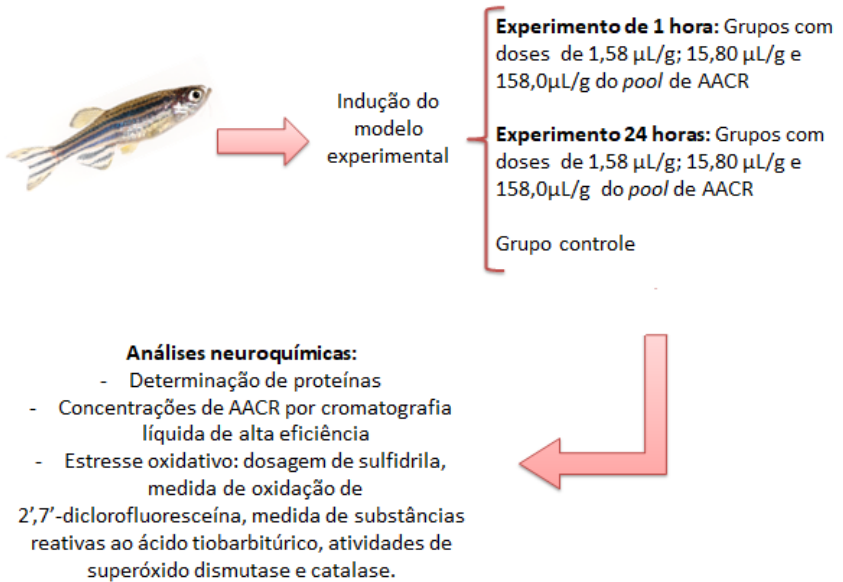


Figura 2: Desenho esquemático representativo do protocolo experimental. Fonte: Do autor.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

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

### 3.5 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

#### 3.5.1 Preparo da amostra

Para as determinações das concentrações dos AACR leucina, isoleucina e valina, foram utilizados um pool de tecido cerebral de dois peixe-zebras. Após a indução do experimento, eutanásia por tricafina dissolvida na água do aquário (160mg/L), e dissecação das amostras, as mesmas foram armazenadas em tubos do tipo eppendorfs. Assim, as amostras armazenadas em tubo de ensaio tipo eppendorf foram pesadas e homogeneizadas manualmente em solução de água ultrapura contendo metanol (8:2, v/v), sendo agitadas posteriormente em vórtex por 1

minuto. Após, realizou-se a centrifugação das amostras a 7800 g por 15 min, a 4°C, sendo o sobrenadante coletado e armazenado a -20 °C até a derivatização (Silva et al., 2009; Rodrigues, 2012).

### **3.5.2 Preparo da solução padrão**

Para o preparo da solução padrão, diluíram-se os aminoácidos em água ultrapura contendo metanol (8:2, v/v) na concentração de 10 mM, utilizando para isso, metanol grau CLAE. Posteriormente, o pH foi ajustado para 9 por meio da solução de NaOH 2,5 M preparada em água Milli-Q. Estas soluções foram estocadas e armazenadas a - 20 °C. As soluções de trabalho apresentavam concentração final de 1 mM, sendo preparadas a partir da solução estoque (Rodrigues, 2012).

### **3.5.3 Preparo da solução de derivatização**

Para a solução derivatizante (Prestes et al., 2007), utilizaram-se 4,4 g de hidróxido de potássio p.a.; 5,0 g de ácido bórico p.a.; 0,04 g de ortoftaldeído (P0657 Sigma-Aldrich), sendo os reagentes dissolvidos em 300 µL de metanol, 300 µL de β-mercaptoetanol em quantidade suficiente para volume de 100 mL de água Milli-Q, obtendo-se solução com pH 11. Para 200 µL de amostra ou solução padrão, foram adicionados 100 µL de solução derivatizante. Foram cronometrados 2 minutos de reação, e adicionaram-se 50 µL de ácido acético glacial 5% (Perucho et al., 2015).

### **3.5.4 Condições cromatográficas**

A coluna utilizada trata-se da Ascentis® C18 (25 cm x 2.1 mm 5 µm; Supelco®, USA) com temperatura na unidade CTO-20A de 40°C. A composição da fase móvel utilizada foi com acetato de sódio 50 mM, pH 7,2, contendo 1% (v/v) de acetona; e acetato de sódio 100 mM: acetonitrila: metanol: acetona (46:43:10:1, v/v), pH 7,2. O sistema de eluição foi gradiente, sendo o fluxo de bombeamento da fase móvel de 0,250 mL/min. A determinação foi realizada pela unidade SPD-20A, detector de UV-VIS, em 335 nm (Rodrigues, 2012).

## 3.6 ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO

### 3.6.1 Preparo das Amostras

Após a indução do experimento, eutanásia por tricafina dissolvida na água do aquário (160mg/L), e dissecação das amostras, as mesmas foram armazenadas em tubos do tipo eppendorfs para a avaliação do estresse oxidativo, sendo os conteúdos cerebrais mantidos a - 80 °C até o momento da realização das avaliações.

### 3.6.2 Dosagem do conteúdo de sulfidrilas

Determinou-se o conteúdo de sulfidrilas de acordo com Aksenov e Markesbery (2001), sendo o princípio do método baseado na redução do reagente de cor DTNB por tióis, gerando o ânion 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB<sup>2-</sup>). Dessa forma, as amostras foram homogeneizadas na proporção 1:10, em tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4. Posteriormente, centrifugou-se o homogenato a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. Em uma placa de Elisa, preparou-se o branco para cada amostra, bem como, um branco reagente. Sendo assim, pipetaram-se 12 µL de amostra e 238 µL de Tampão PBS com EDTA 1 M no branco amostra, 242,9 µL Tampão PBS com EDTA 1 M e 7,1 µL no branco reagente, e utilizaram-se 12 µL de amostra, 230,9 µL de Tampão PBS com EDTA 1 M e 7,1 µL de DTNB, para a determinação do conteúdo das sulfidrilas. Após pipetar o DTNB, deixou-se a placa em temperatura ambiente, protegida da luz, por 30 minutos. Seguiu-se a leitura em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados foram expressos em nmols de TNB/mg de proteína.

### 3.6.3 Medida da oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH)

A produção de espécies reativas foi determinada de acordo com método de LeBel et al. (1992). Dessa forma, amostras foram previamente homogeneizadas, adicionadas diacetato do DCF, sendo as alíquotas incubadas durante 30 minutos à 37 °C. No meio intracelular, esterases clivam o grupamento acetato do DCFH-DA, gerando a forma reduzida DCFH. Dessa forma, espécies reativas de oxigênio realizam a oxidação de dois elétrons de DCFH, produzindo o produto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Tampo et al., 2003; Lee et al., 2009). A fluorescência foi determinada utilizando comprimentos de onda de 488

nm (excitação) e 525 nm (emissão), sendo a curva de calibração realizada utilizando-se DCF padrão (0-10  $\mu$ M). Os resultados foram expressos como  $\mu$ mol de DCF.mg de proteína.

#### **3.6.4 Medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)**

Para analisar os níveis de TBA-RS, as amostras foram homogeneizadas na proporção 1:10, em tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4. Seguiu-se com a centrifugação do homogenato a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. Pipetaram-se 100  $\mu$ L de amostra, acrescentando-se 200  $\mu$ L de TCA 10% e 300 de TBA 0,67% em cada tubo do tipo eppendorf. Posteriormente, cobriram-se os mesmos com papel alumínio e levou-se ao banho-maria fervente por duas horas. Após esse período, deixou-se esfriar as amostras e então se adicionou 400  $\mu$ L de butanol. Em seguida, passou-se cada tubo do tipo eppendorf em vórtex por exatos 20 segundos, seguidos de centrifugação a 5000 rpm por 3 minutos. Pipetou-se a fase superior, de cor rosa, em cubetas para realizar a leitura em fluorímetro, com medidas excitação em 515 nm e emissão 553 nm. A curva de calibração foi feita com concentração de 0 à 6 nmol/m, utilizando-se solução B, tampão de homogeneização, TCA 10% e TBA 0,67%. Os resultados foram expressos como nmol de equivalentes de malondialdeído.mg de proteína (Esterbauer e Cheeseman, 1990, Yagi 1998).

#### **3.6.5 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)**

Iniciou-se a determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD), homogeneizando as amostras na proporção 1:10, em tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4. Em seguida, centrifugou-se o homogenato a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante armazenado. Em uma placa de Elisa, pipetaram-se 190  $\mu$ L de tampão glicina e 5  $\mu$ L de catalase no branco; 5  $\mu$ L de amostra, 185  $\mu$ L de tampão glicina e 5  $\mu$ L de catalase para a primeira amostra; 10  $\mu$ L de amostra, 180  $\mu$ L de tampão glicina e 5  $\mu$ L de catalase para a segunda amostra; 15  $\mu$ L de amostra, 175  $\mu$ L de tampão glicina e 5  $\mu$ L de catalase para a terceira amostra, sendo assim, uma leitura em triplicada de cada amostra. Realizou-se em seguida a leitura pontual em espectrofotômetro a 480 nm. Em seguida, pipetou-se 5  $\mu$ L de adrenalina em todos os poços. Posteriormente, realizou-se uma nova leitura em espectrofotômetro a 412 nm durante 20 minutos, com leitura de 40 em



40 segundos. A atividade da enzima expressa foi expressa em U/mg de proteína (unidade de atividade da SOD por mg de proteína) (Bannister e Calabrese, 1987).

### **3.6.6 Atividade da Catalase (CAT)**

A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com Aebi (1984). Os conteúdos cerebrais foram homogeneizados na proporção 1:10, em no tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4. Em seguida, realizou-se a centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante coletado. Zerou-se o equipamento com 620 µL de branco. Em seguida, pipetaram-se 50 µL de amostra e 5 µL de triton 10% em tubos do tipo eppendorf. Agitaram-se os tubos em vórtex, deixando-os em gelo por 15 minutos para liberação da catalase. Posteriormente, pipetaram-se 20 µL de amostra em cubetas de quartzo e 600 µL do meio, sendo a leitura feita por espectrofotômetro a 240 nm durante 3 minutos de 30 em 30 segundos. A atividade da CAT foi expressa em U/mg de proteína (unidade de atividade da CAT por mg de proteína).

## **3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Após coletados os dados, os mesmos foram organizados no programa IBM Statistical Package for the Social Science for Windows (SPSS), versão 22.0. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão, considerando os valores de  $p \leq 0,05$  como significativos. Para a avaliação da distribuição das variáveis quanto à normalidade, aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk, sendo a homogeneidade das variâncias verificada através da aplicação do teste de Levene. Os parâmetros de atividade enzimática e concentração de aminoácidos foram analisados por meio da análise de variância de uma via ANOVA, considerando  $p \leq 0,05$ , seguido de teste de Tukey como post hoc. Para a construção dos gráficos deste estudo, utilizou-se o software GraphPad Prism, versão 7.03.

## **3.8 LOCAL DE REALIZAÇÃO**

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Bioenergética e Laboratório de Sinalização Neural e Psicofarmacologia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, onde foram realizados os procedimentos que envolvem a indução do modelo animal e análises de estresse

oxidativo. As determinações das concentrações dos aminoácidos de cadeia ramificada foram realizadas com o apoio do Laboratório Multiusuários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (MULTILAB).

### 3.9 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

A média e o desvio padrão utilizados no cálculo do número amostral usados neste projeto, baseiam-se em estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa de apoio, levando em conta o tipo de material trabalhado em questão e sua maior variabilidade entre os indivíduos. Dessa forma, necessita-se de um número adequado de tamanho amostral e desvio padrão, dependendo da variável estudada, para assim podermos confiar nos resultados e na significância das diferenças estatísticas. Percebe-se que estudos que realizam técnicas neuroquímicas em peixe-zebra utilizam n entre 4 e 6 animais (Rico et al., 2010) sendo utilizado um pool cerebral de 2 à 5 animais para verificação das análises bioquímicas. Conforme estimativa realizada através do auxílio do software Minitab15 e considerando os grupos submetidos à exposição de altos níveis de aminoácidos de cadeia ramificada, mais um grupo controle e uma estimativa de mortalidade 20% para as técnicas experimentais distintas que requerem a eutanásia do animal, foram necessários 246 animais (Tabela 2).

Tabela 2: Número de animais por procedimentos experimentais.

Procedimentos experimentais								
Procedim ento experime ntal	Gru po DX B 1	Gru po DX B 2	Gru po DX B 3	Gru po DX B 4	Gru po DX B 5	Gru po DX B 6	Grup o contr ole	Tot al
CLAE	12	12	12	12	12	12	12	84
Estresse oxidativo	18	18	18	18	18	18	18	126
Mortalida de	6	6	6	6	6	6	-	36
Total								246

Fonte: Do autor.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISES DAS CONCENTRAÇÕES DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA

Inicialmente, apontaram-se as concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada em todas as doses e tempos de indução, em tecido cerebral de peixe-zebra, através da cromatografia líquida de alta eficiência (figura 3). Verifica-se que a dose com de 158,0 $\mu$ L/g, nas exposições de 24 horas, foi capaz de aumentar as concentrações dos aminoácidos de cadeia ramificada em tecido cerebral de peixe-zebra de forma significativa, quando comparados aos grupos controles.

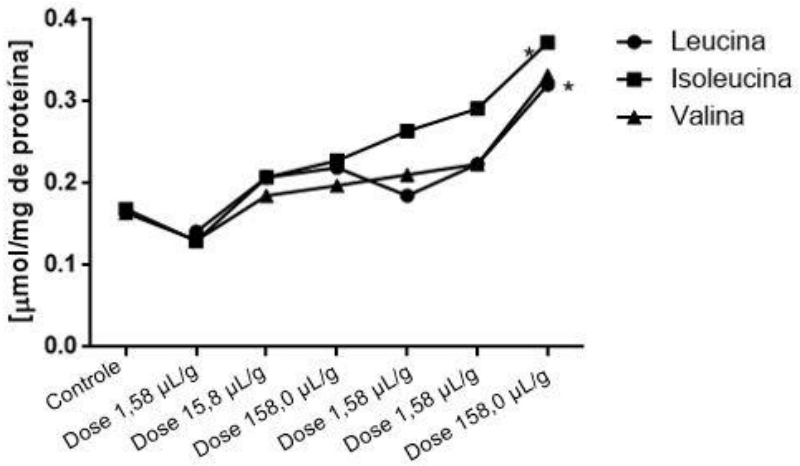


Figura 3: Determinação das concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada, em tecido cerebral de peixe-zebra, separada por tipo de aminoácidos, nas diferentes doses empregadas. Os dados são expressos para uma média de 6 pool de tecido cerebral. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey).

A figura 4 relata os níveis dos aminoácidos de cadeia ramificada, em tecido cerebral de peixe-zebra, de acordo com os grupos (doses) utilizados no experimento. Nota-se que as exposições de 24 horas, na dose de 158,0 $\mu$ L/g, aumentaram os níveis dos aminoácidos analisados de forma significativa, quando comparado ao grupo controle.

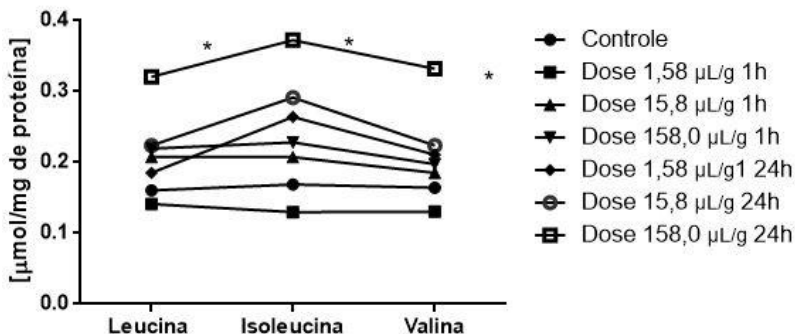


Figura 4: Determinação das concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada, em tecido cerebral de peixe-zebra, separados por grupos (doses). Os dados são expressos para uma média de 6 pool de tecido cerebral. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey).

## 4.2 ANÁLISES DAS TÉCNICAS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Averigaram-se os efeitos das exposições de 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre parâmetros de estresse oxidativo, por meio do conteúdo de sulfidrilas, oxidação de DCFH, TBA-RS, SOD e CAT.

### 4.2.1 Efeitos das exposições aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre o conteúdo de sulfidrilas em tecido cerebral de peixe-zebra.

Avaiaram-se os efeitos das exposições de 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre o conteúdo de sulfidrilas, em tecido cerebral de peixe-zebra. Observa-se na figura 5, que a exposição aos aminoácidos de cadeia ramificada não produziu alterações significativas nos conteúdos de sulfidrilas, quando comparado ao grupo controle, tanto nas exposições de 1 hora, quanto nas exposições de 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada.

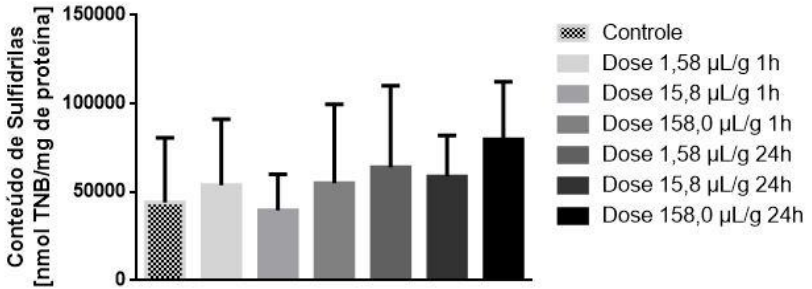


Figura 5: Efeito das exposições de 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre o conteúdo de sulfidrilas em tecido cerebral de peixe-zebra. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média para 6 pool de tecido cerebral. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey).

#### 4.2.2 Efeitos das exposições aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre a oxidação de DCFH em tecido cerebral de peixe-zebra.

Ao analisar os efeitos das exposições de 1 hora aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis de oxidação de DCFH (figura 6), nota-se que não houve alterações significativas, quando se compara as diferentes doses ao grupo controle. Entretanto, observa-se alteração significativa dos efeitos das exposições de 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis de oxidação de DCFH na dose de 158,0  $\mu\text{L/g}$ , quando comparada ao grupo controle.

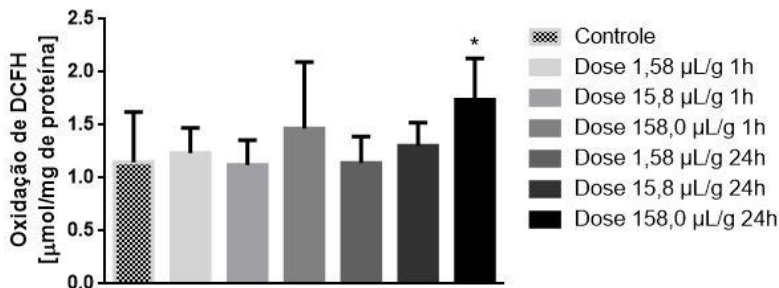


Figura 6: Efeitos das exposições 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre a oxidação de DCFH em tecido cerebral de peixe-zebra. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média para 6 pool de tecido cerebral. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey).

#### 4.2.3 Efeitos das exposições aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em tecido cerebral de peixe-zebra.

Avaliando os efeitos das exposições de 1 hora aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis de ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), em tecido cerebral de peixe-zebra, observa-se que aminoácidos de cadeia ramificada não produziram alterações significativas nos níveis de TBA-RS, quando comparado ao grupo controle (figura 7). Contudo, ocorrem alterações significativas dos níveis de ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), quando se averiguam os efeitos das exposições de 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada em tecido cerebral de peixe-zebra. Verifica-se na figura 7, que a exposição aos aminoácidos de cadeia ramificada, induz um aumento significativo nos níveis de TBA-RS em tecido cerebral de peixe-zebra, na dose de 158,0  $\mu\text{L/g}$ , quando comparado ao grupo controle.

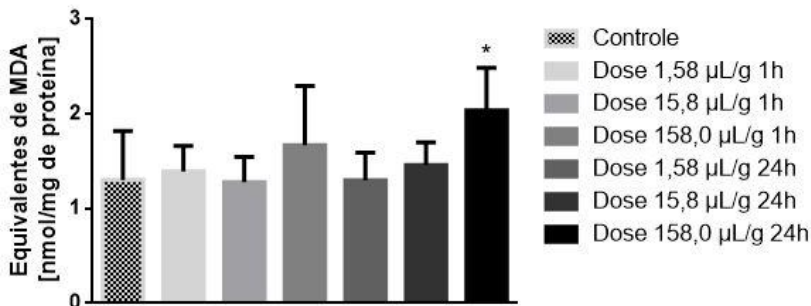
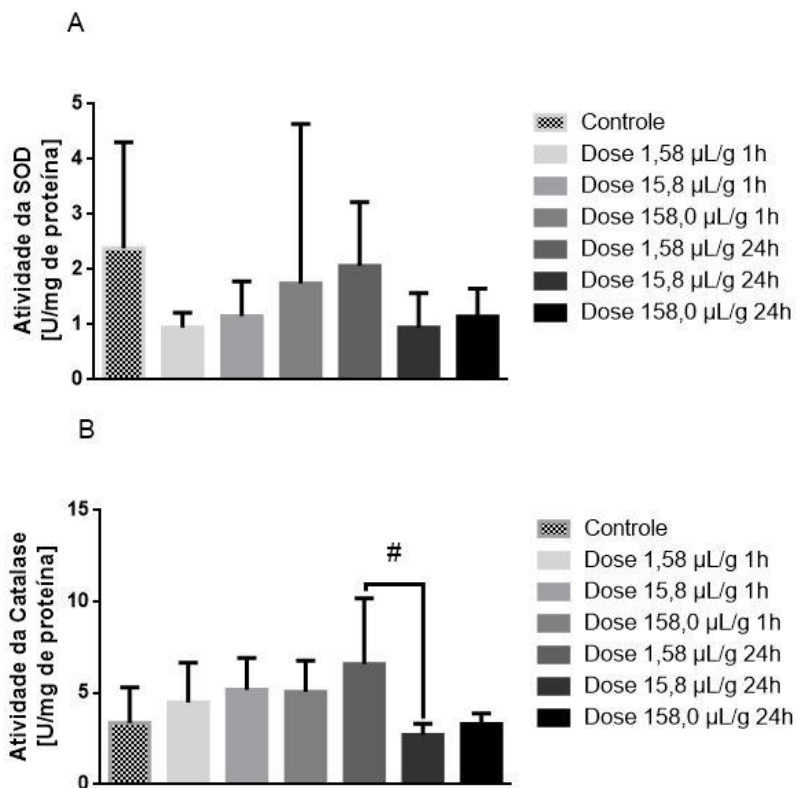


Figura 7: Efeitos das exposições de 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em tecido cerebral de peixe-zebra. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média para 6 pool de tecido cerebral. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey).

#### 4.2.4 Efeitos das exposições aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em tecido cerebral de peixe-zebra.

Observaram-se os efeitos das exposições de 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre a atividade enzimática da SOD e da CAT em tecido cerebral de peixe-zebra (figura 8). Nenhuma alteração significativa ocorreu sobre as atividades enzimáticas de SOD (figura 8A), bem como sobre os níveis de CAT (figura 8B) nas exposições de uma hora aos aminoácidos de cadeia ramificada, quando comparado ao grupo controle. Ao verificar os efeitos das exposições de 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre a atividade enzimática da SOD (Figura 8A) e da CAT (Figura 8B) em tecido cerebral de peixe-zebra, percebe-se que a única alteração significativa ocorreu entre as doses de 1,58  $\mu\text{L/g}$  e 15,8  $\mu\text{L/g}$  na atividade da CAT, nas exposições de 24 horas (figura 8B), não apresentando alteração significativa quando comparado ao controle. Percebe-se na figura 8C, que a relação entre a atividade de SOD e atividade de CAT, apresenta alteração significativa na dose de 158,0  $\mu\text{L/g}$ , quando exposto aos aminoácidos de cadeia ramificada por 1 hora, quando comparado ao grupo controle.





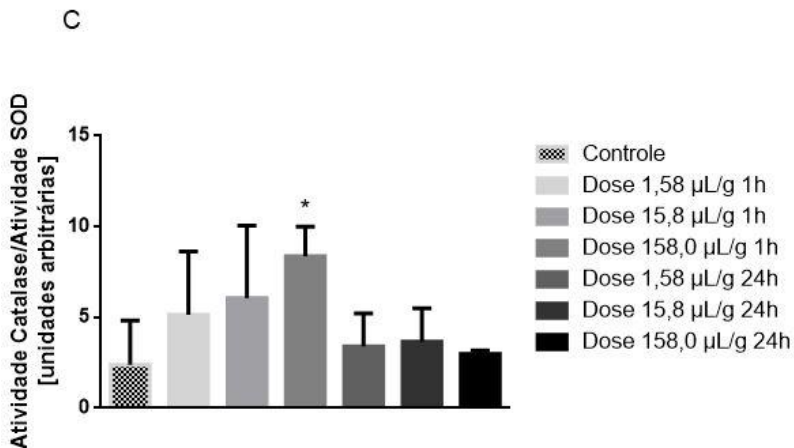


Figura 8: Efeitos das exposições de 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (A), da catalase (CAT) (B), e razão entre as atividades de CAT/SOD, em tecido cerebral de peixe-zebra. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média para 6 pool de tecido cerebral. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido de post hoc de Tukey).

## 5 DISCUSSÃO

A Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) é decorrente da deficiência da atividade do complexo  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR), sendo caracterizada pelo acúmulo tecidual dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina, além dos seus respectivos  $\alpha$ -cetoácidos e hidroxíácidos correspondentes (Meister, 1965; Chuang e Shih, 2001, Harris et al., 2004). Percebe-se em pacientes acometidos com DXB, sem o tratamento da restrição dietética, que os níveis plasmáticos de leucina atigem até 5 mM, enquanto a isoleucina e a valina atingem 1 mM (Chuang e Shih, 2001). Elevações dos aminoácidos de cadeia ramificada são relatadas tanto plasma como no fluido cerebrospinal, de pacientes com a doença (Vatanavicharn et al., 2012).

Estudos anteriores demonstram elevações dos aminoácidos de cadeia ramificada nos modelos animais empregados. Mormente, relataram-se casos de DXB em bezerros da raça Poll Hereford. Nesse caso, as maiorias dos bezerros nascem afetados ou com disfunção neurológica, sugerindo alterações metabólicas pré-natais (Harper et al., 1986; Dodd et al., 1992). Observaram-se também um modelo de camundongo com uma deficiência enzimática semelhante à DXB humana, porém com elevações de arginina, glicina e níveis de valina superiores à leucina e isoleucina (Morton et al., 2002). Em um modelo agudo quimicamente induzido de DXB em ratos de 10 dias de idade, os mesmos apresentam perfil de aminoácidos semelhante aos níveis plasmáticos dos pacientes não tratados (Morton et al., 2002).

Bridi et al. (2006) descreveram um modelo animal para DXB, observando um aumento significativo das concentrações plasmáticas de leucina, isoleucina e valina em ratos de 10 e 30 dias de idade. Ademais, verificaram-se uma redução significativa, concomitante, nas concentrações plasmáticas de metionina, fenilalanina, tirosina, histidina, alanina, lisina e ornitina em ratos de 10 dias de idade e de metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano e ornitina em ratos com 30 dias de idade. Observaram-se ainda, concentrações significativamente aumentadas de leucina, isoleucina e valina alcançados em ratos de 10 dias em todos os momentos, embora não significativamente, aos 30 minutos, enquanto que não foram observadas diferenças nas concentrações cerebrais de AACR em ratos de 30 dias, refletindo uma maior eficácia da barreira hematoencefálica nesta idade.

Mescka et al. (2016) relatam, em um modelo crônico induzido quimicamente de DXB com ratos Wistar, adaptado de Bridi et al.

(2006), aumento significativo das concentrações de leucina, isoleucina e valina no plasma e do cérebro de ratos. Assim, os níveis médios de AACR foram 592 e 135  $\mu\text{mol} / \text{L}$  para leucina, 235 e 78  $\mu\text{mol} / \text{L}$  para isoleucina e 378 e 96  $\mu\text{mol} / \text{L}$  para valina, no plasma e cérebro, respectivamente. Todavia, observou-se níveis plasmáticos de 111  $\mu\text{mol} / \text{L}$  de leucina, 65  $\mu\text{mol} / \text{L}$  de isoleucina e 109  $\mu\text{mol} / \text{L}$  de valina em plasma, enquanto que 62  $\mu\text{mol} / \text{L}$  de leucina, 45  $\mu\text{mol} / \text{L}$  de isoleucina e 57  $\mu\text{mol}$  de valina, observados nos cérebros de ratos do grupo controle.

Observamos na terceira dose, de 158,0  $\mu\text{L/g}$ , na exposição de 24 horas, que os níveis leucina, isoleucina e valina aumentaram significativamente em tecido cerebral de peixe zebra. Na presente investigação, os peixes-zebra apresentam atividade CDCCR normal, com níveis de outros aminoácidos, bem como,  $\alpha$ -cetoácidos, dentro da normalidade. Dessa forma, tais resultados evidenciados, são possíveis pela exposição dos mesmos nas águas dos aquários. Ressalta-se que Friedrich et al. (2012), demonstraram que morfolinolinos para DXB, apresentaram também níveis aumentados dos AACR.

Estudos vêm indicando a relação do acúmulo de aminoácidos de cadeia ramificada com alterações de parâmetros de estresse oxidativo na DXB, observando aumento na produção de espécies reativas e uma diminuição das defesas antioxidantes. Rieger et al. (2017) descreveram que a administração de leucina, em ratos Wistar, acarretou no aumento significativo do teor de sulfidrilas no córtex cerebral e no hipocampo, sendo que a coadministração de creatina e piruvato, impediram tais danos. Analisou ainda os coeficientes de correlação de Spearman entre a oxidação de DCFH e o teor total de sulfidrilas, sugerindo que a alteração do teor de sulfidrilas pode ocorrer devido à oxidação dos grupos tiol por espécies reativas. Dessa forma, sugere-se que espécies reativas reagem com ligações dissulfureto (SS) em proteínas, sendo teor de proteína sulfidrilas um índice de oxidação de proteínas (Stadtman e Levine 2003).

Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis de tiol nativo (-SH), tiol total (-SH + S-S-) e dissulfureto (-S-S), em um estudo de Zubarioglu et al. (2017). Além disso, nenhum aumento significativo das proporções de tiol e dissulfureto / tiol total de dissulfureto / nativo foi detectado no grupo de pacientes, assim como não ocorreu aumento de dissulfureto / tiol nativo e dissulfureto / tiol total (Zubarioglu et al., 2017). Percebemos resultados semelhantes em nosso estudo, onde as exposições de 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada

não foram capazes de acarretarem em alterações significativas dos conteúdos de sulfidrilas.

Também não foi percebido alterações significativas ao verificar os efeitos das exposições de 1 hora aos aminoácidos de cadeia ramificada sobre os níveis de oxidação de DCFH. Todavia, a dose de 158,0  $\mu\text{L/g}$ , durante as exposições de 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada, foi capaz de aumentar significativamente a oxidação de DCFH em tecido cerebral de peixe-zebra. Tal técnica é utilizada na investigação do papel das espécies reativas de oxigênio em mecanismos de neurotoxicidade, onde variedades de neurotóxicos aumentam a oxigenação de DCFH. Dessa forma, esses agentes envolvem a indução de peroxidase, em resposta a um estresse oxidativo, induzindo diretamente a oxidação de DCFH (Lebel et al., 1992). Relatou-se que a administração de leucina aumentou a formação de espécies reativas no em tecido cerebral, em torno de 11%, quando comparado ao grupo controle, sendo que a coadministração de creatina mais piruvato, impediram a formação de espécies reativas em um estudo de Rieger et al. (2017). Percebe-se ainda, em Mescka et al. (2016), que a produção de DCF no córtex cerebral foi aumentada pela administração de AACR, sendo a L-carnitina capaz de reduzir as espécies reativas produzidas pelo modelo de DXB utilizado.

Níveis de ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), quando averiguado os efeitos das exposições de 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada em tecido cerebral de peixe-zebra, na dose de 158,0  $\mu\text{L/g}$ , mostraram-se significativamente aumentados, quando comparados ao grupo controle, indicando um aumento da peroxidação lipídica. Ressalta-se que o TBA-RS reflete o conteúdo de malondialdeído, o aldeído individual mais abundante resultante da degradação de lipídios, decorrente da peroxidação lipídica (Esterbauer e Cheeseman, 1990). Assim, a superprodução de radicais livres de oxigênio e nitrogênio leva a maiores níveis de TBA-RS (González-Flecha et al., 1991; Halliwell e Gutteridge, 2001).

Alterações dos níveis de TBA-RS em DXB já foram relatadas em outros estudos. Níveis aumentados de TBARS são encontrados em plasma de pacientes com DXB (Barschak et al., 2009). Relatam-se que os aminoácidos, cetoácidos e hidroxíácidos acumulados na DXB, estimulam um grau variável dos parâmetros *in vitro* de peroxidação lipídica, quando testados em homogeneizados de cérebro de ratos (Fontella et al., 2002). Observam-se aumento dos níveis plasmáticos TBA-RS, assim como uma diminuição da reatividade antioxidante total (TAR), refletindo uma capacidade deficiente para modular o dano

associado ocasionado (Barschak et al.,2006; Barschak et al., 2008a; Barschak et al., 2008b).

Demonstrou-se que a administração de leucina aumentou significativamente o TBA-RS em córtex cerebral (Bridi et al., 2003), sendo que a coadministração de creatina mais piruvato, impediram a formação de espécies reativas (Rieger et al.,2017). Mostrou-se ainda, que a administração de CIC acarretou em um aumento da oxidação lipídica em homogeneizados cerebrais (Bridi et al., 2005a; Taschetto et al.,2017). Assim, percebe-se ainda, que a administração aminoácidos de cadeia ramificada acarretou em um aumentou significativo dos níveis de TBARS, em tecido cerebral, em relação ao grupo controle, sendo tais efeitos evitados pelo tratamento com L-carnitina. O benefício da L-cartinina foi também observado em plasma de pacientes com DXB, tratados com uma dieta restrita a proteínas e fórmula de aminoácido sem AACR (Mescka et al.,2011; Mescka et al., 2013; Mescka et al., 2016).

Por fim, verificaram-se as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), em tecido cerebral de peixe-zebra, nas exposições de 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada. Percebe-se que não ocorreram alterações significativas sobre as atividades enzimáticas de SOD, bem como sobre os níveis de CAT, nas exposições de uma hora aos aminoácidos de cadeira ramificada, quando comparado ao grupo controle. Alterações significativas foram observadas entres as doses de 1,58  $\mu\text{L/g}$  e 15,80  $\mu\text{L/g}$  nas exposições de 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificcada, sugerindo uma respota adaptativa em relação à dose e tempo, porém não ocorrendo alterações significativas em relação ao grupo controle. Entretanto, percebe-se que a relação entre a atividade de SOD e atividade de CAT, apresenta alteração significativa na dose de 158,0  $\mu\text{L/g}$ , quando exposto aos aminoácidos de cadeia ramificada por 1 hora, quando comparado ao grupo controle.

Estudos prévios indicam que a administração de AACR foi capaz de aumentar a atividade da CAT e diminuir a atividade de SOD, sendo que a coadministração de L-carnitina, capaz de reverter tais danos, em um modelo crônico com ratos Wistar (Mescka et al.,2016). Contudo, Mescka et al. (2011), em um modelo agudo da DXB, com ratos Wistar, relataram que a administração aguda do pool de aminoácidos de cadeia ramificada não alterou a atividade de SOD, sendo a atividade de CAT reduzidas no córtex cerebral, onde também, a L-carnitina impediu esse efeito inibitório. A não modificação dos níveis da atividade da SOD foram também descritas em estudos anteriores in vitro e eritrócitos de indivíduos afetados pela DXB (Bridi et al., 2005a; Bridi et al., 2005b;

Barschak et al., 2007). Já Rieger et al. (2017), em um modelo crônico, descrevem que a atividade de SOD foi significativamente diminuída no córtex cerebral pela administração de leucina, sendo a coadministração de creatina e piruvato, reverteram as alterações.

Já Funchal et al. (2006), demonstram que a administração de CIC e CMV provocou uma atividade reduzida de SOD, sendo a atividade do CAT não modificada pelos metabolitos. Ademais, Taschetto et al. (2017), relatam que a administração de CIC aumentou significativamente a atividade de SOD, enquanto que a atividade do CAT foi diminuída quando analisados tecido cerebral de ratos.

Sugere-se que o aumento na atividade SOD é gerado pela produção de ânions superóxido, favorecendo sua atividade, visto que o mesmo é o principal ativador alotérico. Assim, a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentada ocasionaria uma diminuição da atividade de catalase, já que quando exposta ao seu próprio substrato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, leva a mudanças na conformação enzimática (Halliwell e Gutteridge 2006; Kirkman e Gaetani, 2007). Ressalta-se que o excesso de superóxido dismutase pode levar à indução de lesões celulares, caso as células não forem capazes de metabolizar adequadamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por catalase e peroxidase de GSH. Assim, o radical hidroxila altamente reativo possa ser formado a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela reação de Haber-Weiss/ Fenton, reagindo com grupos funcionais de tiol (Change et al., 1979; Halliwell 2011; Halliwell 2013). Portanto, pode-se presumir que os níveis aumentados de superóxido, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e outras espécies reativas causadas pela SOD mediada por AACR e pela inibição de GPx, poderiam levar à peroxidação lipídica e à redução de GSH encontrada em estudos anteriores (Lipinski, 2012; Mescka et al., 2016).

Em vista que espécies reativas de oxigênio são capazes de oxidar diferentes moléculas, como por exemplo, lípidios, proteínas, açúcares e DNA, acarretando na morte celular (Halliwell, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2007), indicamos que o excesso de aminoácidos de cadeia ramificada em tecido cerebral de peixe-zebra, é capaz de induzir o estresse oxidativo, por meio do aumento da peroxidação lipídica.

Em suma, este é o primeiro estudo que analisa os efeitos das exposições de 1 hora e 24 horas aos aminoácidos de cadeia ramificada, relatando que em uma dose de 158,0 µL/g, em 24 horas, encontram-se elevações de leucina, isoleucina e valina, em tecido cerebral de peixe-zebra. Mostramos ainda, que a mesma dose, no mesmo tempo, ocorre um aumento de espécies reativas, como observado pelo aumento da oxidação de DFCH e oxidação de lípidios, como se verifica nos níveis aumentados de MDA. Dessa forma, sugere-se que o modelo animal para

a Doença da Urina do Xarope do Bordo, utilizando peixe-zebra, pode vim a ser utilizado na pesquisa, permitindo melhor conhecer o perfil de toxicidade da exposição a aminoácidos de cadeia ramificada. Ademais, o estudo contribui para um melhor entendimento da utilização do peixe-zebra em futuras investigações e estratégias relacionadas a estudos fisiopatológicos envolvidos em condições em que se tem uma grande concentração de aminoácidos de cadeia ramificada nos tecidos.

## 6 CONCLUSÃO

Perante aos objetivos iniciais propostos por esta dissertação, conclui-se que a exposição aos aminoácidos de cadeia ramificada, em uma dose de 158,0  $\mu\text{L/g}$ , por 24 horas, é capaz de ocasionar um acúmulo significativo de leucina, isoleucina e valina, quando comparados ao grupo controle. Ademais, verificou-se a ocorrência de estresse oxidativo por meio do aumento de espécies reativas e da peroxidação lipídica, em tecido cerebral de peixe-zebra, quando os mesmos eram expostos por 24 horas a uma dose de 158,0  $\mu\text{L/g}$  do pool de aminoácidos. Destarte, tais achados contribuem na melhor compreensão dos mecanismos relacionados à toxicidade dos aminoácidos de cadeia ramificada, contribuindo para a caracterização de um novo modelo animal para a Doença da Urina do Xarope do Bordo, com peixe-zebra.



## REFERÊNCIAS

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-126.

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001; 302(2-3): 141-145.

Artuch R, Colome C, Sierra C, Brandi N, Lambruschini N, Campistol J, Ugarte D, Vilaseca MA. A longitudinal study of antioxidante status in phenylketonuric patients. *Clin Biochem.* 2004; 37 (3): 198-203.

Atwal PS, Macmurdo C, Grimm PC. Haemodialysis is an effective treatment in acute metabolic decompensation of maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab Rep.* 2015; 4: 46-48.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for SOD. *Methods Biochem Anal.* 1987; 32:279-312.

Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD, Johnson SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 2000; 10 (9): 1351-1358.

Barschak AG, Marchesan C, Sitta A, Deon M, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Maple syrup urine disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles. *Clin Biochem.* 2008b; 41(4-5): 317-324.

Barschak AG, Sitta A, Deon M, Barden AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab Brain Dis.* 2008a; 23(1): 71-80.

Barschak AG, Sitta A, Deon M, Busanello EN, Coelho DM, Cipriani F, Dutra-Filho CS, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Amino acids levels and lipid peroxidation in maple syrup urine disease patients. *Clin Biochem.* 2009; 42(6):462-466.

Barschak AG, Sitta A, Deon M, de Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis.* 2006; 21 (4): 279-286.

Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch JL, Biemann D, Chatonnet A, Strähle U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat Neurosci.* 2002; 5(2): 111-118.

Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2009; 92 (4): 529-534.

Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev Dyn.* 2004; 230:481–493.

Bonnefoy M, Dray J, Kostka T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med.* 2002;31(25):1174-1184.

Bouchereau J, Leduc-Leballeur J, Pichard S, Imbard A, Benoist JF, Abi Warde MT, Arnoux JB, Barbier V, Brassier A, Broué P, Cano A, Chabrol B, Damon G, Gay C, Guillain I, Habarou F, Lamireau D, Ottolenghi C, Paermentier L, Sabourdy F, Touati G, Ogier de Baulny H, de Lonlay P, Schiff M. Neurocognitive profiles in MSUD school-age patients. *J Inherit Metab Dis.* 2017; 40(3):377-383.

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 Devl Neuroscience.* 2003; 21 (6): 327-332.

Bridi R, Braun CA, Zorzi GK, Wannmacher CMD, 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.* 2005a; 20 (2): 155-167.

Bridi R, Fontella FU, Pulrolnik V, Braun C, 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 Meth.* 2006; 155:224–230.

Bridi R, Latini A, Braum CA, Zorzi GK, Wajner M, Lissi E, Dutra-Filho CS. Evaluation of the mechanism involved in leucine-induced

- oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic Res.* 2005b; 39 (1): 71-79.
- Broughton RE, Milam JE, Roe BA. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Res.* 2001; 11 (11): 1958-1967.
- Burrage LC, Nagamani SCS, PM Campeau, Lee BH. Metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada: de raras doenças mendelianas a distúrbios mais comuns. *Genética Molecular Humana.* 2014; 23 (R1): R1-R8.
- Cardoena L, Schiffb M, Lambrona J, Regaa A, Virlouvetd AL, Biranc V, Eleni Dit Trollie S, Elmaleh-Bergèsa M, Alisona M. Leucinose à révélation néonatale. Neonatal presentation of maple syrup urine disease. *Archives de Pédiatrie.* 2016; 23(12): 1291–1294.
- Change B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxidemetabolism in mammalian organs. *Physiol Ver.* 1979; 59: 527–605.
- Chuang DT, Chuang JL, Wynn RM. Branched-chain amino acids: metabolism, physiological function and application. *J Nutr.* 2006; 136:243S-249S.
- Chuang DT, Shih VE. Maple syrup urine disease (branchedchain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1971–2005.
- Chuang DT, Wynn M, Shih VE. Maple syrup urine disease (branchedchain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudt AL, Sly WL, Valle D, editores. *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* New York: McGraw-Hill; 2008. p. 1971–2005.
- Chuang JL, Wynn RM, Moss CC, Song JL, Li J, Awad N, Mandel H, Chuang DT. Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients: a proposed mechanism for the thiamin-responsive phenotype. *J Biol Chem.* 2004; 279:17792–17800.
- Colomé, C., Sierra, C., Vilaseca, M.A. Congenital errors of metabolism:

cause of oxidative stress? *Med Clin*. 2000; 115 (3): 111-117.

Dai DF, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabinovitch PS. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Healthspan*. 2014;3:6.

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

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

Delanty M, Dichter NA. Oxidative injury in nervous system. *Acta Neurol Scand*. 1998; 98 (3): 145-153.

Dexter DT, Wells FR, Lees AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, Marsden CD. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1989;52(6):1830-1836.

Dodd PR, Williams SH, Gundlach AL, Harper PA, Healy PJ, Dennis JA, Johnston GA. Glutamate and gamma-aminobutyric acid neurotransmitter systems in the acute phase of maple syrup urine disease and citrullinemia encephalopathies in newborn calves. *J Neurochem* 1992;59:582-90.

Ebarasi L, Oddsson A, Hultenby K, Betsholtz C, Tryggvason K. Zebrafish: a model system for the study of vertebrate renal development, function, and pathophysiology. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011; 20 (4): 416-24.

Edwards JG, Michel WC. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 2002; 454 (3): 294-309.

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

Fisher CR, Fisher CW, Chuang DT, Cox RP. Occurrence of a

Tyr393Asn (Y393N) mutation in the E1 alpha gene of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex in maple syrup urine disease patients from a Mennonite population. *Am J Hum Genet.* 1991; 49:429-434.

Fontella FU, Gassen E, Pulrolnik V, Wannmacher CMD, Klein AB, Wajner M, Dutra CS. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis.* 2002; 17 (1): 47-54.

Funchal C, Latini A, Jacques-Silva MC, Dos Santos AQ, Buzin L, Gottfried C, Wajner M, Pessoa-Pureur R. Morphological alterations and induction of oxidative stress in glial cells caused by the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Int.* 2006; 49(7):640-50.

Frazier DM, Allgeier C, Homerc C, Marriage BJ, Ogata B, Rohre F, Splettf PL, Stenbridge A, Singh RH. Nutrition management guideline for maple syrup urine disease: An evidence- and consensus-based approach. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2014; 112 (3):210–217.

Friedrich T, Lambert AM, Masino MA, Downes GB. Mutation of zebrafish dihydrolipoamide branched-chain transacylase E2 results in motor dysfunction and models maple syrup urine disease. *Dis Model Mech.* 2012;5(2): 248–258.

Froehlicher M, Liedtke A, Groh KJ, Neuhauss SC, Segner H, Eggen RI. Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquat Toxicol.* 2009; 95 (4): 307-319.

Garrod AG. *Inborn Errors of Metabolism.* Oxford, Oxford University Press. 1909.

Gerlai R, Lee V, Blaser R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol Biochem Behav.* 2006; 85 (4): 752-761.

Gilbert DL. *Oxygen and living processes: an interdisciplinary approach.* 1<sup>a</sup> ed. New York, Springer., 1981. 401p.

Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol.* 2004; 4 (5): 504-512.

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

Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* 2004; 74: 363-396.

Grosell M, Wood CM. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J. Exp. Biol.* 2002; 205: 1179-1188.

Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.* 2004; 3: 63-74.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 5a ed. New York, Oxford University Press Inc., 2015. 896p.

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

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

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

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; 141:312-22.

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

Halliwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. *Drugs Aging.* 2001;18(9):685-716.

Harris RA, Joshi M, Jeoung NH. Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 313(2):391–396.

Harper PA, Healy PJ, Dennis JA. Maple syrup urine disease as a cause of spongiform encephalopathy in calves. *Vet Rec* 1986; 119:62–5.

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

Homanics GE, Skvorak K, Ferguson C, Watkins S, Paul HS. Production and characterization of murine models of classic and intermediate maple syrup urine disease. *BMC Med Genet*. 2006; 7:33.

Ibrahim M, Mussulini BH, Moro L, de Assis AM, Rosemberg DB, de Oliveira DL, Rocha JB, Schwab RS, Schneider PH, Souza DO, Rico EP. Anxiolytic effects of diphenyl diselenide on adult zebrafish in a novelty paradigm. *Progress in Neuro-Psycopharmacology & Biological Psychiatry*. 2014; 3 (54):187-194.

Imtiaz F, Al-Mostafa A, Allam R, Ramzan K, Al-Tassan N, Tahir AI, Al-Numair NS, Al-Hamed MH, Al-Hassnan Z, Al-Owain M, Al-Zaidan H, Al-Amoudi M, Qari A, Balobaid A, Al-Sayed M. Twenty novel mutations in BCKDHA, BCKDHB and DBT genes in a cohort of 52 Saudi Arabian patients with maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab Rep*. 2017; 7(11): 17-23.

Jimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D. The effect of Mendelian disease on human health. In: Scriver CR, Beaudet AR, Sly W, Valle D, editors. *New York: McGraw-Hill*; 2001. p. 167-174.

Kaslin J, Panula P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol*. 2001; 440 (4): 342-77.

Kalyanaraman B, Darley-USmar V, Davies KJA, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ, Ischiropoulos H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free radical biology & medicine*. 2012; 52(1): 1-6.

Karam SM, Schawartz IV, Giugliani R. Introdução e aspectos clínicos.

In: Carakushansky G. Doenças genéticas na pediatria. 2001; 155-158.

Kim YJ, Nam RH, Yoo YM, Lee CJ. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett*. 2004; 355: 29-32.

Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(1):44-50.

Kucenas S, Li Z, Cox JA, Egan TM, Voigt MM. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience*. 2003; 121 (4): 935-945.

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

Lee S, Gharavi NM, Honda H, Chang I, Kim B, Jen N, Li R, Zimman A, Berliner JA. A role for NADPH oxidase 4 in the activation of vascular endothelial cells by oxidized phospholipids. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47:145–151.

Lele Z, Krone PH. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnol Adv*. 1996; 14 (1): 57-72.

Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*. 2007; 8 (5): 353-367.

Lipinski B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxidative Med Cell Longev*. 2012:809696.

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

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



Meister A. *Biochemistry of the Amino Acids*. 2a ed. New York, Academic Press, 1965. 729p.

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

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

Mescka 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(1):21-28.

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

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

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(4): 1809–1820.

Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, Rhee SG, Thornally PJ, Partridge L, Gems D, Nyström T, Belousov V, Schumacker PT, Winterbourn CC. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab*. 2011;13:361–364.

Nellis MM, Danner DJ. Gene preference in maple syrup urine disease.

Am J Hum Genet. 2001; 68:232-237.

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

Perucho J, Gonzalo-Gobernado R, Bazan E, Casarejos MJ, Jiménez-Escrig A, Asensio MJ, Herranz AS. Optimal excitation and emission wavelengths to analyze amino acids and optimize neurotransmitters quantification using precolumn OPA derivatization by HPLC. Amino Acids. 2015; 47 (5): 963-973.

Pires RF. Aminoacidopatias. In: Carakushansky G. Doenças Genéticas em Pediatria. 2001; 160-161.

Prestes OD, Presta MA, Kolberg DIS, Zanella R, Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de histamina em vinhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Quim. Nova. 2007; 30 (1): 18-21.

Quental S, Macedo-Ribeiro S, Matos R, Vilarinho L, Martins E, Teles EL, Rodrigues E, Diogo L, Garcia P, Eusébio F, Gaspar A, Sequeira S, Furtado F, Lança I, Amorim A, Prata MJ. Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. Molec Genet Metab. 2008; 94: 148-156.

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

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

Ribas GS, Manfredini V, De Mari JF, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, Sitta A, Deon M, Wajner M, Vargas CR. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of l-carnitine supplementation. Int J Dev Neurosci. 2010; 28 (2):127-132.

Rico EP, de Oliveira DL, Rosemberg DB, Mussulini BH, Bonan CD, Dias RD, Wofchuk S, Souza DO, Bogo MR. Expression and functional

analysis of Na(+)-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. *Brain Research Bulletin*. 2010; 81(4-5): 517-523.

Rico EP, Senger MR, Fauth Mda G, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci*. 2003; 73 (16): 2071-2082.

Rieger E, de Franceschi ID, Preissler T, Wannmacher CMD. Neuroprotective Effect of Creatine and Pyruvate on Enzyme Activities of Phosphoryl Transfer Network and Oxidative Stress Alterations Caused by Leucine Administration in Wistar Rats. *Neurotox Res*. 2017. [Epub ahead of print].

Rink E, Guo S. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neuroscience*. 2004; 127 (1): 147-154.

Ristow M, Zarse K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp Gerontol*. 2010; 45(6): 410-418.

Rodrigues CE. Análise e separação de aminoácidos naturais e não-naturais por cromatografia líquida [Trabalho de Conclusão de Curso]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bacharelado em Ciências Biológicas; 2012.

Rosemberg DB, Rico EP, Langoni AS, Spinelli JT, Pereira TC, Dias RD, Souza DO, Bonan CD, Bogo MR. NTPDase family in zebrafish: Nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2010; 155 (3): 230-240.

Salvador M, Henriques JAP. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. 1ª edição. Canoas, Editora da Ulbra, 2004. 200p.

Saudubray JM, Charpentier C. Clinical phenotypes: Diagnosis/algorithms. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly W, Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. 8a ed. New York: McGraw-Hill Professional. 2001. 6338 p.

Savio LE, Vuaden FC, Rosemberg DB, Bogo MR, Bonan CD, Wyse AT

Long-term proline exposure alters nucleotide catabolism and ectonucleotidase gene expression in zebrafish brain. *Metab Brain Dis.* 2012; 27 (4): 541-549.

Scaini G, Jeremias GC, Furlanetto CB, Domingui D, Comim CM, Quevedo J, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. Behavioral Responses in Rats Submitted to Chronic Administration of Branched-Chain Amino Acids. *JIMD Rep.* 2014; 13: 159–167.

Scaini G, Rochi N, Jeremias IC, Deroza PF, Zugno AI, Pereira TCB, Oliveira GMT, Kist LW, Bogo MR, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. Evaluation of Acetylcholinesterase in an Animal Model of Maple Syrup Urine Disease. *Molecular Neurobiology.* 2012; 45 (2): 279–286.

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

Senger MR, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2004; 139 (2): 203-207.

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

Silva DMF, Ferraz VP, Ribeiro AM. Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. *J Neurosci Methods.* 2009; 177(2): 289-293.

Sitta A, Ribas GS, Mescka CP, Barschak AG, Wajner M, Vargas CR. Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. *Cell Mol Neurobiol.* 2014; 34(2):157-65.

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

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

Sperringer JE, Addington A, Hutson SM. Branched-Chain Amino Acids and Brain Metabolism. *Neurochem Res*. 2017. [Epub ahead of print].

Stadtman ER, Levine RL. Free-radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003; 25: 207–218.

Stern HM, Zon LI. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3 (7): 533-539.

Strauss KA, Morton DH. Branched-chain ketoacyl dehydrogenase deficiency: maple syrup disease. *Curr Treat Options Neurol*. 2003; 5:329–341.

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

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

Tampo Y, Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, Keszler A, Joseph J, Kalyanaraman B. Oxidative stress-induced iron signaling is responsible for peroxide-dependent oxidation of dichlorodihydrofluorescein in endothelial cells: role of transferrin receptor-dependent iron uptake in apoptosis. *Circ Res*. 2003;92:56–63.

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

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

Valadares EG, Giannetti JG, Refosco LF, Silva LCS, Oliveira RB, Pires RF. Leucinoze: doença do xarope de bordo. In: Martins AM, Frangipani BJ, Nicheletti, Oliveira RB. Protocolo Brasileiro de Dietas: Erros Inatos do Metabolismo. Segmento Farma. 2006; 53-58.

Vascotto SG, Beckham Y, Kelly GM. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol.* 1997; 75 (5): 479-485.

Vatanavicharn N, Ratanarak P, Liammongkolkul S, Sathienkijkanchai A, Wasant P. Amino acid disorders detected by quantitative amino acid HPLC analysis in Thailand: an eight-year experience. *Clin Chim Acta.* 2012;413(13-14):1141-4.

Viña J, Borras C, Abdelaziz KM, Garcia-Valles R, Gomez-Cabrera MC. The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 19(8): 779-787.

Vuaden FC, Savio LEB, Rico EP, Mussulini BHM, Rosemberg DB, Oliveira DL, Bogo MR, Bonan CD, Wyse ATS. Methionine Exposure Alters Glutamate Uptake and Adenine Nucleotide Hydrolysis in the Zebrafish Brain. *Mol Neurobiol.* 2016; 53: 200–209.

Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: Insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis.* 2004; 27(4): 427-448.

Wajner M, Vargas CR. Aminoacidopatias e Acidemias orgânicas. In: Fonseca LF, Piaretti G, Xavier C. *Compêndio de Neurologia Infantil.* Rio de Janeiro: Medsi. 2002. 984 p.

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

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

Westall RG, Dancis J, Miller S. Maple syrup urine disease. *Am J Dis*

Child. 1957; 94: 571-572.

Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* 2008;4:278–286.

Yagi K. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods mol biol.* 1998; 108:107-10.

Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, Mikut R, Liebel U, Müller F, Strähle U. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod. Toxicol.* 2009; 28 (2): 245-253.

Zubarioglu T, Kiykim E, Cansever MS, Neselioglu S, Aktuglu-Zeybek C, Erel O. Evaluation of dynamic thiol/disulphide homeostasis as a novel indicator of oxidative stress in maple syrup urine disease patients under treatment. *Metab Brain Dis.* 2017;32(1):179-84

Inicie a quarta referência aqui

**ANEXOS**



## ANEXO A – Pareceres da Comissão Ética no Uso de Animais



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



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de parâmetros neuroquímicos da sinalização colinérgica e comportamento do tipo ansioso em peixe-zebra submetidos à altas doses de aminoácidos de cadeia ramificada.", registrada com o protocolo nº 030/2017-1, sob a responsabilidade de Emílio Luiz Streck, junto à equipe: Leticia Burato Wessler, Naithan Ludian Fernandes Costa, Eduardo Pacheco Rico, Jotele Fontana Agostini Berteli, Karine Medeiros Vieira, Helena Cristina Zuehl Dal Toê, Samira Leila Baldin, Marcel Marcos Machado - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 02/05/2017.

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

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

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


Protocol number: 030/2017-1

Principal Investigator: Emílio Luiz Streck

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

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

Criciúma, 02 de maio de 2017.

  
Jairo José Zocche  
Coordenador da CEUA



**CEUA**  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **28/11/2017**.


<b>Título do projeto</b>	Avaliação de parâmetros neuroquímicos e comportamento do tipo ansioso em peixe-zebra submetidos à altas doses de aminoácidos de cadeia ramificada.
<b>Project title</b>	Evaluation of neurochemical parameters and anxiety-like behavior in zebrafish submitted to high doses of branched chain amino acids.
<b>Número do protocolo</b> Protocol number	030/2017-1 –ADENDO (substitui a carta de aprovação emitida em 02/05/17)
<b>Pesquisador principal</b> Principal Investigator	Emilio Luiz Streck
<b>Pesquisadores</b> Researchers	Eduardo Pacheco Rico, Helena Cristina Zuehl Dal Toe, Jotele Fontana Agostini Berteli, Karine Medeiros Vieira, Leticia Burato Wessler, Marcel Marcos Machado, Naithan Ludian Fernandes Costa, Samira Leila Baldin

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

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that 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 by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 28 de novembro de 2017.

  
Jairo José Zocche  
Coordenador da CEUA