

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

EFEITOS DE METABÓLITOS ACUMULADOS NA DOENÇA DO XAROPE DO BORDO E NA ACIDEMIA METILMALÔNICA SOBRE O COMPORTAMENTO COGNITIVO DE RATOS ADULTOS NAS TAREFAS DE CAMPO ABERTO E ESQUIVA INIBITÓRIA, BEM COMO SOBRE A CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO E A VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS DE HIPOCAMPO E CÓRTEX CEREBRAL.

**Vilson de Castro
Orientadora: Dra. Moacir Wajner**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

**Porto Alegre
2005**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo afetada.

Tabela 1.2 - Formas variantes de acidemia metilmalônica.

Tabela 1.3 - Subtipos de receptores, genes, agonistas e antagonistas glutamatérgicos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 - Consequência da deficiência e/ou diminuição da atividade de uma enzima pertencente a uma rota metabólica.

Figura 1.2 - Rotas metabólicas dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina.

Figura 1.3 - Complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (Chuang, 1998).

Figura 1.4 - Metabolismo do ácido metilmalônico (Adaptado de Fenton et al., 2001).

Figura 1.5 - Estrutura secundária da enzima metilmalonil-CoA mutase de seres humanos (Thoma e Leadlay, 1996).

Figura 1.6 - Sinapse glutamatérgica: rotas de síntese, armazenamento em vesículas, liberação do terminal pré-sináptico, interação do neurotransmissor com o terminal pré-sináptico e remoção do glutamato da fenda sináptica por transportadores de membrana ou células gliais.

Figura 1.7 - Classes de receptores glutamatérgicos.

Figura 3.1 - Efeito dos α -cetoácidos de cadeia ramificada sobre a captação de [3 H]Glutamato em fatias de córtex cerebral de ratos de 30 dias.

Figura 3.2 - Efeito dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (3h de incubação) sobre a viabilidade celular medida pelo método do sal de metiltetrazólio (MTT) em fatias de córtex cerebral de ratos de 30 dias.

Figura 3.3 - Efeito dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (3h de incubação) sobre a viabilidade celular medida pelo método do sal de metiltetrazólio (MTT) em fatias de hipocampo de ratos de 30 dias.

Figura 3.4 - Efeito dos α -ceto ácidos de cadeia ramificada sobre a liberação da enzima desidrogenase láctica no meio de incubação de fatias de córtex cerebral de ratos de 30 dias.

Figura 3.5 - Efeito dos α -ceto ácidos de cadeia ramificada sobre a liberação da enzima desidrogenase láctica no meio de incubação de fatias de hipocampo de ratos de 30 dias.

Figura 3.6 - Efeito dos α -hidroxiácidos de cadeia ramificada sobre a captação de L[3 H]Glutamato em fatias de córtex cerebral de ratos de 30 dias.

Figura 3.7 - Efeito dos α -hidroxiácidos de cadeia ramificada (3h de incubação) sobre a viabilidade celular medida pelo método do sal de metiltetrazólio (MTT) em fatias de córtex cerebral de ratos de 30 dias.

Figura 3.8 - Efeito dos α -hidroxiácidos de cadeia ramificada (3h de incubação) sobre a viabilidade celular medida pelo método do sal de metiltetrazólio (MTT) em fatias de hipocampo de ratos de 30 dias.

Figura 3.9 - Efeito dos α -hidroxiácidos de cadeia ramificada sobre a liberação da enzima desidrogenase láctica no meio de incubação de fatias de córtex cerebral de ratos de 30 dias.

Figura 3.10 - Efeito dos α -hidroxiácidos de cadeia ramificada sobre a liberação da enzima desidrogenase láctica no meio de incubação de hipocampo de ratos de 30 dias.

LISTA DE ABREVIATURAS

- EIM** – erros inatos do metabolismo
- DXB** – doença do xarope do bordo
- ACR** – aminoácidos de cadeia ramificada
- CCR** – alfa-cetoácidos de cadeia ramificada
- CIC** – ácido alfa-cetoisocapróico
- CIV** – ácido alfa-cetoisovalérico
- CMV** – ácido alfa-ceto-beta-metilvalérico
- HCR** – alfa-hidroxiácido de cadeia ramificada
- HIC** – ácido alfa-hidroxiisocapróico
- HIV** – ácido alfa-hidroxiisovalérico
- HMV** – ácido alfa-hidroxi-beta-metilvalérico
- CDCCR** – complexo desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada
- CPD** – complexo piruvato desidrogenase
- α -CCGD** – complexo alfa-cetoglutarato desidrogenase
- GABA** – ácido gama aminobutírico
- SNC** – sistema nervoso central
- MMA** – ácido metilmalônico ou metilmalonato
- NMDA** – N-metil-D-aspartato
- AMPA** – ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
- ATP / ADP** – trifosfato de adenosina / difosfato de adenosina
- MK-801** - maleato de dizocilpína
- CaMK-II** – complexo Cálcio/Calmodulina quinase II
- CREB** – proteína responsiva ao AMPcíclico1
- KA** – ácido caínico
- GLAST** – transportador glutamato/aspartato
- GLT-1** – transportador de glutamato tipo 1
- EAAC1** – carreador de aminoácidos excitatórios tipo 1
- HBSS** – solução salina balanceada de HanK
- MTT** – sal de dimetiltetrazólio
- DMSO** – dimetilsulfóxido
- DHL** – desidrogenase láctica
- NADH** – nicotinamida adenina nucleotídeo reduzido

RESUMO

As deficiências de aprendizado são características comuns em pacientes afetados pela doença do xarope do bordo (DXB) ou pela acidemia metilmalônica. Os sintomas predominantemente neurológicos destas doenças incluem o retardo mental, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, convulsões e alterações neuroradiológicas variadas. Na DXB, a deficiência da atividade do complexo enzimático desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada acarreta o acúmulo **tecidual** dos aminoácidos leucina, valina e isoleucina, dos α -cetoácidos correspondentes, ácido α -cetoisocapróico, α -cetoisovalérico e α -ceto- β -metilvalérico, bem como dos α -hidroxiácidos que destes se derivam, ácido α -hidroxiisocapróico, ácido α -hidroxiisovalérico e **ácido α -hidroxi- β -metilvalérico**. Na acidemia metilmalônica, por sua vez, ocorre um acúmulo **tecidual** do ácido metilmalônico devido à deficiência da enzima metilmalonil-CoA mutase. **Os níveis teciduais destes metabólitos aumentam ainda mais durante crises de descompensação metabólica.**

No presente trabalho investigamos o efeito da administração intrahipocampal dos metabólitos ácidos acima citados sobre o comportamento de ratos adultos, dez minutos antes ou imediatamente após o treino, em tarefas aversivas (esquiva inibitória) e não aversivas (habituação ao campo aberto). **Déficits de aprendizado nas tarefas da esquiva inibitória e da habituação ao campo aberto foram observados para os metabólitos supracitados quando administrados antes do treino, mas não quando foram injetados após o treino.** O ácido metilmalônico injetado dez minutos antes do treino provocou déficit somente no teste de memória espacial, não surtindo efeito sobre a memória quando os animais foram testados na tarefa de esquiva inibitória. O pré-tratamento destes animais com substratos energéticos foi capaz de prevenir o déficit de memória causado por metabólitos acumulados nas doenças estudadas. Quando utilizou-se a creatina monohidratada ou o ácido succínico evidenciou-se prevenção do déficit de memória espacial causado pela administração do ácido α -hidroxiisovalérico no hipocampo de ratos adultos. Por sua vez, apenas o pré-tratamento com creatina monohidratada foi o único capaz de prevenir o déficit de memória de ratos administrados intrahipocampalmente com o ácido metilmalônico. **Os estudos de captação de glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos jovens evidenciaram diminuição na captação de L-[³H]glutamato quando as fatias eram incubadas por 23 minutos na presença dos ácidos CIC e HMV (25-50% de**

diminuição). Em contrapartida, a incubação com o ácido HIV aumentou a captação em 110%, acréscimo que foi prevenido quando ao meio de incubação foi adicionado 1mM de creatina monohidratada. Por último, verificamos que a viabilidade de células de córtex cerebral ou de hipocampo de ratos jovens não foi alterada quando medida através do método do MTT e da determinação da DHL no meio de incubação onde as fatias eram imersas.

Em resumo, **ossos** resultados apontam para alterações **importantes** no aprendizado de animais tratados intrahipocampalmente com os metabólitos ácidos da **DXB em tarefas aversivas e não aversivas**, bem como alterações de aprendizado não essencial quando da administração do principal metabólito que se acumula na acidemia metilmalônica (MMA). **Além disso**, estes déficits comportamentais parecem estar ligados a um comprometimento do metabolismo energético cerebral, visto que o pré-tratamento com creatina em estudos com metabólitos que se acumulam nas duas doenças (HIV para a DXB e MMA para a acidemia metilmalônica) preveniu o déficit de memória destes animais, bem como o pré-tratamento com succinato evitou o déficit de aprendizado espacial causado pelo HIV **nos animais**. **Por outro lado, antioxidantes ou o antagonista do receptor glutamatérgico NMDA MK-801 não preveniu esses efeitos**. Além disso, apresentamos evidências de que o CIC e o HMV ativam o sistema glutamatérgico, bloqueando a captação de glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos jovens, levando a um aumento da quantidade dos neurotransmissores na fenda sináptica..

ABSTRACT

Learning disability is a common feature of patients affected by maple syrup urine disease (MSUD) or methylmalonic acidemia. The neurological symptoms include mental retardation, delay on neuropsychomotor development, seizures and alteration on neuroradiological images. MSUD is caused by severe deficiency of the branched-chain L- α -keto acid dehydrogenase complex (BCKAD) activity leads to tissue accumulation of aminoacids leucine, valine and isoleucine, the branched chain keto acids, α -ketoisocaproic, α -ketoisovaleric and α -keto- β -methylvaleric, and corresponding α -hydroxyacids, α -hydroxyisocaproic, α -hydroxyisovaleric and α -hydroxy- β -methylvaleric. The tissual accumulation of methylmalonic acid is the biochemical hallmark of the methylmalonic acidemia because the methylmalonyl-CoA mutase is defective on this disease. The tissual levels of these metabolites are more proeminents in crisis of metabolic decompensation.

In the present study we investigated the effect of acute administration of the acid metabolites cited above on the behavior of adult rats in the inhibitory avoidance and open field habituation tasks. The DXB acid metabolites producing learning deficits on aversive and spatial learning when infused 10 minutes before the training session of the tasks but not when infused immediately after training. The MMA injected 10 minutes before training provokes deficit only in the spatial task, and do not caused any effect on animals submitted to inhibitory avoidance task. The pretreatment with energetic substrates was the only effective on prevent the memory deficit caused by metabolites accumulating on MSUD or methylmalonic acidemia. The prevention of the spatial memory deficit caused by α -hydroxyisovaleric acid was achieved by administration of creatine monohydrated or succinic acid. The creatine monohydrated was the only effective on prevention of learning deficit of open field habituation provoked by methylmalonic intrahippocampal administration. The results of cerebral glutamate uptake of 30 day-old rats showed a reduction of 25-50% by 30 min treatments with α -ketoisocaproic acid and α -hydroxy- β -methylvaleric acid, respectively. Differently, the α -hydroxyisovaleric acid elevated by 110% the glutamate uptake and the creatine monohydrated pretreatment (1mM) was effective on prevented this effect. We verified that cellular viability of cerebral cortical slices incubated with acid metabolites of MSUD was normal when the studies on cellular viability were performed

by MTT method and by mean of the LDH activity in the incubation bath of the cells. The results of cerebral glutamate uptake of 30 day-old rats showed a reduction of 25-50% by 30 min treatments with α -ketoisocaproic acid and α -hydroxy- β -methylvaleric acid, respectively. Differently, the α -hydroxyisovaleric acid elevated by 110% the glutamate uptake on cortical slices of yang rats, and the creatine monohydrated pretreatment was effective on the prevention of this effect.

In conclusion, our results pointing to strong alterations on learning of animals treated with MSUD acids metabolites on aversive and non aversive tasks., and suggest that non essential alterations occur on learning of animals treated with methylmalonic acid, which may be of value to elucidate some aspects of the neurological dysfunction occurring on these diseases. The behavioral deficits may be linked to a compromise on cerebral energetic metabolism because the pre treatment with energetic substrates was effective on prevention in memory deficits caused by HIV and MMA. Otherwise, focal effects on glutamatergic system may be the causative of learning deficits provoked by administration of CIC and HMV, it is reasonable because the uptake of glutamate was reduced on rats treated with these metabolites, and it is causative of elevation on neurotransmitter levels in the synaptic cleft.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iii
ABREVIATURAS UTILIZADAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - ERROS INATOS DO METABOLISMO	1
1.1.1 - Histórico	1
1.1.2 - Conceito dos EIM	1
1.1.3 - Classificação dos EIM	2
1.1.4 - Alterações Clínicas e Laboratoriais	4
1.1.5 - Doença do Xarope do Bordo	4
1.1.5.1 - Histórico	4
1.1.5.2 - Etiologia	5
1.1.5.3 - Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada	5
1.1.5.4 - Complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada	7
1.1.5.5 - Diagnóstico da DXB	9
1.1.5.6 - Fenótipos Clássicos	10
1.1.5.6.1 - Clássico	10
1.1.5.6.2 - Intermediário	10
1.1.5.6.3 - Intermitente	11
1.1.5.6.4 - Tiamina-responsivo	11
1.1.5.6.5 - Diidrolipoil Desidrogenase (E3)-Deficiente	11
1.1.5.7 - Genética	12
1.1.5.8 - Neuropatologia	12
1.1.5.8.1 - Achados neuropatológicos	12
1.1.5.8.2 - Etiopatogenia do dano neurológico	13
1.1.5.9 - Tratamento	17
1.1.6 - Acidemia Metilmalônica	19
1.1.6.1 - Etiologia, Frequência e Achados Laboratoriais	19

1.1.6.2 - Classificação e manifestações clínicas da acidemia metilmalônica	21
1.1.6.3 - Diagnóstico	22
1.1.6.4 - Fisiopatogenia da acidemia metilmalônica	22
1.1.6.5 - Tratamento para a acidemia metilmalônica	25
1.1.6.6 - Modelos Animais de acidemia metilmalônica	26
1.2 - O CONCEITO DE MEMÓRIA	28
1.2.1 - Fases da Memória	28
1.2.2 - Medição da Memória	29
1.2.2.1 - Como e o quê pode ser obtido com o resultado das medições de comportamento	30
1.2.3 - Tarefas de Comportamento	31
1.2.3.1 - Aprendizagem da Esquiva	31
1.2.3.2 - O teste do Campo Aberto	34
1.2.3.2.1 - Atividade Exploratória em Animais	34
1.2.3.2.2 - Procedimentos Básicos do Campo Aberto	36
1.2.4 - Memória e Hipocampo	37
1.2.5 - Sistemas Moduladores da Memória	39
1.3 - O SISTEMA GLUTAMATÉRGICO	41
1.3.1 - Biossíntese do Glutamato	42
1.3.2 - Receptores Glutamatérgicos	42
1.3.2.1 - Receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluR)	43
1.3.2.2 - Receptores glutamatérgicos metabotrópicos	46
1.3.3 - Transportadores de Glutamato	47
1.3.4 - Excitotoxicidade relacionada ao Glutamato	48
1.4 - OBJETIVOS	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 - MATERIAL	51
2.1.1 - Reagentes	51
2.1.2 - Vidrarias e outros materiais	52
2.1.3 - Equipamentos	53
2.1.4 - Material Permanente	53

2.1.5 - Animais	53
2.2 - MÉTODOS	54
2.2.1 - Preparação das fatias cerebrais para medida da captação de L-[³ H]glutamato	54
2.2.2 - Captação de L-[³ H]glutamato por fatias de córtex cerebral	54
2.2.3 - Ensaio de Viabilidade	55
2.2.4 - Análise Estatística	56
3. RESULTADOS	57
3.1 - Efeito dos α -cetoácidos que se acumulam na doença do xarope do bordo sobre a memória de ratos adultos.	57
3.2 - Efeito dos α -hidroxiácidos que se acumulam na doença do xarope do bordo sobre a memória de ratos adultos.	66
3.3 - Efeito do ácido metilmalônico sobre a memória de ratos adultos	xx
3.4 - Efeito in vitro dos ácidos α -cetoisocapróico, α -cetoisovalérico e α -ceto- β -metilvalérico sobre a captação de L-[³ H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos jovens.	xx
3.5 - Efeito in vitro dos ácidos α -cetoisocapróico, α -cetoisovalérico e α -ceto- β -metilvalérico sobre a viabilidade celular em fatias de córtex cerebral e de hipocampo de ratos jovens medida pelos métodos da reação ao sal de metiltetrazólio (MTT) e da atividade da desidrogenase láctica (DHL).	xx
3.6 - Efeito in vitro dos ácidos α -hidroxiisocapróico, α -hidroxisovalérico e 2-hidroxi-3-metilvalérico sobre a captação de L-[³ H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos jovens.	xx
3.7 - Efeito in vitro dos hidroxiácidos α -hidroxiisocapróico, α -hidroxiisovalérico e 2-hidroxi-3-metilvalérico sobre a viabilidade celular em fatias de córtex cerebral e hipocampo medida pelos métodos da reação ao sal de metiltetrazólio (MTT) e da atividade da desidrogenase láctica (DHL).	xx
3.8 - Efeito in vitro da co-incubação de creatina com o ácido α -hidroxiisovalérico sobre a captação de L-[³ H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos jovens.	xx

4. DISCUSSÃO	xx
5. CONCLUSÕES	xx
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	xx

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - ERROS INATOS DO METABOLISMO

1.1.1 - Histórico

O termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi introduzido pelo inglês Archibald Garrod, em 1908, ao estudar pacientes com alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo. Garrod verificou que vários compostos químicos se acumulavam na urina destes indivíduos e pressupôs que essas observações poderiam contribuir para o diagnóstico e entendimento dessas doenças. Ele propôs que o acúmulo dessas substâncias no organismo, com conseqüente excreção urinária, devia-se a um bloqueio parcial ou total nas suas rotas de oxidação em decorrência da deficiência de uma proteína responsável por uma reação específica para cada caso.

Devido à observação de que ocorrência dessas doenças era maior em irmãos e filhos de pais consanguíneos, sugeriu um modelo de herança autossômica recessiva, baseando-se nas leis de Mendel. Já em 1909, Garrod propôs que certas doenças seriam devidas a deficiências herdadas em uma enzima responsável por uma etapa metabólica definida. Somente em 1958, La Du e colaboradores confirmaram a hipótese de Garrod quando comprovaram a deficiência da oxidase do ácido homogentísico no fígado de um paciente com alcaptonúria.

1.1.2 - Conceito dos EIM

Erros inatos do metabolismo são distúrbios hereditários, na maioria dos casos de herança autossômica recessiva, cuja característica bioquímica principal é a deficiência ou ausência da atividade de uma enzima específica de uma rota metabólica. Além das enzimas, outras proteínas com função alterada como proteínas de transporte e estruturais, imunoglobulinas, hormônios, entre outras, podem estar afetadas nos EIM. O resultado deste bloqueio pode levar ao acúmulo de substâncias tóxicas nos tecidos ou fluidos corporais ou à falta de substâncias essenciais, desta forma muitas vezes acarretando prejuízo no desenvolvimento mental e/ou físico dos indivíduos afetados

(Del Rio, 1962). Além disso, rotas alternativas também poderão originar outras substâncias que possivelmente serão tóxicas (Figura 1.1).

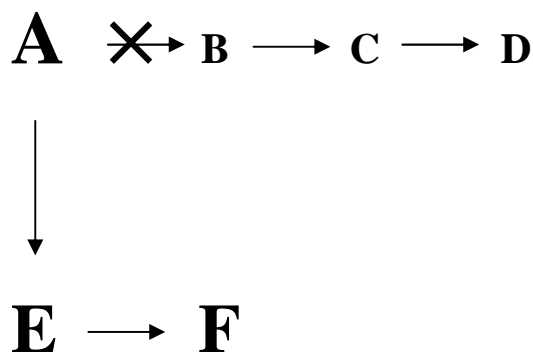


Figura 1.1 - Consequência da deficiência e/ou diminuição da atividade de uma enzima pertencente a uma rota metabólica. O substrato A é convertido por uma série de intermediários no produto final D. As enzimas que catalisam estas reações estão indicadas pelas flechas horizontais. Neste caso, o bloqueio é na reação que converte A em B. O substrato A é convertido em F por uma via alternativa. Um defeito genético na enzima que converte A em B pode ter consequências patológicas relacionadas ao acúmulo de A (precursor tóxico), ou de F (via alternativa), ou então à formação reduzida de D (deficiência do produto), ou alguma combinação destas possibilidades.

Fonte: Beaudet et al., 1989.

1.1.3 - Classificação dos EIM

Em 1982, Sinclair propôs uma classificação para os EIM, conforme o tipo de função exercida pela proteína deficiente, o tecido envolvido, bem como aspectos clínicos, bioquímicos, patológicos e terapêuticos:

1. Distúrbios de transporte: atingem basicamente o transporte renal/e ou intestinal de moléculas orgânicas ou inorgânicas e determinam graus variáveis de depleção tecidual e desnutrição. Exemplos: defeito no transporte de magnésio, doença de Hartnup.

2. Distúrbios de armazenamento, degradação e secreção: envolvem o aparelho de Golgi ou os lisossomas e determinam o acúmulo de macromoléculas e consequentes alterações patológicas nos tecidos onde o defeito se manifesta. Exemplos: doenças lisossômicas de depósito, glicogenoses e cistinose.

3. Distúrbios de síntese: são devidos à deficiência na síntese de moléculas biologicamente importantes tais como: hormônios, proteínas plasmáticas e de defesa imunológica. Exemplos: hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 21-hidroxilase da rota de síntese do cortisol.

4. Distúrbios do metabolismo intermediário: comprometem as vias de metabolização de pequenas moléculas. O defeito enzimático pode ocorrer ao nível de rotas metabólicas importantes tais como o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e o ciclo da uréia. Nestas desordens, ocorre o acúmulo de metabólitos tóxicos na célula que promovem alterações bioquímicas locais ou em outros órgãos, bem como dano tecidual. Exemplos: distúrbios do metabolismo da frutose, galactose e pentose, defeitos no ciclo da uréia, distúrbios do metabolismo de aminoácidos e ácidos orgânicos, porfirias e os distúrbios do metabolismo das purinas.

Uma classificação mais completa dos EIM é a que analisa a área do metabolismo afetada (Scriver et al., 2001) (Tabela 1.1)

Tabela 1.1 - Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo afetada.

-
- EIM dos aminoácidos
 - EIM dos ácidos orgânicos
 - EIM dos glicídios
 - EIM dos glicosaminoglicanos
 - EIM das glicoproteínas
 - EIM das purinas e pirimidinas
 - EIM das enzimas eritrocitárias
 - EIM dos metais
 - EIM das lipoproteínas
 - EIM dos hormônios
 - EIM das proteínas plasmáticas
-

Fonte: Scriver et al., 2001.

1.1.4 - Alterações Clínicas e laboratoriais

Os pacientes portadores de EIM apresentam geralmente sintomatologia variada e inespecífica, mesmo quando possuem o mesmo distúrbio. A variação fenotípica destas desordens deve-se a diferentes graus de deficiência enzimática, a área do metabolismo envolvida e aos tecidos afetados. As manifestações clínicas mais comuns no período neonatal incluem deficiência no crescimento, vômitos, diarreia, convulsões, letargia ou coma, odor anormal na pele e dificuldade alimentar. Outros sinais como atraso no desenvolvimento psicomotor e neurodegeneração progressiva aparecem mais tardiamente (Burton, 1987).

Entre os achados laboratoriais mais comuns associados a EIM no período neonatal incluem: acidose metabólica, hipoglicemia, hiperamonemia, transaminases elevadas, substâncias redutoras na urina, teste de cloreto férrico positivo, cetonúria, neutropenia, trombocitopenia e anemia (Burton, 1987).

1.1.5 - Doença do Xarope do Bordo

1.1.5.1 - Histórico

Em 1954, Menkes e colaboradores descreveram uma doença degenerativa cerebral em quatro casos de uma mesma família. A manifestação do quadro clínico se dava na primeira semana de vida com prognóstico fatal nos três meses subsequentes. O achado mais proeminente foi um odor forte de açúcar queimado na urina, o que deu origem ao nome “Doença do Xarope do Bordo” (DXB). Em 1957, Westall e colaboradores observaram um outro paciente e encontraram concentrações muito altas dos aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina). Em 1959, Menkes isolou na urina dos pacientes com DXB, os alfacetoácidos de cadeia ramificada (α -cetoisocapróico, α -cetoisovalérico e α -ceto- β -metilvalérico) que se derivam dos aminoácidos acima citados.

1.1.5.2 - Etiologia

A doença do Xarope do Bordo (DXB) é um distúrbio metabólico de herança autossômica recessiva causada pela deficiência na atividade do complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (Nobukuni et al., 1992; Chuang & Shih, 2001). Esta deficiência enzimática resulta no acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) leucina, valina e isoleucina, bem como de seus respectivos α -cetoácidos (CCR), ácido α -cetoisocapróico (HIC), ácido α -cetoisovalérico e ácido α -ceto- β -metilvalérico. Da mesma forma são encontrados em concentrações elevadas os hidroxiderivativos correspondentes (HCR) ácido α -hidroxiisocapróico (HIC), ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e ácido 2-hidroxi-3-metilvalérico (HVM), com especial ênfase para o ácido α -hidroxiisovalérico (Figura 1.2) (Adaptado de Scriver et al., 2001).

1.1.5.3 - Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada

Os ACR leucina, valina e isoleucina correspondem a aproximadamente 40% dos aminoácidos essenciais nos indivíduos normais e 35% dos aminoácidos indispensáveis para o tecido muscular. O principal destino metabólico destes ACR é a incorporação em proteínas corporais (Schadewaldt e Wendel, 1997) .

A oxidação dos ACR pode ser vista na figura 1.2. Tem início com o transporte destes aminoácidos para dentro da célula através do sistema de transporte L localizado na membrana plasmática. No interior das células os ACR sofrem três passos iniciais comuns na sua via metabólica. O primeiro passo é uma transaminação reversível catalizada pela aminotransferase de cadeia ramificada produzindo os CCR, α -cetoisocapróico da leucina, α -ceto- β -metilvalérico da isoleucina e α -cetoisovalérico da valina. Após isto, os CCR são translocados para dentro da mitocôndria por um transportador específico onde sofrem descarboxilação oxidativa catalisada pelo complexo multienzimático desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada. Por último, sofrem desidrogenação pela isovaleril-CoA desidrogenase ou pela acil-Coa α -metil desidrogenase de cadeia ramificada . A sequência de reações dos respectivos acil-CoA de cadeia ramificada apresenta vias distintas a partir de então. A leucina apresenta como produtos finais a acetil-CoA e o acetoacetato. A valina é convertida

exclusivamente a succinil-CoA e a isoleucina produz acetil-CoA e succinil-CoA. Os ACR são portanto, tanto cetogênicos quanto glicogênicos, servindo como precursores para a síntese de ácidos graxos e do colesterol e também servindo como substrato para a produção de energia via succinil-CoA e acetoacetato (Chuang e Shih, 2001).

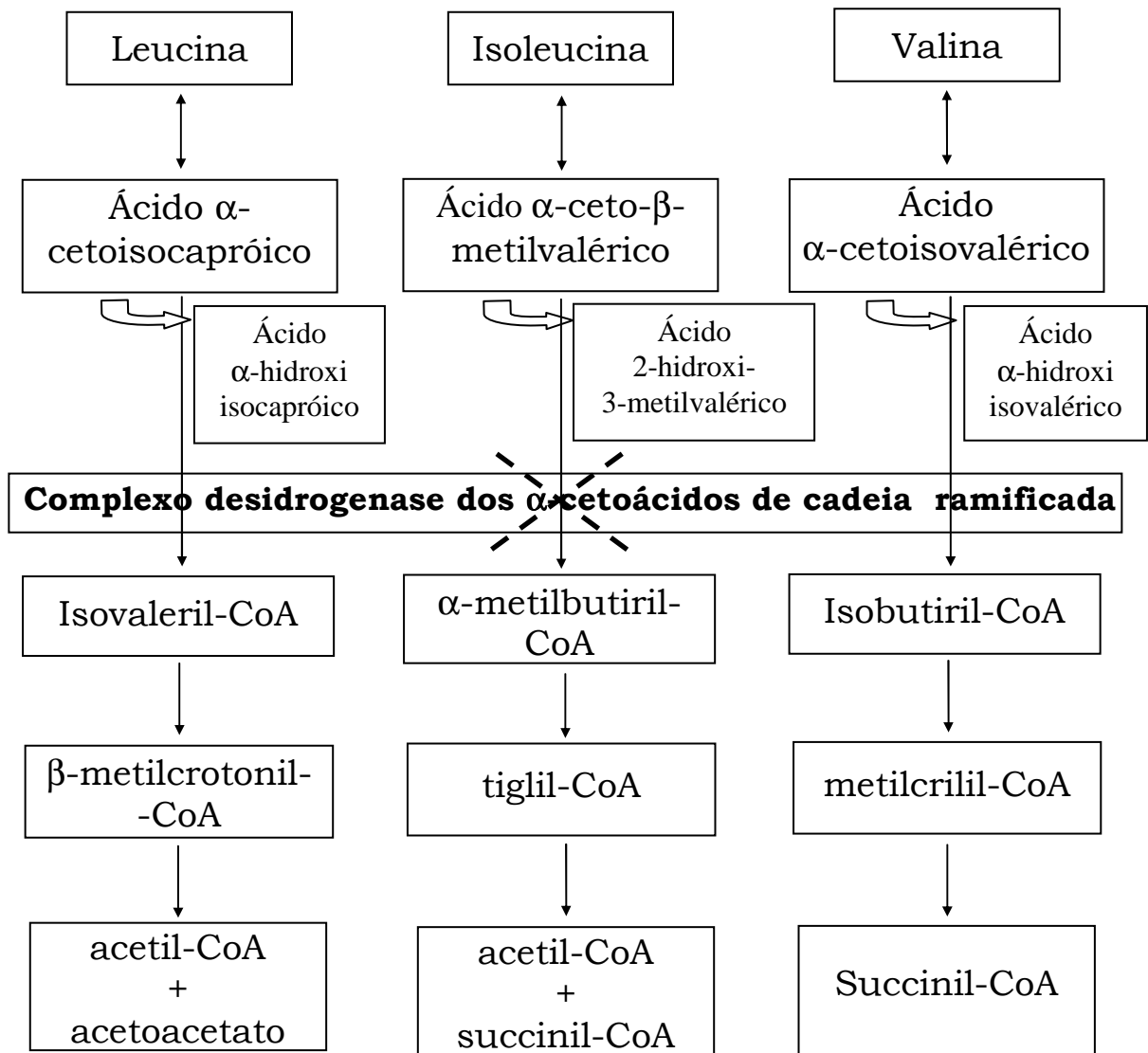


Figura 1.2 - Rotas metabólicas dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina. As duas primeiras reações comuns são catalisadas pelas seguintes enzimas: transaminação reversível pela aminotransferase dos aminoácidos de cadeia ramificada (1) e, descarboxilação oxidativa dos cetoácidos de cadeia ramificada e esterificação da coenzima A pelo complexo alfa-cetoácido desidrogenase (2). Em destaque é mostrada a etapa em que a enzima é deficiente nos pacientes com DXB.

1.1.5.4 - Complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (CDCCR)

O bloqueio metabólico na DXB foi demonstrado em 1960 por Dancis e colaboradores, como sendo na descarboxilação dos α -cetoácidos de cadeia ramificada em leucócitos. O CDCCR é um complexo multienzimático localizado na membrana interna da mitocôndria das células de mamíferos (Yeaman, 1986; Chuang e Shih, 2001), envolvido na descarboxilação dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, valina e isoleucina (Nobukuni, 1992; Parrella et al., 1994; Chuang e Shih, 2001). Os produtos finais desta reação são CO_2 , acil-CoA de cadeia ramificada e NADH na proporção de 1:1:1 (Danner et al., 1979). A atividade deste complexo regula o fluxo dos ACR usados para a produção de energia e é o passo irreversível da via catabólica. O complexo CDCCR é um membro do grupo de complexos de desidrogenases de α -cetoácidos bastante conservados e compreendendo o complexo piruvato desidrogenase (CPD), α -cetogluturato desidrogenase (α -CCGD) e o complexo (CDCCR) que se apresentam com estrutura e função similares. O complexo enzimático CDCCR é uma macromolécula que possui três componentes catalíticos: uma α -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada heterotetramérica ($\alpha_2\beta_2$) ou E1; uma di-hidrolipoil transacilase (24 subunidades idênticas), ou E2; e uma di-hidrolipoamida desidrogenase homodimérica, ou E3. Os componentes E1 e E2 são específicos para CDCCR enquanto a proteína E3 é também componente dos complexos α -cetogluturato e piruvato desidrogenase (Reed e Hackert, 1990). Além disso, o complexo CDCCR de mamíferos apresenta duas enzimas regulatórias: uma quinase e uma fosfatase específicas que regulam a atividade do complexo CDCCR através dos ciclos de fosforilação (inativação)/defosforilação (ativação) de dois resíduos de serina da subunidade E1 α (Eisenstein et al., 1991; Peinemann e Danner, 1994).

Os passos da reação catalisados pelos três componentes da enzima são mostrados na figura 1.3. O componente E1 catalisa uma descarboxilação dos α -cetoácidos mediada pela tiamina pirofosfatase (Treacy et al., 1992; Peinemann e Danner, 1994; Chuang e Shih, 2001) e subsequentemente reduz a molécula de lipoil que é covalentemente ligada a E2. A molécula do lipoil reduzida e o domínio lipoil servem como um braço móvel para transferir o grupo acil do E1 para a CoA, aumentando a

quantidade de acil-CoA. Finalmente, o componente E3, que é fortemente ligado ao FAD, reoxida o resíduo de di-hidrolipoil do E2 tendo o NAD^+ como último receptor de elétrons (Reed e Hackert, 1990; Chuang, 1998; Chuang e Shih, 2001). O resultado final da reação da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada é a produção de acil-CoA de cadeia ramificada, CO_2 , e NADH.

A quinase liga-se aos resíduos Ser-292 e Ser-302 do domínio E1 α , (Cook et al., 1983; Cook et al., 1983a; Lau et al. 1983; Paxton et al., 1986). Estudos iniciais apontam para uma possível ligação da fosfatase ao centro da subunidade E2 (Yeaman, 1989).

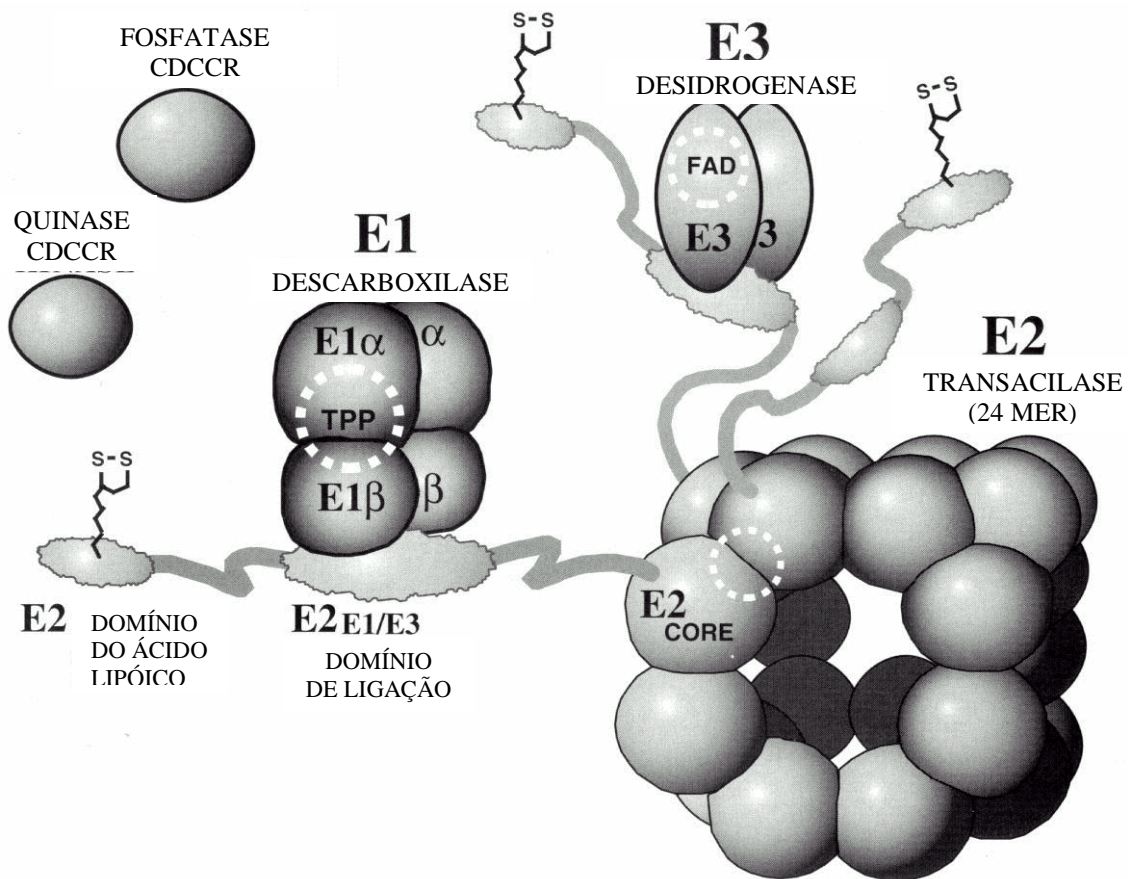


Figura 1.3 - Complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (Chuang, 1998).

1.1.5.5 - Diagnóstico da DXB

O diagnóstico da DXB é fundamentalmente laboratorial. A identificação de concentrações plasmáticas e urinárias elevadas de leucina, isoleucina e valina e de seus respectivos α -cetoácidos, através de cromatografia de aminoácidos e ácidos orgânicos, respectivamente, caracterizam a doença. Os níveis mais altos encontrados para os metabólitos acumulados na DXB são os da leucina, do ácido α -ceto isocapróico e do ácido α -hidroxiisovalérico (1,0-5mmol/L) quando analisado o plasma de pacientes não tratados. Os níveis destes metabólitos quando analisado o líquido céfalo-raquidiano estão ao redor de (1,0mmol/L) (Shigematsu et al., 1983). Muitos estados nos Estados Unidos e outros países utilizam um programa de triagem em massa para identificar neonatos com níveis plasmáticos de leucina acima de 2 mg/100 ml (153 μ mol/L) indicativos da doença (Danner e Elsas, 1989).

A presença de quantidades mensuráveis de L-aloisoleucina no plasma, um produto da racemização da isoleucina, é considerada um determinante importante para o diagnóstico da doença. No entanto, demonstrou-se que a formação da L-aloisoleucina não está associada somente a DXB, pois ocorre tanto em cultura de células normais *in vitro* como também em pessoas normais *in vivo* (Shadewaldt et al., 1990).

A confirmação do diagnóstico é feita através da medida da atividade do complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada em cultura de leucócitos periféricos dos pacientes (Peinemann e Danner, 1994).

O diagnóstico pré-natal da DXB pode ser realizado em cultura de células do fluido amniótico retiradas por amniocentese entre a 14^a e a 18^a semana de gestação, ou por análise direta do tecido em vilosidades coriônicas e cultura de células de vilosidades coriônicas (Kleijer et al., 1985; Chuang e Shih, 2001).

1.1.5.6 - Fenótipos Clínicos

1.1.5.6.1 - Clássico

A DXB que apresenta um quadro neonatal de encefalopatia é considerada a forma clássica, e representa o fenótipo mais grave e comum da doença. Os níveis dos ACR e CCR, particularmente de leucina e ácido α -cetoisocapróico, estão muito aumentados no sangue, chegando a 5 mM, bem como no líquido céfalo-raquidiano e na urina dos pacientes afetados. A atividade do complexo CDCCR em fibroblastos ou cultura de linfócitos encontra-se usualmente em 2% ou menos em relação à atividade normal da enzima. Os pacientes afetados apresentam-se normal ao nascimento e os sintomas que se desenvolvem geralmente entre o 4º e o 7º dia de vida incluem letargia, recusa alimentar, alterações neurológicas progressivas como hipotonia e hipertonia, cetose, odor de açúcar queimado na urina, hipoglicemia, convulsões e coma.

A maioria dos pacientes, quando não tratados, morre nos meses de vida em decorrência de crises metabólicas recorrentes e de deterioração neurológica, frequentemente precipitadas por infecções ou outros eventos relacionados ao catabolismo, tais como vacinações ou cirurgias (Chuang e Shih, 2001).

1.1.5.6.2 - Intermediário

Pacientes com esta forma apresentam elevações persistentes dos ACR, porém menores do que as verificadas na forma clássica (acompanhadas por comprometimento neurológico), mas não apresentam sintomas severos no período neonatal. Muitos casos não apresentam episódios de descompensação metabólica aguda. A atividade residual da enzima é geralmente maior do que a apresentada no fenótipo clássico e varia entre 3 a 30% da normal, embora existam relatos de níveis menores (Fischer & Gerritsen, 1971; Muller et al., 1971; Gonzales-Rios et al., 1985). O diagnóstico geralmente ocorre entre 5 meses a 7 anos de idade em decorrência de atraso no desenvolvimento e/ou convulsões e cetoacidose, embora encefalopatia aguda raramente ocorra.

1.1.5.6.3 - Intermitente

Pacientes apresentam um desenvolvimento inicial normal, com crescimento e inteligência normais. No entanto, eles apresentam risco de sofrerem descompensação metabólica durante situações de estresse. No período assintomático da doença os níveis dos ACR são normais. A atividade enzimática situa-se entre 5 a 20% da normal. Os sintomas iniciais normalmente surgem entre os 5 meses e 2 anos de vida em associação com otite média ou outras infecções. Os episódios de mudanças agudas no comportamento e dificuldade de caminhar podem evoluir para crises de descompensação com choque e coma. Os perfis de ACRs e CCRs nestes casos equiparam-se ao do fenótipo clássico da DXB durante as crises (Chuang e Shih, 2001).

1.1.5.6.4 - Tiamina-responsivo

Normalmente, estes pacientes não apresentam doença neonatal aguda e suas manifestações clínicas são semelhantes às da forma intermediária. A concentração de ACR no plasma é cerca de 5 vezes maior que o normal. Estes níveis (2 a 5 mM) são reduzidos abruptamente para níveis normais com doses de 10 a 1000 mg/dia de tiamina e com dieta restrita em proteínas. A atividade enzimática situa-se entre 2 a 40% da normal. As manifestações clínicas e laboratoriais mais frequentes são descompensação metabólica e acidose, acompanhada de desenvolvimento físico normal (Chuang e Shih, 2001).

1.1.5.6.5 - Diidrolipoil Desidrogenase (E3)-Deficiente

A deficiência de E3 é um distúrbio raro. Apresenta sinais clínicos semelhantes aos da forma intermediária, mas é acompanhada de acidose láctica grave. O perfil de ácidos orgânicos na urina exhibe anormalidades encontradas tanto na acidose láctica como na DXB. O lactato, o piruvato, o α -cetoglutarato, o α -hidroxiisovalerato e o α -hidroxiglutarato estão aumentados neste fenótipo. A hiperalaninemia secundária ao acúmulo de piruvato é também frequente. Os ACR estão levemente ou moderadamente aumentados no plasma, quando comparados aos níveis encontrados na forma clássica. Estes pacientes têm deficiência das três enzimas desidrogenases em que E3 é um

componente, a α -cetoglutarato desidrogenase, a piruvato desidrogenase e a α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada. Os pacientes que apresentam este fenótipo normalmente não apresentam sintomatologia nos primeiros meses de vida. Quando surge acidose láctica persistente, entre 8 semanas e 6 meses de idade, ocorre a deterioração neurológica progressiva caracterizada por hipotonia, atraso no desenvolvimento e encefalopatia similar a de Leigh. (Chuang e Shih, 2001). Os resultados dos tratamentos com doses farmacológicas de tiamina, biotina, e ácido lipóico, combinados com restrição na dieta de gorduras e AACRs não têm se revelado satisfatórios.

1.1.5.7 - Genética

A doença do Xarope do Bordo é uma desordem metabólica autossômica recessiva. A frequência mundial baseada em neonatal em massa em 26,8 milhões de recém nascidos é de 1 para 185.000 (Naylor, 1980). Esta frequência inclui o fenótipo clássico e as formas variantes da doença. Os pacientes com o fenótipo intermediário da doença não estão incluídos nestes cálculos. Em países cujo casamento consanguíneo é comum (Turquia, Arábia Saudita, Espanha e Índia), a frequência é muito maior. A DXB é altamente prevalente nas populações Menonitas dos condados de Lancaster e Lebanon no estado da Pensilvânia/EUA. Toda a população Menonita afetada apresenta o fenótipo Clássico da doença devido a uma mutação genética única na subunidade E1 α .

1.1.5.8 - Neuropatologia

1.1.5.8.1 - Achados neuropatológicos

Na maioria dos pacientes com DXB observa-se encefalopatia com edema cerebral generalizado. Pode haver também a formação de edema localizado intenso envolvendo o tronco cerebral dorsal, os pedúnculos cerebrais e a cápsula interna. Estes estudos relataram também a ocorrência de hipodensidade difusa no globo pálido e tálamo afetando a substância branca destas regiões, o que é um indicativo de hipomielinização (Treacy et al., 1992). A fase aguda do edema também é seguida por alargamento do sulco sobre os lobos frontais e das fissuras inter-hemisféricas e Silviana

indicando atrofia cerebral. O trato piramidal da medula espinal, a mielina que circunda o núcleo dentado, o corpo caloso e os hemisférios cerebrais são os mais afetados. Paralelamente à deficiência de mielina, observa-se redução dos oligodendrócitos. Outra estrutura que apresenta alterações expressivas é o cerebelo, pois relatos mostram panecrose da camada de células granulares com preservação das células de Purkinje. Nos núcleos da base e substância negra observou-se perda neuronal considerável (Chuang e Shih, 2001).

Os achados radiológicos mais recentes apontam que as anomalias consistem de um sinal aumentado em neuroimagens (T2), que é compatível com o conteúdo aquoso modificado na substância branca característico da desmielinização. As áreas afetadas mais comumente são: mesencéfalo, tronco cerebral, tálamo e o globo pálido; as lesões supratentórias são vistas somente nos casos mais severos (Schonberger et al., 2004).

Quando comparadas as presenças anormais dos AACRs e CACRs com os achados de neuroimagens, o aumento destes metabólitos era acompanhado por uma difusão protônica marcadamente restrita, compatível com edema citotóxico ou da bainha intramielínica no tronco cerebral, nos gânglios basais, no tálamo, no cerebelo, na substância branca periventricular e no córtex cerebral (Jan et al., 2003).

1.1.5.8.2 - Etiopatogenia do dano neurológico

Os mecanismos tóxicos dos ACR e CCR sobre o cérebro ainda não foram totalmente elucidados, mas diversos estudos já realizados contribuem para o entendimento das suas ações sobre o SNC. Alguns fatores, tais como a complexidade do desenvolvimento do cérebro, as concentrações alcançadas pelas toxinas e o estágio do desenvolvimento cerebral em que elas atuam prejudicam o esclarecimento destes efeitos.

Tashian, em 1961, demonstrou que os ácidos α -cetoisocapróico e α -cetoisovalérico inibem competitivamente a glutamato descarboxilase em homogeneizados de cérebro de rato. Os hidroxiácidos α -hidroxiisocapróico e α -

hidroxiisovalérico também apresentaram o mesmo efeito mas em menor grau. Desta forma, estes metabólitos poderiam reduzir a quantidade de produção de ácido γ -aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC). Foi também verificado em um modelo animal de DXB em bovinos, que eles apresentaram uma perda marcante no número de receptores pós-sinápticos GABA_A demonstrada por ligação de [³H]diazepam (Dodd et al., 1992). Por outro lado, foi demonstrado que os cetoácidos CIC, CIV e CMV inibem a oxidação da glicose e a síntese de acetilcolina, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos em fatias de cérebro de ratos (Gibson e Blass, 1976). Além disso, esses investigadores demonstraram que estes cetoácidos também inibem a enzima ácido graxo sintetase, além de observar que os cetoácidos inibem a oxidação do piruvato em cérebro de ratos, o transporte mitocondrial de piruvato, a atividade do complexo piruvato desidrogenase e a atividade da enzima α -cetogluturato desidrogenase. Os aminoácidos valina e isoleucina, por sua vez, inibiram alostericamente a enzima piruvato quinase em cérebro de ratos. Outros achados mostraram que o excesso de leucina na dieta provoca uma diminuição da serotonina cerebral (Yuwiler e Geller, 1965). Finalmente, como uma propriedade da leucina é estimular a secreção de insulina, Panten e colaboradores (1972) propuseram que essa ação poderia explicar os episódios de hipoglicemia apresentados pelos pacientes com a DXB.

Dentre os cetoácidos acumulados na doença, o ácido α -cetoisocapróico é considerado o mais tóxico. O CIC inibe o consumo de oxigênio em cérebro de ratos, a oxidação do 3-hidroxi butirato (Gibson e Blass, 1976) e provoca deficiência na formação da mielina no cerebelo de ratos. Alguns estudos demonstraram que a elevação sérica de leucina e de CIC no espaço extracelular altera a concentração no SNC dos aminoácidos transportados pelo transportador dos aminoácidos neutros de cadeia longa (sistema L) que incluem a metionina, valina, isoleucina, triptofano, tirosina, fenilalanina e glutamina (Araújo et al., 2001). Desta forma, a biossíntese celular de alguns neurotransmissores cerebrais como as catecolaminas e a serotonina poderia estar afetada pela diminuição na concentração cerebral de alguns destes aminoácidos (Huang et al., 1996; Zielke et al., 1996). Estes mesmos autores observaram que a adição de CIC a cultura de astrócitos de rato diminui o conteúdo de glutamato aumentando a taxa de oxidação do glutamato. O mecanismo sugerido foi a transferência do grupo amino do

glutamato para o CIC levando a formação de leucina e α -cetoglutarato. Também demonstrou-se que além de aumentar a taxa de oxidação de glutamato, níveis elevados de CIC também aumentam a oxidação da glutamina (Zielke et al., 1997). Na presença de um excesso de CIC, o conteúdo de glutamato intracelular em cultura de astrócitos diminui em 50% (Yudkoff et al., 1993; Yudkoff et al., 1994). Outro efeito importante parece ser o da leucina ao ativar alostericamente a enzima glutamato desidrogenase (Yielding e Tomkins 1961). Estudos subsequentes demonstraram ativação semelhante em mitocôndrias de ratos (Coueé e Tipton, 1989) e em sinaptossomas (Erecinska e Nelson, 1990). Por outro lado, o CIC inibe a síntese de glutamina em cultura de astrócitos (Yudkoff et al., 1994).

Jouvet e colaboradores (2000) descreveram os efeitos dos ACRs e CCRs sobre a viabilidade celular de fibroblastos cultivados da pele de um paciente com DXB. Pela proposição dos autores, a apoptose foi ativada pela presença de níveis de ACRs e CCRs que são comparáveis aos encontrados nos pacientes. Além disso, Funchal e colaboradores (2004a) demonstraram, em cultura de astrócitos, que os CCRs levam a morte celular em concentrações comparáveis as alcançadas por indivíduos afetados e que estão no estado de descompensação metabólica. Mais ainda, estes autores demonstraram que os CCRs alteram a fosforilação de proteínas do citoesqueleto levando à reorganização da actina e da GFAP (proteína ácida fibrilar glial) do citoesqueleto celular (Funchal et al., 2002; Pessoa-Pureur et al., 2002; Funchal et al., 2004), bem como demonstraram que as células gliais tratadas com estes metabólitos apresentam morfologia distinta das células controles, distinguindo-se do carácter poligonal e apresentando uma distribuição fusiforme (Funchal et al., 2004a).

Por outro lado, estudos *in vitro* de metabolismo energético cerebral apontam para uma redução na atividade da enzima creatina quinase quando as células eram expostas a concentrações elevadas de ACRs, mas não de CCRs (Pilla et al., 2003). Além disso, foi demonstrado um efeito inibitório *in vitro* dos CCRs sobre a produção de CO₂ e a atividade do complexo I-III (40 e 60 % de diminuição, respectivamente) embora não tenham sido demonstrados efeitos na liberação de lactato, utilização de glicose ou ainda na atividade dos outros complexos da cadeia respiratória (Sgaravatti, 2003). Outros resultados indicam a existência de peroxidação lipídica e redução da capacidade cerebral em modular eficientemente os danos associados com uma produção

aumentada de radicais livres pelos aminoácidos, cetoácidos e hidroxiácidos de cadeia ramificadas que se acumulam na DXB, medidas pelas técnicas de quimioluminescência, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, potencial antioxidante total e reatividade antioxidante total (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003).

Em relação ao glutamato, resultados apontam para uma diminuição da captação de glutamato por vesículas sinápticas de cérebro de ratos jovens. Nestes modelos foi demonstrado que os CCRs e ACRs inibem a captação de glutamato em concentrações similares a de pacientes em descompensação metabólica sendo sugerido inclusive um mecanismo de inibição competitiva entre estes metabólitos (Reis et al., 2000; Tavares et al., 2000).

Alterações comportamentais também têm sido atribuídas aos ACR e CCR acumulados na DXB. Utilizando um modelo crônico de injeções de leucina, Mello e colaboradores (1999) induziram deficit comportamental de longa duração quando os ratos eram submetidos a duas tarefas distintas de aprendizado (habituação ao campo aberto e esquiva ativa de duas vias). Por último, Coitinho e colaboradores (2001) investigaram o efeito da administração intraestriatal dos CCRs que se acumulam na DXB sobre o comportamento convulsivante de ratos adultos. Os resultados revelaram a indução de convulsões após a injeção do ácido α -cetoisovalérico e que estas podem ser mediadas através de mecanismos de controle gabaérgicos e glutamatérgicos.

Deve-se enfatizar, no entanto, que a fisiopatogenia da disfunção neurológica presente nos pacientes com doença do xarope do bordo ainda não está completamente esclarecida.

1.1.5.9 - Tratamento

O tratamento dos pacientes com DXB consiste basicamente em restrição dos ACR da dieta para minimizar os efeitos do acúmulo dos metabólitos acumulados, principalmente no sistema nervoso central. O objetivo do tratamento é normalizar as concentrações dos ACR sem prejudicar o crescimento e desenvolvimento dos pacientes e para tanto, deve ser iniciado o mais cedo possível e ainda no período neonatal. Administra-se um leite especial com concentrações reduzidas de leucina, valina e

isoleucina (Snyderman et al., 1964). Outras preparações dietéticas específicas para pacientes com DXB também foram desenvolvidas. A terapia com tiamina (50 a 300 mg/dia) por 3 semanas é empregada no início do tratamento para a detecção de pacientes com a doença tiamina-responsível (Chuang e Shih, 2001).

Em casos mais graves tem sido utilizado o transplante de fígado, substituindo o órgão com gene alterado por um órgão normal. Desta forma, os aminoácidos de cadeia ramificada podem ser metabolizados normalmente.

Na fase aguda, emprega-se um tratamento mais agressivo, pois o aumento na concentração dos ACR e CCR, frequentemente precipitado por infecções ou outros estresses, leva à deterioração das funções cerebrais. Existem três medidas a ser tomadas para o controle das crises metabólicas: remoção dos metabólitos tóxicos; promover suporte nutricional adequado e minimizar o catabolismo e/ou promover o anabolismo. Supõe-se que promover o anabolismo pode ser um dos mais importantes fatores no controle da descompensação metabólica (Chuang e Shih, 2001). A diálise peritoneal e a transfusão sanguínea são utilizadas para a remoção dos metabólitos com melhora significativa e rápida do quadro neurológico. No entanto, a hemodiálise é mais eficaz na depuração dos ACR e dos CCR do plasma do que a diálise peritoneal. A diálise peritoneal é um procedimento relativamente simples, enquanto que a hemodiálise requer um equipamento sofisticado e treinamento especializado. Desenvolveu-se, para os pacientes com DXB, uma terapia com nutrição parenteral que inclui uma mistura de ACR em combinação com glicose, lipídios, eletrólitos e vitaminas a fim de proporcionar uma nutrição balanceada. Esta preparação é utilizada nos casos de descompensação metabólica moderada ou em combinação com outras terapias na descompensação metabólica severa. Uma terapia alternativa consiste em evitar o estado catabólico com administração de insulina e glicose (Rogers et al., 1962; Wendel, et al., 1982). Devemos no entanto enfatizar, que um grau variável de comprometimento da cognição é observado na maioria dos pacientes com doença do xarope do bordo, os quais foram submetidos a um tratamento aparentemente adequado, sugerindo que o tratamento para esta doença deva ser melhorado.

1.1.6 - Acidemia Metilmalônica

1.1.6.1 - Etiologia, Frequência e Achados Laboratoriais

O acúmulo tecidual de ácido metilmalônico é a característica bioquímica fundamental de um grupo de desordens metabólicas de herança autossômica recessiva, denominadas em seu conjunto de acidemia metilmalônica (Mc Kusick, 1998). Foi descrita pela primeira vez por Oberholzer e colaboradores (1967) e é causada por uma deficiência severa ou ausência de atividade da enzima L-metilmalonil-Coa mutase (E.C.5.4.99.2) (Figura 2) (Fenton et al., 2001). Esta enzima é uma proteína com 150 Kda encontrada na matriz mitocondrial sob forma dimérica. A L-metilmalonil-Coa mutase possui duas subunidades idênticas, cada uma delas contendo um sítio ativo para adenosil cobalamina e um sítio ativo para metilmalonil-Coa. Na reação de isomerização de L-metilmalonil-Coa a succinil-Coa, a enzima atua transferindo o grupo carboxil-Coa (Fenton et al., 2001). A frequência da doença é da ordem de 1: 48.000 nascimentos vivos (Massachusetts, 1994). A deficiência da atividade desta enzima, que realiza a conversão de L-metilmalonil-Coa (MMCoA) a succinil-CoA, leva ao acúmulo de metilmalonil-CoA (MMCoA) nos tecidos dos pacientes afetados, o qual se converte espontaneamente em ácido metilmalônico (MMA) ou metilmalonato.

Além do ácido metilmalônico (MMA) encontrado em altas concentrações no sangue e na urina, outros metabólitos se acumulam secundariamente em concentrações bem menores, sendo os principais deles o ácido propiônico e o ácido 3-hidroxiopropiônico, seguindo-se o ácido tíglico, a tiglil-CoA, o ácido metilcítrico e a propionilglicina (Fenton et al., 2001). As concentrações de MMA no sangue dos indivíduos afetados variam de 1 a 2,9 mM, enquanto em indivíduos normais não é detectada. A concentração de MMA no líquido é igual ou superior a do plasma (Mayatepek et al., 1996; Fenton et al., 2001).

Entre os achados laboratoriais mais frequentes estão acidose metabólica, cetonemia, cetonúria, hiperamonemia, hipoglicemia, aumento nos níveis de glicina no plasma e na urina, bem como leucopenia e trombocitopenia durante as crises agudas (Mayatepek et al., 1996; Fenton et al., 2001). A figura 1.4 mostra a rota de degradação do ácido metilmalônico. A deficiência da enzima L-metilmalonil-CoA mutase causa a

acidemia metilmalônica. A figura 1.5 mostra a estrutura secundária dessa enzima.

- Valina
- Isoleucina
- Metionina
- Treonina
- Timina
- Uracila
- Colesterol
- Ácidos graxos de cadeia ímpar

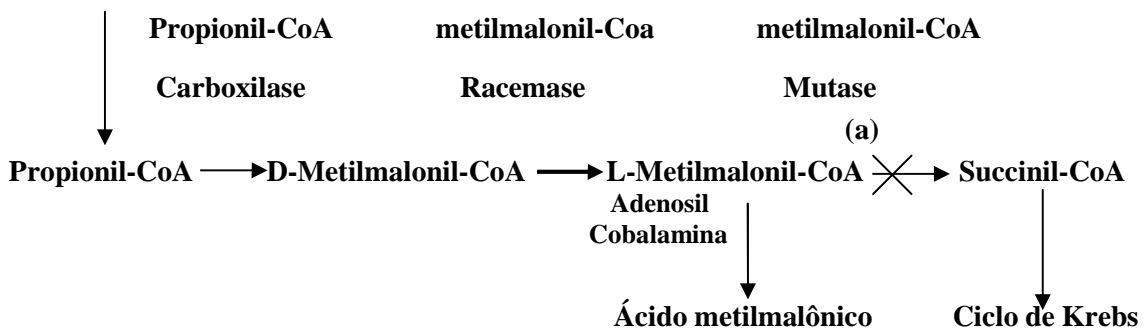


Figura 1.4 - Metabolismo do ácido metilmalônico (Adaptado de Fenton et al., 2001).
Nota: (a) Bloqueio da metilmalonil-CoA mutase induz a acidemia metilmalônica

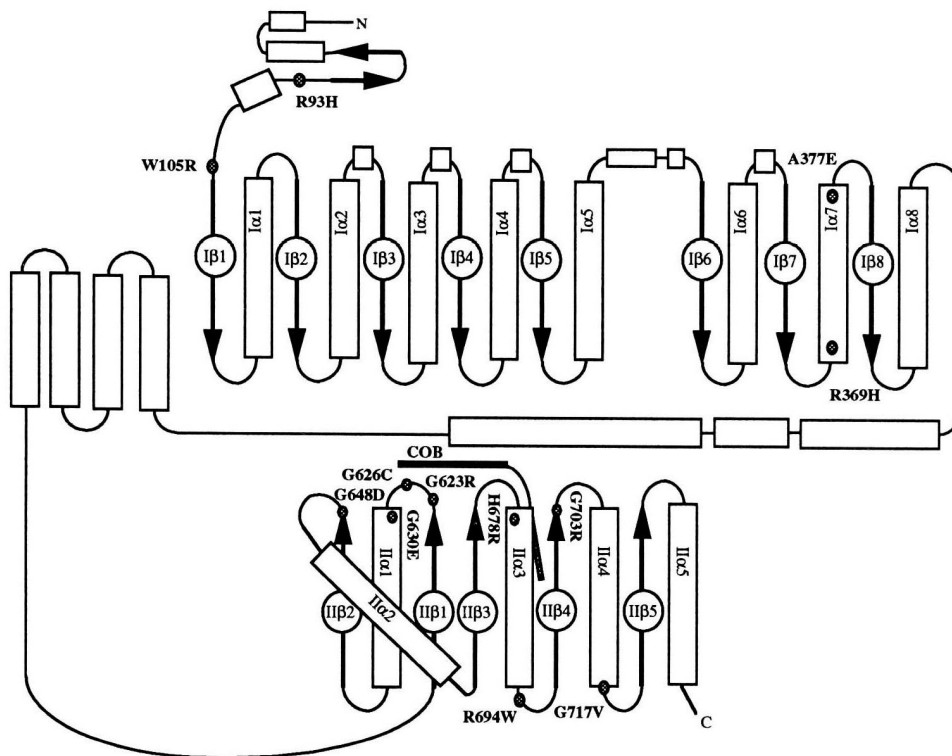


Figura 1.5 - Estrutura secundária da enzima metilmalonil-CoA mutase de seres humanos (Thoma e Leadlay, 1996)

1.1.6.2 - *Classificação e manifestações clínicas da acidemia metilmalônica*

A acidemia metilmalônica pode ser classificada de acordo com o defeito bioquímico envolvido. As variantes mais comuns são a mut⁰, no qual a enzima metilmalonil-CoA está totalmente inativa e a mut⁻, que apresenta 2 a 75 % da atividade normal. Por outro lado, cinco variantes estão relacionadas com defeitos na síntese ou no transporte do cofator, a adenosilcobalamina, um derivado da vitamina B₁₂. Estas variantes foram denominadas de Cbl A, Cbl B, Cbl C, Cbl D e Cbl F. Na variante Cbl A ocorre a deficiência em uma das redutases da cobalamina mitocondrial e na Cbl B ocorre a deficiência na cobalamina adenosiltransferase. Os outros três grupos, Cbl C, Cbl D e Cbl F, estão associados com defeitos na síntese de adenosilcobalamina e da metilcobalamina. As variantes Cbl D e Cbl C são derivadas de defeitos no metabolismo citosólico das cobalaminas. A diferença entre as duas reside na severidade dos distúrbios apresentados, sendo o tipo C o mais severo. Na forma variante Cbl F, o defeito está no transporte da cobalamina formada para fora do lisossoma (Fenton et al., 2001). A Tabela 1.2, a seguir, mostra os principais achados clínicos em 45 pacientes pertencentes a quatro formas variantes de acidemia metilmalônica.

Tabela 1.2 - Formas variantes de acidemia metilmalônica

SINAIS E SINTOMAS	CLASSE MUTANTE			
	cbl A	cbl B	Mut ⁻	mut ⁰
Letargia	78	83	100	85
Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor	75	86	40	77
Vômitos recorrentes	58	86	80	77
Desidratação	64	86	100	62
Sofrimento respiratório	89	67	50	55
Hipotonia muscular	44	57	33	91
Retardo no crescimento	36	33	25	65
Hepatomegalia	11	67	0	57
Coma	50	29	40	38

Fonte: Fenton et al., 2001.

Nota: Os dados estão representados em percentagem de pacientes em cada grupo

Em geral, os pacientes apresentam desidratação, hepatomegalia, sofrimento respiratório, hipotonia muscular generalizada, letargia, vômitos recorrentes, atraso no desenvolvimento físico e mental, encefalopatia, coma e convulsões.

São encontradas com frequência alterações morfológicas no sistema nervoso central (SNC) desses pacientes principalmente ao nível do globo pálido (Korf et al., 1986; Heidenreich et al., 1988; De Souza et al., 1989; Roodhooft et al., 1990). Postula-se que o aparecimento destas alterações possa estar relacionado com a exposição contínua do cérebro a metabólitos tóxicos (De Souza et al., 1989). Assim, Roodhooft e colaboradores (1990) sugerem que os ácidos orgânicos envolvidos nesta doença são os prováveis agentes causadores das lesões dos gânglios da base, com necrose do putâmen, hipodensidade e gliose do globo pálido, espongiose difusa do córtex central e da substância branca do cérebro e dos hemisférios cerebelares.

1.1.6.3 - Diagnóstico de acidemia metilmalônica

A acidemia metilmalônica é diagnosticada fundamentalmente pela detecção de altas concentrações do ácido metilmalônico na urina dos pacientes, através de cromatografia gasosa e/ou espectrometria de massa. Os ácidos 3-hidroxiisovalérico e metilcítrico e a propionilglicina também estão aumentados. O diagnóstico pré-natal pode ser realizado pela quantificação dos ácidos metilmalônico, metilcítrico e de propionilcarnitina no líquido amniótico, bem como na determinação da atividade enzimática (L-metilmalonil-CoA mutase) em culturas de células deste líquido (Sweetman et al., 1979; Chalmers e Lawson, 1982; Fenton et al., 2001).

A identificação da variante envolvida na doença é feita através da medida da atividade da enzima deficiente em fibroblastos e/ou leucócitos, bem como pela dosagem sérica de cobalamina (Fenton et al., 2001).

1.1.6.4 - Fisiopatogenia da acidemia metilmalônica

Vários estudos demonstraram a redução na produção cerebral de energia e de lipídios, bem como alterações na fosforilação de proteínas cerebrais causados por metabólitos acumulados na acidemia metilmalônica. Foram descritos efeitos importantes *in vivo* e *in vitro* do MMA sobre o metabolismo neuronal, tais como a diminuição da concentração do ácido N-acetilneuramínico (NANA/gangliosídios) em cérebro de ratos (Wajner et al., 1988), a diminuição na utilização de glicose e de corpos cetônicos por prismas de cérebro de ratos, provavelmente devido à inibição das atividades da succinato desidrogenase e da β -hidroxibutirato desidrogenase (Dutra et al., 1991; Dutra et al., 1993), bem como uma formação aumentada de lactato e uma redução na produção de CO₂ no cérebro de ratos jovens (Wajner et al., 1992). Outros resultados sugerem que o MMA também aumenta a produção de lactato através de uma ativação secundária dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e sugerem que o efeito anticonvulsivante obtido pela pré-administração de creatina nas convulsões induzidas pelo MMA pode ser devido a um incremento nos níveis de fosfocreatina disponíveis para os processos metabólicos (Royes et al., 2003). Considerando a importância da creatina quinase para a homeostase do metabolismo cerebral, Schuck e colaboradores sugerem que a inibição desta enzima decorrente do aumento nos níveis de MMA pode contribuir para a neurodegeneração dos pacientes afetados pela acidemia metilmalônica (Schuck et al., 2004).

Outros estudos com culturas de células neurais de córtex e de estriado de cérebro de embrião de ratos mostraram que a exposição destas células a 10 mM de metilmalonato por 24 horas causou uma mortalidade neuronal superior a 90%, sendo que as células corticais foram as mais vulneráveis. Um decréscimo na relação ATP/ADP também foi observado após o tratamento das células com o metabólito, que foi atribuído à produção de malonato a partir de metilmalonato, descrito como inibidor clássico da cadeia respiratória e do ciclo de Krebs. Além disso, foram encontradas alterações no potencial de membrana após 20 min de incubação contínua das culturas com 10mM de metilmalonato (McLaughlin et al., 1998).

Em trabalhos recentes verificou-se que o ácido metilmalônico na concentração de 2,5 mM reduz a fosforilação das proteínas do citoesqueleto de fatias de córtex cerebral de ratos incubados por 1 hora a 30 °C (De Mattos-Dutra et al., 1997). Além disso, utilizando modelos experimentais (agudo e crônico) com injeções subcutâneas de ácido metilmalônico, também foi demonstrada a redução na incorporação de fósforo radioativo nas proteínas do citoesqueleto de córtex cerebral de ratos jovens (De Mattos-Dutra et al., 1998).

Por outro lado, a administração intra-estriatal de metilmalonato provoca convulsões mediadas pelo sistema glutamatérgico, através dos receptores NMDA, visto que as convulsões são prevenidas pela pré-administração de bloqueadores desses receptores, e provavelmente também pela inibição do ciclo de Krebs e da depleção de ATP, visto que succinato previne parcialmente os episódios convulsivos (de Mello et al., 1996). As convulsões, provocadas pelo MMA são também atenuadas quando os animais são pré-tratados com ácido ascórbico ou α -tocoferol, o que indica a atuação de radicais livres nas mesmas (Fighera et al., 1999).

Por outro lado, a hiperamonemia presente na acidemia metilmalônica também pode ser explicada devido ao acúmulo do ácido propiônico, da propionil-CoA ou dos outros metabólitos acumulados nesta doença. Glasgow e Chase (1976), observaram um efeito inibitório do ácido propiônico sobre a síntese de uréia em fatias de fígado de ratos utilizando amônia como substrato. Da mesma forma, Coude et al., (1979), verificaram que o ácido propiônico reduz a síntese da uréia a 60% do normal a partir de ornitina e amônia em fígado de ratos. Por outro lado, Stewart e Walser (1980), baseados no aumento dos níveis de aspartato e citrulina na urina de ratos tratados com MMA, concluíram que o MMA pode exercer efeito inibitório sobre a argininosuccinato sintase. Foi também sugerido que a deficiência do substrato acetil-CoA ou a inibição competitiva da N-acetilglutamato sintase por propionil-CoA levaria à diminuição da síntese de N-acetilglutamato e, conseqüentemente, ao aumento dos níveis plasmáticos de amônia (Lehnert et al., 1994; Bergman et al., 1996; Fenton et al., 2001).

Deve-se finalmente enfatizar que a fisiopatogenia da disfunção neurológica presente nos pacientes com acidemia metilmalônica ainda não está

completamente esclarecida.

1.1.6.5 - Tratamento para a acidemia metilmalônica

O tratamento dos pacientes afetados pela acidemia metilmalônica deve ser introduzido o mais precocemente possível para evitar ou diminuir o dano neurológico nos mesmos.

Os indivíduos afetados por acidemia metilmalônica devem restringir a alimentação proteica e utilizar alimentos pobres em metionina, isoleucina, treonina e valina, aminoácidos precursores da propionil-CoA (Thomas, 1994). A adição de L-carnitina (100 - 200 mg/kg/d) à dieta é bastante útil, pois esta se liga ao propionato e a propionil-CoA através da carnitina acetiltransferase, formando propionilcarnitina, liberando a CoA para o metabolismo celular e sendo excretada na urina (Bohmer e Bremer, 1968). Desta forma, a suplementação de L-carnitina, por um lado facilita a excreção dos produtos acumulados reconhecidamente tóxicos para as funções mitocondriais e por outro, previne o déficit de carnitina e coenzima A (Gregersen, 1981).

Por outro lado, os pacientes com acidemia metilmalônica dos tipos Cbl A e Cbl B melhoram clinicamente e laboratorialmente com a suplementação de vitamina B12.

Medidas de urgência também devem ser instituídas quando em vigência de crise metabólica. O catabolismo deve ser evitado para diminuir a formação de propionil-CoA com alimentação parenteral com soro glicosado, correção dos eletrólitos e pH e remoção da amônia feita através da administração de benzoato de sódio. Finalmente, os metabólitos tóxicos devem ser eliminados através da diálise peritoneal, hemodiálise ou transfusão. A hidratação e a administração de altas doses de vitamina B12, 5 mg/Kg/d, também devem ser feitas durante as crises metabólicas (Thomas, 1994).

Enfatize-se que, mesmo em pacientes com acidemia metilmalônica tratados “adequadamente” desde o período neonatal é possível detectar-se um variável comprometimento da cognição.

1.1.6.6 - Modelos Animais de acidemia metilmalônica

A utilização de modelos animais que simulem uma patologia no homem facilita o estudo da fisiopatologia de várias doenças, incluindo os erros inatos do metabolismo. Estes modelos permitem abordagens impossíveis de serem realizadas com seres humanos, além de permitir a separação dos diversos fatores causadores da doença (Lo, 1996). Deve-se, entretanto, salientar que nenhum modelo animal pode mimetizar completamente uma doença, mas auxilia muito na compreensão de sua fisiopatogenia.

Um modelo agudo para a acidemia metilmalônica foi proposto por Patel e colaboradores (1976), no qual ratos com uma semana de vida recebiam três injeções intraperitoniais de MA, com duas horas de intervalo entre as aplicações. O grupo controle, mantido sob as mesmas condições, recebia injeções de solução salina (NaCl 0,9%). O modelo, embora satisfatório em mimetizar a doença para os fins propostos, causou a morte de 10% dos animais do grupo experimental, provavelmente devido à administração de altas concentrações de ácido metilmalônico.

Um modelo experimental crônico de acidemia metilmalônica baseado na restrição de vitamina B₁₂ foi descrito e utilizado por vários pesquisadores (Barness et al., 1963; Orlando et al., 1973). Este modelo, no entanto, foi abandonado, pois causava anemia megaloblástica nos animais, um sintoma ausente nos pacientes com as formas clássicas de acidemia metilmalônica (Orlando et al., 1973).

Dutra e colaboradores (1991) propuseram um modelo crônico de acidemia metilmalônica que consistia na administração de MMA através de injeções subcutâneas de MMA, duas vezes ao dia, do 5º ao 28º dia de vida, mimetizando os dois principais picos pós-prandiais de MMA encontrados nos pacientes com esta acidemia. As concentrações plasmáticas e cerebrais de MMA provocadas por este modelo foram de, respectivamente, 2,0-2,5 mM e 0,8-1,0 µmol/g (equivalente a 1 mM).

Por outro lado, foram realizados estudos comportamentais utilizando este modelo, observando-se um déficit permanente de aprendizagem e/ou memória e do desenvolvimento neuromotor causado pela administração crônica do ácido (Dutra et al., 1991; Mello et al., 1994). A utilização desse modelo no estudo do comportamento de ratos no labirinto aquático de Morris apontou um déficit de aquisição de um novo paradigma de localização espacial nos animais testados, o que indica comportamento perseverativo (Pettenuzzo et al., 2003). Além disso, o tratamento crônico com ácido ascórbico preveniu as alterações de comportamento provocadas pelo MMA.

Outro modelo baseado na injeção intraestriatal de MMA em ratos adultos foi utilizado para estudar o comportamento desses animais (de Mello et al., 1996). Neste estudo observou-se que a administração de MMA induziu ao aparecimento de comportamento rotacional e de convulsões clônicas de forma dose-dependente, e que estas alterações foram prevenidas pela administração de MK-801 e atenuadas pela administração de succinato. O uso desse modelo posteriormente mostrou que antioxidantes reduzem o comportamento convulsivante de ratos que receberam injeção de MMA em seu estriado (Figuera et al., 2003).

1.2 - O CONCEITO DE MEMÓRIA

Todos os seres vivos buscam adaptar-se ao mundo para sua sobrevivência, aprendendo, através da experiência, as estratégias adequadas de ação. Este aprendizado é característica filogenética do organismo e desenvolve-se ao longo da evolução do mesmo.

Denomina-se *memória* o armazenamento e a evocação, ou de suas consequências, e *aprendizado* a aquisição da informação através da experiência (Izquierdo, 1989). Poderíamos dizer ainda, que a memória é o traço duradouro deixado por uma experiência de comportamento no cérebro de um animal (Quillfeldt, 1994). Não há portanto memória sem aprendizado e não há aprendizado sem experiências. Aristóteles dizia, há 2000 anos: “não há nada no intelecto que não tenha estado previamente nos sentidos”.

O *traço de memória*, ou a coleção de modificações neurais representando a memória, é comumente conhecido como *engrama*, conforme denominação dada pelo biólogo alemão Richard Semon, no começo do século XX (Schacter, 1982). Um dos maiores focos de investigação contemporânea tem sido a identificação e a localização destes engramas no cérebro.

Embora várias analogias tenham sido feitas para fundamentar os modelos que descrevem o processamento da memória, a análise fenomenológica (comportamentos observáveis emitidos antes e depois das experiências novas) tem sido a ferramenta de trabalho mais promissora para a interpretação dos processos mnemônicos (Gold e McGaugh, 1975; Izquierdo et al., 1982).

1.2.1 - Fases da Memória

Ao adotarmos uma abordagem fenomenológica do estudo dos processos da memória existe a expectativa de que esta nos auxiliará a desvendar a natureza do engrama. Este processo ocorreria em duas instâncias: *formação e evocação*. A formação de memórias incluiria três fases bem definidas: a *aquisição*, período que se dá durante a exposição à experiência; a *consolidação*, período em que o traço mnemônico é

relativamente instável e, portanto, suscetível à modificações/modulações; o *armazenamento*, onde ocorre a real internalização do traço.

A *evocação* corresponde, por conseguinte, à forma que nos permite avaliar a memória: nos animais ela é observada através da reincidência de modificações de comportamentos estereotipados; no homem pode se estender ao reconhecimento de pessoas, palavras, lugares, etc. (Izquierdo, 1989).

É durante a *consolidação* da memória que aparece a seleção do que será ou não memorizado, além da “adição” e da “associação” de experiências novas ou passadas (McGaugh, 1966; McGaugh e Herz, 1972). Sabemos que, nesta fase, estão envolvidos o hipocampo e a amígdala (Schütz e Izquierdo, 1979; Mishkin et al., 1984; Markowitsch e Pritzel, 1985; McGaugh, 1988). Além disso, a aquisição, a consolidação e o armazenamento utilizam diferentes mecanismos e diferentes áreas do sistema nervoso central (Squire, 1987; Asanuma e Keller, 1991; Thompson, 1991; Izquierdo, 1992).

Devemos ter em mente que a formação de memórias não é um evento instantâneo, mas, ao contrário, um processo dependente do tempo. Portanto, a discussão dos experimentos realizados será fundamentada também segundo a seguinte cadeia de eventos:

aquisição \Rightarrow consolidação/armazenamento \Rightarrow evocação

1.2.2 - Medição da Memória

Não se pode medir o aprendizado ou a memória diretamente. A avaliação da memória é possível apenas ao medirmos a sua evocação, assumindo, com isto, que a evocação é função da memória, e esta, do aprendizado. A evocação depende da intensidade do traço de memória estabelecido e a intensidade deste, consequentemente, é função da intensidade da experiência durante a aquisição (Quillfeldt, 1994).

Visto que nos animais somente podemos demonstrar a aquisição de experiências através de alguma alteração de comportamento, observável/quantificável,

os experimentos sobre memória e aprendizado são feitos empregando-se tarefas de 2 tipos, (1) aquisição de comportamentos não naturais ou (2) supressão de respostas inatas, pois são de mais fácil quantificação (Izquierdo, 1989, 1989a).

1.2.2.1 – Como e o quê pode ser obtido com o resultado das medições de comportamento

Determinadas situações padronizadas de aprendizado, chamadas de *tarefas de comportamento*, são utilizadas para a medição da memória e, nestas, quantificam-se determinados aspectos motores do comportamento do animal (respostas de esquiva, de orientação, de exploração, mobilidade, etc.). As tarefas são realizadas em ambiente controlado, como caixas de condicionamento e labirintos. Na primeira exposição à tarefa, a qual chamamos de *sessão de treino*, ocorre a *aquisição* do comportamento. Após um certo intervalo de tempo (horas, dias, etc.), é realizada a *sessão de teste* (onde novamente serão medidos os aspectos motores do comportamento do animal).

Certas diferenças aparecerão entre as sessões de treino e de teste, na quantificação do aspecto motor estudado. Podemos dizer, então, que “aprender” a tarefa ou “memorizá-la” passa por adquirir uma resposta ou suprimi-la (aumentar ou diminuir a ocorrência de um determinado comportamento motor em relação ao ocorrido na sessão de treino).

Tendo em vista o momento da aplicação de um determinado tratamento farmacológico, por exemplo, e relacionando-o com as sessões da tarefa, podemos ter algumas restrições nas interpretações dos resultados gerados. A aplicação destes fármacos (local ou sistêmica) pode ser realizada em qualquer um dos três tempos: pré-treino, pós-treino ou pré-teste.

Os tratamentos pré-treino podem representar dificuldade de interpretação em termos de memória (McGaugh, 1966, 1969; McGaugh e Herz, 1972; Gold e McGaugh, 1975; Gold e Zornetzer, 1983; Izquierdo 1989b). Entretanto, realizando experimentos-controle adequadamente desenhados, podemos avaliar a extensão de fatores extracognitivos, como possíveis alterações motoras, de motivação e/ou

sensoriais decorrentes do tratamento, e, “descontando-os”, podemos avaliar a performance de memória de forma mais confiável (McGaugh e Herz, 1972; Overton, 1974; Gold & McGaugh, 1975; Izquierdo, 1984).

O tratamento farmacológico pós-treino, por sua vez, é amplamente utilizado na *neurofarmacologia da memória* e permite avaliar o efeito destas substâncias especificamente sobre a fase da *consolidação*, atuando tanto nos sistemas moduladores como nos sistemas efetores de memória, pois neste tempo, a aquisição já se deu (McGaugh, 1966; Gold e McGaugh, 1978; Izquierdo e Medina, 1991).

O tratamento pré-teste permite estudar os sistemas envolvidos na evocação de memórias previamente consolidadas (Carrasco, 1983). Neste tratamento também devemos levar em consideração os efeitos motores, de motivação e/ou sensoriais que poderiam mascarar a evocação (McGaugh e Herz, 1972; Overton, 1974; Izquierdo, 1984; Quillfeldt, 1994).

1.2.3 - Tarefas de Comportamento

1.2.3.1 - A aprendizagem da Esquiva

Testes de esquiva têm sido amplamente empregados em pesquisas sobre as bases neurofisiológicas da memória em animais de laboratório. A resposta de esquiva pode envolver pressionar uma barra, correr em uma roda, correr de um compartimento a outro de uma caixa, pular para uma plataforma, transpor um obstáculo que separa dois compartimentos de uma caixa, descer correndo uma pista e inibir uma resposta de entrar num compartimento ou descer de uma plataforma.

Dentre a ampla gama de aparelhos possíveis para o estudo da esquiva, quatro têm sido mais amplamente utilizados (Sahgal e Mason, 1985; Netto et al., 1989; Fernandez-Teruel et al., 1991; Ichihara et al., 1992; Yoshimi e Iwata, 1995; Zhang et al., 1994; Xavier, 1999):

- Esquiva passiva (ou inibitória) *step-down* – esse tipo de teste é realizado em uma caixa composta por uma plataforma estreita localizada meia polegada acima e paralela a um piso de metal. Durante a fase de treinamento, o animal é colocado na plataforma e observado por um tempo determinado. Cada vez que o animal desce da plataforma para o assoalho, recebe um choque nas patas. Em seguida inicia-se a fase de teste, na qual utiliza-se o mesmo procedimento descrito para a fase de treino. O tempo que o animal leva para descer da plataforma ao assoalho é registrado e o aprendizado é aferido em função dessa latência. Uma média do número de tentativas necessárias para que os animais inibam completamente o seu comportamento de descer da plataforma pode ser calculada e é tomada como índice de aquisição da tarefa.
- Esquiva passiva *step-through* – esse teste é realizado em uma caixa composta por um pequeno compartimento intensamente iluminado, o qual se liga por uma porta a um compartimento escuro com assoalho de barras metálicas. A sessão de treino consiste em colocar o animal no compartimento iluminado; quando ele adentra o compartimento escuro recebe choque nas patas até que escape de volta para o compartimento iluminado. O teste de retenção é realizado a intervalos de tempos variáveis, geralmente 24 horas após o treino. Nesse caso, o animal é colocado novamente na câmara clara e a latência para entrar na câmara escura é registrada. Estabelece-se um tempo máximo, usualmente 150, 300 ou 600s; caso o animal não entre no compartimento escuro durante esse tempo, ele é levado de volta para sua gaiola e atribui-se esse valor de latência indicativo de que houve aquisição da tarefa.
- Esquiva ativa em uma caixa de Skinner (*lever press box*) – para esse teste utiliza-se uma caixa contendo uma barra em uma das quatro paredes e um emissor do estímulo condicionado (luz ou som). Para cada tentativa de treinamento, uma luz ou som apresentado durante tempo determinado (período de alerta) é seguido por um choque que deixa de ser liberado quando o animal pressiona a barra. Na fase de teste, coloca-se o animal no aparelho e anota-se o tempo de demora do animal para pressionar a barra após a emissão do estímulo de alerta. O número de

pressões exercidas na barra não está relacionado à resposta de esquiva e pode ser anotado como resposta espontânea.

- Esquiva ativa em uma *shuttle box* – no procedimento de esquiva ativa o animal é treinado a mudar de compartimento dentro de uma caixa para evitar a punição, a qual geralmente caracteriza-se por um choque nas patas. A caixa é dividida em dois compartimentos com as grades do assoalho eletrificadas, separadas por uma porta em forma de guilhotina ou por uma barreira transponível. No procedimento de esquiva ativa de uma via, o animal é colocado no compartimento “de punição” e, após um intervalo pré-fixado, o choque é liberado até que o animal se mova para o compartimento seguro. O choque não é dado quando o animal emite uma resposta de esquiva, isto é, quando o animal corre do compartimento de punição para o compartimento seguro dentro de um intervalo de tempo. Geralmente 24 horas após o treinamento, os animais são submetidos ao teste de retenção, o qual consiste na colocação do animal no compartimento de punição e observação por um período determinado (usualmente, 180 s). A latência de entrada no compartimento escuro é aferida como índice de retenção da tarefa. No procedimento de esquiva ativa de duas vias, o choque é liberado após a apresentação de um estímulo condicionado, usualmente uma luz ou som, quando o animal deixa de escapar de um compartimento a outro durante a apresentação do estímulo condicionado. A resposta de cruzar de um compartimento a outro durante a liberação do choque interrompe a punição.

Comparações entre animais de linhagens, espécies, idades ou sexos diferentes têm lançado mão dessas variantes do teste de esquiva. Dentre os fatores que influenciam o desempenho dos animais em tarefas que envolvem o comportamento de esquiva pode-se destacar intensidade do choque e o tempo de sua aplicação, o intervalo de tempo entre o treino e o teste (usualmente 24 ou 48 horas), a pré-exposição ao aparelho antes do treino, o retardamento de punição e a idade e o sexo dos animais (Xavier, 1999).

As vantagens no uso do procedimento de esquiva, particularmente os de esquiva passiva, estão associadas à possibilidade de se especificar com rigor o tempo

decorrido entre a aprendizagem e a aplicação dos diversos tratamentos normalmente utilizados para interferir no processo de memória, além de sua execução demandar pouco tempo, o que permite a realização de grande quantidade de experimentos sem excessivo gasto de tempo. Há possibilidade de utilização desta técnica comportamental em pesquisas sobre a ação de fatores ambientais ou de drogas, entre outros fatores, na aprendizagem.

Embora seja inequívoca a utilidade do teste de esquiava como método comportamental em estudos de memória, particularmente em decorrência de sua praticidade, deve-se ser cauteloso em relação ao uso da latência no teste como medida direta da memória. De fato, esse tipo de preocupação vem aumentando em laboratórios que fazem uso intensivo desse tipo de teste comportamental; como consequência, outros testes de natureza não aversiva e que envolvem outros tipos de resposta vêm sendo empregados em associação com o teste de esquiava (Nagahara e McGaugh, 1992; Williams e McGaugh, 1994). Alternativamente, testes comportamentais cujos parâmetros expressam de forma mais assertiva a memória de animais poderiam ser empregados.

1.2.3.2 - O teste do Campo Aberto

1.2.3.2.1 - Atividade Exploratória em Animais

Embora seja ainda de difícil definição, o termo “atividade exploratória” é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas ao comportamento animal. Num sentido geral, refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não só as respostas reflexas atencionais imediatas, como também as respostas voluntárias típicas. Essas atividades já foram anteriormente descritas como exploração passiva e ativa, respectivamente, e equivalem aos comportamentos inespectivos e inquisitivos descritos por Berlyne (1960, apud Birke e Archer, 1983).

No rato de laboratório, os comportamentos que levam a uma ampliação das informações obtidas pelo animal incluem correr em círculos, cheirar (*sniffing*), levantar-se nas patas posteriores (*rearing*), movimentar as vibrissas, direcionar-se para

um estímulo particular, entre outros. Outras espécies podem manipular ou até mesmo levar objetos à boca (Thinus-Blanc et al., 1987). Estudos psicológicos de atividade exploratória em animais têm se baseado na exposição do animal a uma alteração ambiental discreta e localizada ou no confinamento a um ambiente nunca experimentado anteriormente.

No último caso, o novo ambiente pode ser um labirinto, um campo aberto ou outro tipo de aparelhagem. A adoção desse tipo de teste apresenta uma clara conveniência pela facilidade de registro comportamental, quando comparado ao estudo no ambiente natural. O pressuposto básico envolvido em estudos de confinamento em um novo ambiente é que, no intuito de explorar o ambiente, o animal precisa locomover-se nele. Dessa forma, a quantidade de movimento passa a ser um indicador de atividade exploratória. Tipicamente, a taxa de ambulação, que envolve andar e correr, é mensurada através da contagem do número de secções do ambiente que são transpassadas pelo animal (por exemplo, setores do assoalho de um campo aberto ou braços de um labirinto). Esse tem sido um dos parâmetros mais utilizados possivelmente devido à sua fácil mensuração.

A resposta exploratória de levantar-se nas patas traseiras (*rearing*) é também muito comum em roedores e tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade desde que proposto por Lat (1963, apud Birke e Archer, 1983), uma vez que esse comportamento frequentemente se correlaciona com outras atividades como auto limpeza corporal (*grooming*), defesa e reações sexuais. A aferição desse tipo de resposta é bastante simples, sendo necessário apenas o uso de um cronômetro para que se registre o número de vezes que o comportamento ocorre e o seu tempo de duração.

Quando o animal executa esta atividade exploratória o seu objetivo é aumentar o seu campo de visão para perceber o ambiente que o cerca de forma mais eficiente, visando a sua maior segurança e melhor compreensão do espaço em que se encontra. Por isso, esta medida é tomada como um índice de memória na tarefa de habituação ao campo aberto. Entre as sessões (treino e teste) o animal tende a reduzir o número de eventos de exploração vertical (*rearings*), o que demonstra que o animal já percebe com mais clareza o seu ambiente e encontra-se melhor orientado devido a exposição repetida ao aparato de teste que lhe é apresentado.

1.2.3.2.2 - Procedimentos Básicos do Campo Aberto

Em essência, o teste consiste na mensuração dos comportamentos elicitados pela colocação do sujeito experimental em um espaço novo e aberto do qual a fuga é prevenida por uma parede circundante. O desencadeamento desses comportamentos é dependente da interação do animal com uma variedade de fatores do teste, tais como: (a) estimulação como resultado da remoção do animal de um ambiente familiar; (b) estimulação envolvida na transferência do animal para o campo aberto; (c) exposição ao ambiente de teste, que é constituído pelo campo aberto e seus arredores e (d) toda a experiência prévia com a situação de teste; ou seja, também é possível mensurar habituação e aprendizado no campo aberto. A seguir podemos ver os principais parâmetros comportamentais passíveis de mensuração no teste do campo aberto (Adaptado de Walsh e Cummins, 1976):

1) *Movimentação corpórea total*

i) *Tipo de Movimento*

- (a) distância percorrida num determinado período de tempo
- (b) tempo dispendido na ambulação
- (c) frequência de comportamento de levantar-se (*rearing*)
- (d) tentativas de fuga
- (e) latência – tempo para sair do ponto de partida
- (f) tempo dispendido sem movimento (*freezing*)

ii) *Localizações*

- (a) área visitada do campo (região periférica ou central)
- (b) interação com estímulos

2) *Movimentação corpórea parcial*

- (a) manipulação de objetos
- (b) cheirar
- (c) coçar
- (d) escavar
- (e) ranger os dentes
- (f) limpeza (*grooming*)
- (g) vocalização
- (h) exploração visual

Resumidamente, no teste de campo aberto coloca-se o animal numa arena durante um tempo pré-determinado. Desenhando-se setores de tamanho aproximado correspondente ao comprimento do animal no assoalho do aparelho, é possível quantificar a atividade do animal a partir da contagem do número de setores adentrados pelo animal num intervalo de tempo. O registro pode ser manual (o experimentador tem em mãos uma folha quadriculada numerada que reproduz exatamente o trajeto que o animal percorre) ou feita a partir de programas computacionais associados a uma filmadora que capta a trajetória do animal. A defecação pode facilmente ser quantificada pelo número de bolotas fecais despejadas pelo animal durante uma sessão experimental, contadas ao final da sessão. Os tempos ou o número de eventos de imobilidade (*freezing*), autolimpeza (*grooming*) e comportamento de levantar-se nas patas posteriores (*rearing*) podem ser obtidos a partir de registro em um cronômetro manual simples ou por contagem direta.

1.2.4 - Memória e Hipocampo

A memória não é um processo unitário, além disto compreende um certo número de processos ou estágios: aquisição, consolidação e evocação. Aprender com a experiência, que é, lembrar eventos que aconteceram no passado em momentos decisivos, representa provavelmente uma das estratégias adaptativas de maior sucesso. Desta forma, lembrar eventos passados é um fator determinante de estratégias de sobrevivência em todas as espécies, sendo de importância capital na determinação de nossa singularidade como indivíduos.

Vários trabalhos que estudam lesões em animais (Moser e Moser, 1998; Zola e Squire, 2001) e pacientes (Rempel-Clower et al., 1996; Teng e Squire, 1999) e estudos com modelos transgênicos (Bourtchuladze, 1994; Minichiello et al., 1999) sugerem que a formação hipocampal mantém um papel crucial em vários tipos de memória. Já está bem estabelecido que o hipocampo recebe informação do córtex entorrinal e está conectado através deste a amígdala e a outras áreas corticais. Algumas destas áreas também estão envolvidas no processamento de memórias (Izquierdo e Medina, 1997; Setlow et al., 2000; Wilensky et al., 2000; Goosens e Maren, 2001).

Em ratos, a consolidação da memória de longa duração em uma tarefa de esQUIVA inibitória é bloqueada pelos antagonistas de receptores glutamatérgicos dos tipos NMDA e AMPA que são infundidos na região CA1 do hipocampo dorsal logo após o treino e está associada com um aumento rápido no número total de sítios de ligação [(3)H]AMPA (Cammarota et al., 2004). O aumento [(3)H]AMPA induzido pelo aprendizado é acompanhado pela translocação de subunidades GluR1 de receptores AMPA para o terminal pós-sináptico junto com sua fosforilação no sítio Ser831. Em adição, o aprendizado da tarefa motivada pelo medo induz a ativação da translocação de receptores CaMKII dependentes para a densidade pós-sináptica. A inibição desta proteína quinase tanto quanto o bloqueio de receptores NMDA extingue a translocação induzida pelo aprendizado dos receptores GluR1 bem como sua fosforilação (Cammarota et al., 2004).

De forma similar, a evocação da memória requer a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA/kainato (Szapiro et al., 2000; Riedel et al., 1999). Além disso, o bloqueio de receptores glutamatérgicos metabotrópicos impede a evocação de memórias aversivas contextuais (Schulz et al., 2001; Szapiro et al., 2000). Em contraste, a administração pré-teste de antagonistas de receptores NMDA, nas doses que bloqueiam a formação de memória (utilizando-se duas tarefas comportamentais distintas) quando administradas ao tempo do treino, (Izquierdo et al, 1997; Steele e Moris, 1999) não alteram a evocação da memória.

Várias proteínas quinases já estão relacionadas como participantes na evocação de memória. Entre elas podemos citar a proteína quinase C, a MAP quinase e a proteína quinase A. Por outro lado, a detecção da novidade espacial é associada com uma ativação sequencial da proteína quinase A, das quinases reguladas por sinais extracelulares, da Ca²⁺-calmodulina quinase e também à fosforilação da proteína responsiva ao AMPc (CREB) no hipocampo (Vianna et al., 2000).

Estes últimos achados sugerem que a formação de memórias espaciais depende de uma integridade dos receptores glutamatérgicos dos tipos NMDA e AMPA e da atividade da CaMKII na região CA1 do hipocampo e que a detecção da novidade espacial é acompanhada pela ativação de ao menos três diferentes cascatas de sinalização que utilizam proteínas quinase hipocámpais distintas. Conclui-se que alguns

dos mecanismos no hipocampo responsáveis pela retenção de tarefas de aprendizado dependentes do hipocampo são similares às aquelas que envolvem a formação de memória. Entretanto, outros mecanismos cruciais para a codificação ou consolidação de memórias de longa duração, como receptores NMDA e a CaMKII, não são necessários para a evocação (Szapiro et al., 2002).

Análises atuais da atividade neuronal em Rodentios mostraram que não é somente a informação espacial que é representada no hipocampo, mas também informações adicionais, como por exemplo a velocidade do movimento, a direção do movimento, detecções tipo “match / non-match to samples”, identificação olfatorial, e outras. Além disto, foi encontrado que certas lesões seletivas do hipocampo nestes modelos animais bloqueiam a navegação espacial e a formação de memória de forma moderada. Somente lesões simultâneas de algumas áreas corticais em conjunto com a formação hipocampal puderam reproduzir os bloqueios e sintomas que foram descritos em casos que se imaginava serem decorrentes de lesões estritamente hipocampais. É proposto que o processamento da informação e a formação da memória se deve a várias áreas cerebrais que atuam como um sistema funcional e que o hipocampo é parte deste sistema e desempenha um papel de suporte na associação de um complexo multimodal da informação delineando novos traços de memória. Por último, o conceito de funções específicas alocadas (como o desenvolvimento de um mapa cognitivo) exclusivamente no hipocampo não encontraria suporte (Holscher, 2003).

1.2.5 - Sistemas Moduladores da Memória

A neuromodulação, a interação entre dois mensageiros químicos no sistema nervoso, pode estar envolvida nos mecanismos pelo qual a associação bioquímica pode ocorrer. Uma hipótese simples, ainda que convincente, é de que os critérios para a expressão do aprendizado associativo e da memória são alcançados por eventos bioquímicos que são associativos por natureza. Os sistemas de neurotransmissores e neuromoduladores, centrais ou periféricos, envolvidos na expressão dos efeitos do condicionamento de comportamentos, ou de tratamentos farmacológicos administrados pré e pós-treino ou antes do teste (isto é, nos efeitos sobre a formação ou evocação da memória), seriam denominados, segundo esta ótica, de sistemas moduladores de memória (Quillfeldt, 1994). A manipulação destes sistemas

apresenta extrema relevância clínica e terapêutica, pois seus resultados são concernentes às etapas do processo da memória sensíveis à ação de fármacos e outros fatores externos (Izquierdo, 1989b).

Os sistemas mediados por catecolaminas (como a adrenalina e a noradrenalina) eram, até pouco tempo, um dos mais estudados em memória, tanto em seu papel na resposta de adaptação ao estresse quanto em outras situações (Izquierdo e Dias, 1983; Gold, 1984; McGaugh et al., 1984; McEwen et al., 1995; McEwen e Sapolsky, 1995; Meaney et al., 1995; de Quervain et al., 1998).

Os neuropeptídeos, como a β -endorfina (Izquierdo, 1979, 1980, 1982a, 1982b e 1984) e outros, têm importante envolvimento nos processos de memória (de Wied e Van Ree, 1982; Introini-Collison e Baratti, 1986; Altman e Normile, 1988; McGaugh et al., 1993; Kovacs e de Wied, 1994; Mosimann et al., 1996; Quirarte et al., 1998) sendo bastante estudados, onde os peptídeos opióides parecem ter uma função regulatória do sistema adrenérgico (McGaugh e Cahill, 1997).

O sistema colinérgico é um dos mais estudados em termos do seu envolvimento na consolidação de memórias (Overstreet, 1984; Hasselmo et al., 1992; Jerusalinsky et al., 1994; Blokland, 1995; Baxter et al., 1999).

Além destes sistemas, outros têm papel importante, como as benzodiazepinas (Thiebot, 1985; Izquierdo e Medina, 1991; Kóvacs e de Vied, 1994), a adenosina (Ambrosio et al., 1997), a espermina (Eterovic et al., 1997) e os canabinóides (Shen e Thayer, 1998). Todos estes sistemas podem agir de forma individual ou interativa.

A tentativa de explicar a formação efetiva dos traços de memória só encontrou algum sucesso com o estudo dos mecanismos sinápticos de plasticidade neural, de onde se destacam os trabalhos com os sistemas associados aos aminoácidos; tanto os de caráter excitatório, como o Glutamato (Morri et al., 1986; Izquierdo, 1991; Advokat e Pellegrin, 1992; Davis et al., 1994; Izquierdo et al., 1992; Quillfeldt et al., 1994; Aigner, 1995; Fedele e Raiteri, 1999), quanto os de caráter inibitório, como o GABA – ácido gama-aminobutírico (McGaugh et al., 1984; Brioni e McGaugh, 1988; Castellano e Pavone, 1988; McGaugh, 1988, 1989^a, b; Izquierdo et al., 1990, 1991;

Izquierdo e Medina, 1991; Jerusalinski et al., 1994; Clements e Bourne, 1996; Salinas e McGaugh, 1996; Sirvio et al., 1996; Zarrindast et al., 1998).

1.3 - O SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

A maior parte da transmissão sináptica excitatória do cérebro é mediada pelos aminoácidos glutamato, aspartato e outros análogos estruturais (Dingledine e Mc Bain, 1999). Sabe-se, ainda, que as vias glutamatérgicas estão envolvidas em processos tão diversos, quanto importantes: epilepsia, lesões isquêmicas, sinaptogênese, ontogenia normal, aprendizado e envelhecimento (ibidem). A partir da década de 80, com o advento das técnicas de biologia molecular, que permitiram a clonagem e o sequenciamento dos receptores destes aminoácidos, o estudo da neuroquímica e neurofarmacologia desses receptores passa a receber maior atenção dos neurocientistas.

O glutamato e o aspartato podem ser considerados como neurotransmissores canônicos e não apenas putativos (Cooper et al., 1986; Dingledine e McBain, 1999), pois, além de serem os neurotransmissores mais prováveis de receptores excitatórios de aminoácidos, apresentam uma extensa distribuição em todos os tipos de neurônios. Ambos estão presentes em alta concentração no SNC e são liberados mediante estimulação elétrica, apresentam potente efeito excitatório e têm sistemas de recaptção de alta afinidade. Não bastassem estas características, ainda apresentam sítios de ligação seletivos facilmente demonstráveis por técnicas auto-radiográficas e farmacológicas (Cooper et al., 1986).

Entretanto, a demonstração de que o glutamato e o aspartato eram realmente neurotransmissores no SNC é bastante recente, pois é um composto também envolvido no metabolismo intermediário da maioria dos tecidos, inclusive do tecido neural, estando sua síntese e metabolismo compartimentados de uma forma bastante complexa. Estes aminoácidos não-essenciais, sintetizados a partir da glicose e outros precursores, além de apresentarem enzimas de síntese e degradação específicas, bem como transportadores próprios. O glutamato acumula-se em vesículas através de um processo dependente de Mg^{2+} e ATP em altas concentrações (Dingledine e McBain, 1999).

O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. O glutamato está envolvido em muitas funções importantes como plasticidade neural, desenvolvimento neural e neurodegeneração (Choi e Rothman, 1990; Nakanishi et al., 1998). Ele também está envolvido da memória e aprendizado (Ozawa et al., 1998), cognição, movimento e sensibilidade (Gasic e Hollmann, 1992). No entanto, a excessiva ativação dos receptores glutamatérgicos durante situações de estresse, como trauma crânio encefálico e ataques epiléticos, podem levar a morte neuronal. Neste contexto, muitos estudos relacionam a neurotoxicidade do glutamato à gênese de várias doenças neurodegenerativas (Rothman e Olney, 1987; Choi, 1988; Choi e Rothman, 1990; Meldrum e Garthwaite, 1990; Lipton e Rosenberg, 1994).

1.3.1 - Biossíntese do glutamato

O glutamato é um aminoácido não essencial e o mais abundante aminoácido livre no SNC. No terminal nervoso pode ser sintetizado a partir de intermediários do metabolismo da glicose, da cadeia carbonada de outros aminoácidos e de intermediários do ciclo de Krebs, por transaminação. Além dessas fontes, o glutamato pode ser formado diretamente a partir da glutamina. A glutamina é transportada para os terminais nervosos e então convertida nos neurônios a glutamato pela enzima glutaminase (Dingledine et al., 1994; Zigmond et al., 1999). Uma vez sintetizado, o glutamato é armazenado em altas concentrações (100 mM) em vesículas que se encontram no terminal pré-sináptico (Figura 1.6).

1.3.2 - Receptores glutamatérgicos

Os receptores glutamatérgicos mediam a maioria da neurotransmissão excitatória no cérebro, desempenhando, portanto, um papel fundamental na neurotransmissão cerebral. Existem dois tipos distintos de receptores glutamatérgicos: ionotrópicos e metabotrópicos (Nakanishi et al., 1998). Os receptores ionotrópicos são assim denominados por serem acoplados diretamente a canais iônicos na membrana. Os metabotrópicos pertencem a uma família de receptores acoplados à proteína G, cuja

modulação é feita por segundo-mensageiros intracelulares como o inositol trifosfato, o cálcio e os nucleotídeos cíclicos (Lipton e Rosenberg, 1994) (Tabela 1.3).

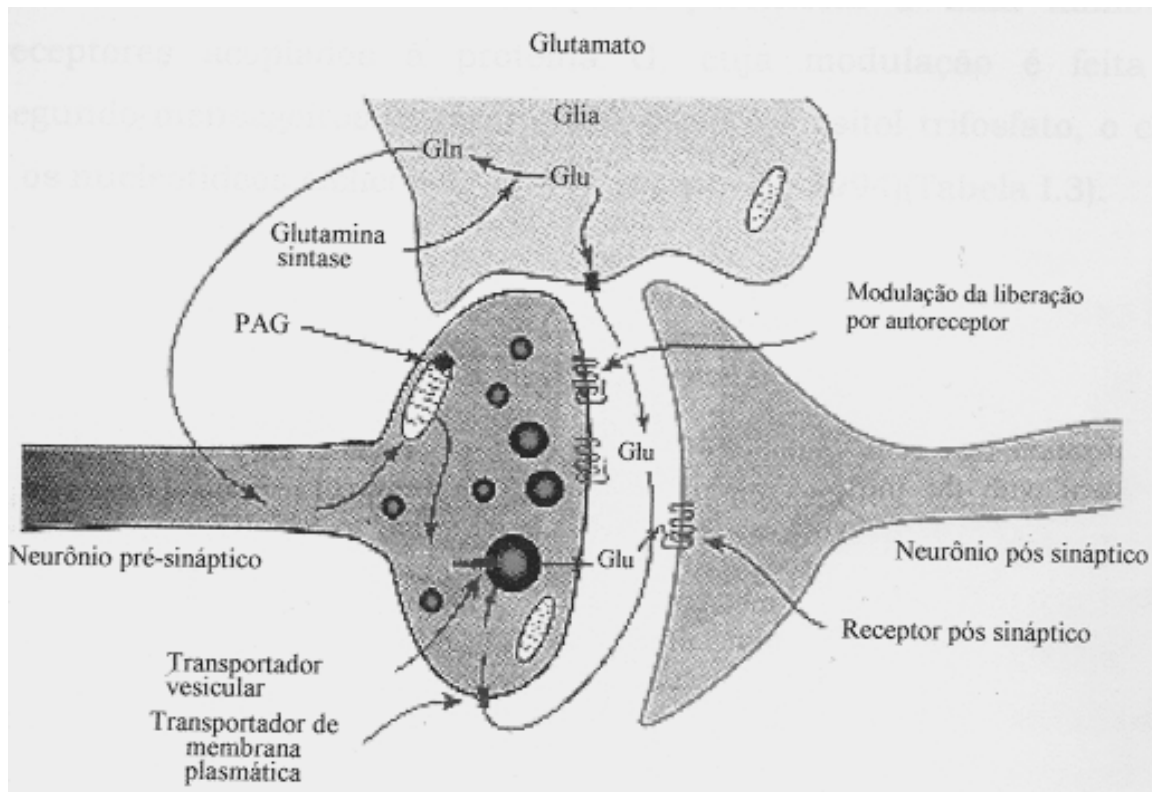


Figura 1.6 - Sinapse glutamatérgica: rotas de síntese, armazenamento em vesículas, liberação do terminal pré-sináptico, interação do neurotransmissor com o terminal pré-sináptico e remoção do glutamato da fenda sináptica por transportadores de membrana ou células gliais.

1.3.2.1- Receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluR)

Os iGluR podem ser divididos em três subtipos de receptores: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidoxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico (AMPA) e ácido caínico (KA) de acordo com a sensibilidade a estes agonistas. No entanto, nenhum agonista ou antagonista distingue claramente os receptores AMPA dos kainato e, por este motivo, eles são frequentemente denominados como receptores não-NMDA (Ozawa et al., 1998).

Os receptores NMDA são constituídos por três subunidades, uma representada por um simples gene (NMDAR1) e as outras por múltiplos genes (NMDAR2A-NMDAR2D, NMDAR3A) (Tabela 1.3). A subunidade composta por NMDAR1 é responsável pelas características farmacológicas dos receptores NMDA. Estes receptores apresentam seis sítios distintos de ligação para ligantes endógenos que influenciam distintamente na abertura do canal iônico (Figura 1.7). Este canal consiste de dois diferentes sítios de reconhecimento aos agonistas, um para o glutamato e outro para a glicina, e também um sítio regulatório de poliaminas, sendo todos responsáveis pela ativação do receptor. Além destes, apresenta sítios separados de reconhecimento para Mg^{2+} , Zn^{2+} e H^+ que inibem o fluxo iônico provocado pela ligação de agonistas dos receptores (Dingledine e McBain, 1999).

Os receptores do tipo NMDA, quando ativados, permitem o influxo de cálcio e de sódio. A superestimulação deste tipo de receptor é um dos mecanismos responsáveis pela sobrecarga de cálcio nos neurônios (Lipton e Rosenberg, 1994).

A ativação de receptores AMPA por glutamato é responsável pela maioria da neurotransmissão excitatória no SNC. Esta classe de receptores era denominada de “receptor quisqualato”, mas esta denominação caiu em desuso, pois o quisqualato pode ativar muitas classes de receptores, além dos AMPA. A ligação de glutamato ou AMPA ao receptor está associada com o influxo de Na^+ do espaço extracelular para o compartimento intracelular. Os receptores AMPA são permeáveis primariamente ao Na^+ , embora se têm demonstrado que alguns destes receptores são altamente permeáveis ao Ca^{2+} . A permeabilidade dos receptores AMPA ao Ca^{2+} e as diferenças nas propriedades funcionais destes receptores são determinadas pela composição da subunidade (Greenamyre e Porter, 1994; Ozawa et al., 1998). Os receptores Kainato são ativados pelo Kainato que é um análogo do glutamato cíclico que se liga com grande afinidade a este receptor. Os antagonistas do receptor AMPA geralmente em altas concentrações também antagonizam os receptores Kainato. As propriedades farmacológicas e fisiológicas deste tipo de receptor variam de acordo com a composição das subunidades (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e/ou KA2) do receptor individual (Greenamyre e Porter, 1994).

Tabela 1.3 - Subtipos de receptores, genes, agonistas e antagonistas glutamatérgicos.

<u>Receptores glutamatérgicos</u>				
Ionotrópicos				
Receptores	AMPA	Cainato	NMDA	Metabotrópicos
Produtos Genéticos	GluR1(A)	GluR5	NMDAR 1	MgluR1 (PI)
	GluR2 (B)	GluR6	A,B,C,E,F, G	MgluR5 (PI)
	GluR3(C)	GluR7	NMDAR2A	MGluR2 (cAMP)
	GluR4 (D)	GluR KA1	NMDAR2B	MGluR3 (cAMP)
		GluR KA2	NMDA2C	MGluR4 (cAMP)
			NMDA2D	MGluR6 (cAMP)
				MGluR7 (cAMP)
Agonistas	AMPA	Kainato	NMDA	1S, 3R-ACPD
	ATPA	Domoato	Ácido Quinolínico	DCCGIV L-AP3, L-AP4
Antagonistas	NBQX	NS 102	D-CPPene	AP3
	YM 900	GYKI 52466	CGS 19755	MCPG
	LY 293558	GYKI 53566	D-AP7	
	GYKI 52466		HÁ 966	
	GYKI 53566		MK-801	
			ADCI	
		Ifenprodil		
		Eliprodil		

Fonte: Meldrum, 1994.

1.3.2.2 - Receptores glutamatérgicos metabotrópicos

Até o momento, oito subtipos de receptores metabotrópicos foram clonados mGluR1-mGluR2 (Ozawa et al., 1998). Estes subtipos foram classificados em três grupos de acordo com a homologia da sequência de aminoácidos: grupo I (mGluR1 e mGluR5), grupo II (mGluR2 e mGluR3) e grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) (Ozawa et al., 1998) (Tabela 1.3).

Os receptores metabotrópicos estão acoplados a proteína G e a enzimas citoplasmáticas. Dependendo do subtipo de receptor e do tipo celular, estes receptores podem mediar o metabolismo do inositol fosfato, a liberação de ácido araquidônico ou influenciar os níveis de adenosina monofosfato cíclica (Tanabe et al., 1992).

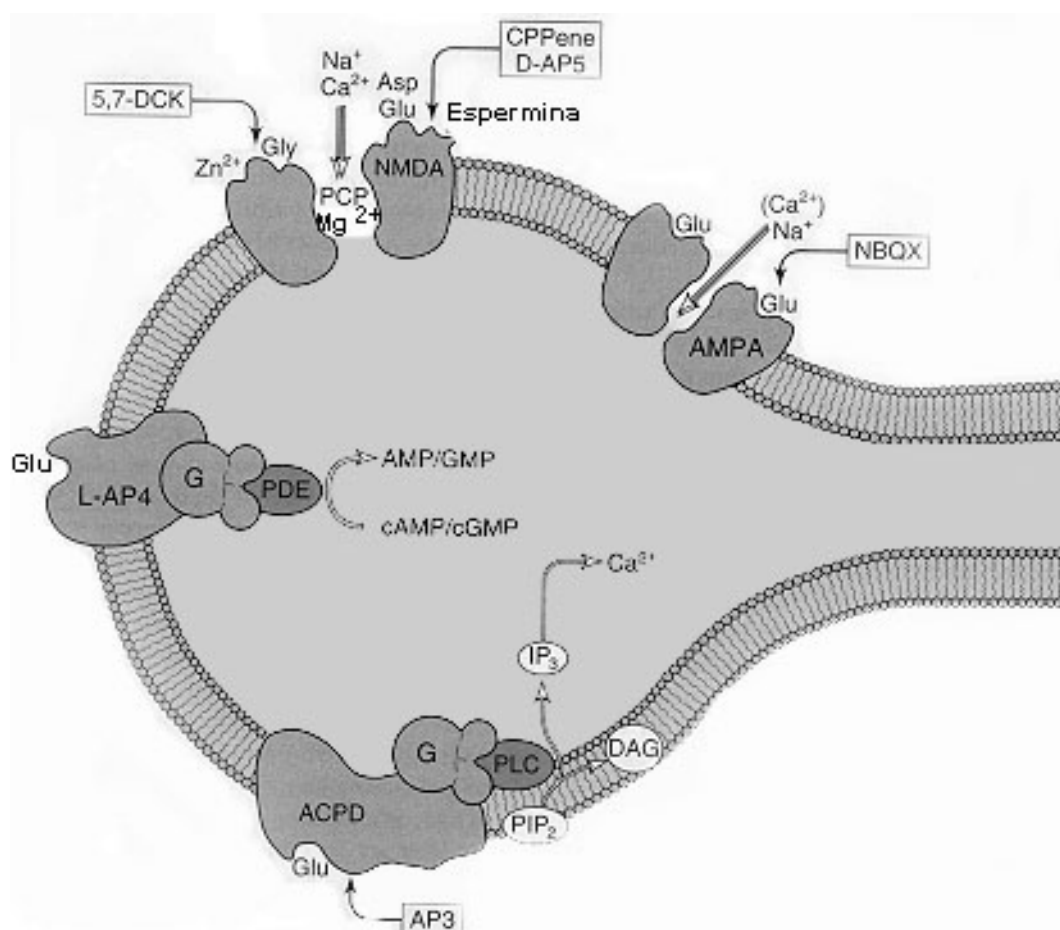


Figura 1.7 - Classes de receptores glutamatérgicos.

1.3.3 - Transportadores de glutamato

O glutamato é removido do espaço extracelular por sistemas de captação sódio-dependentes com alta afinidade e transportado para dentro dos astrócitos e neurônios através de transportadores. O sistema de captação do glutamato usa a energia derivada do gradiente de sódio para transportar o glutamato do espaço extracelular, presente em concentrações micromolares, para o interior das células onde atinge concentrações milimolares (Lipton e Rosenberg, 1994).

Três membros desta família de transportadores foram clonados: o transportador glutamato-aspartato (GLAST), o transportador-1 glutamato (GLT-1) e o carreador-1 de aminoácidos excitatórios (EAAC1). No SNC, os transportadores GLT1 e GLAST são expressos preferencialmente em células gliais. Em contraste, o transportador EAAC1 é expresso predominantemente em neurônios, principalmente no hipocampo, e está ausente nas células gliais. Estes transportadores sódio-dependentes não são dependentes de íons Cl^- . O transporte de glutamato é intensificado por uma elevada concentração intracelular de K^+ (Dingledine e McBain, 1999).

O papel principal dos transportadores de glutamato é diminuir as concentrações de glutamato e aspartato no espaço extracelular, evitando uma estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos (Rothstein et al., 1996).

Foi demonstrado em testes de estimulação elétrica *in vitro* que o glutamato é liberado das vesículas sinápticas de maneira Ca^{+2} -dependente. O glutamato é armazenado em vesículas sinápticas através de um transporte Mg^{2+} e ATP-dependente. Este mecanismo de captação é inibido por substâncias que destroem o gradiente eletroquímico (Dingledine e McBain, 1999). Após a despolarização do terminal pré-sináptico e a entrada de cálcio, ocorre a liberação do glutamato das vesículas para o meio extracelular (fenda sináptica), podendo assim agir como neurotransmissor ao estimular os seus receptores específicos.

1.3.4 - Excitotoxicidade relacionada ao glutamato

O glutamato e outros aminoácidos foram reconhecidos como neurotoxinas em 1970, pois causavam neurodegeneração aguda quando administrados oralmente a animais. Embora os mecanismos da neurodegeneração sejam complexos, foi verificado que a ativação dos receptores ionotrópicos é um passo importante neste processo degenerativo.

Demonstrou-se também que uma grande parcela da toxicidade associada com a ativação de receptores glutamatérgicos é resultado de uma excessiva elevação nos níveis intracelulares neuronais de Ca^{+2} (Rothman, 1992). O aumento do Ca^{+2} citoplasmático pode ativar diversas enzimas cálcio-dependentes, tais como a proteína quinase C, a fosfolipase A2, a fosfolipase C, a proteína quinase II dependente de Ca^{+2} /calmodulina, a óxido nítrico sintase e várias outras proteases e endonucleases. Uma inibição metabólica que prejudique a produção de ATP predispõe os neurônios a neurotoxicidade mediada pelo glutamato (Greene e Greenamyre, 1996).

Períodos de anóxia ou hipóxia importante que podem ocorrer durante acidente vascular cerebral ou parada cardíaca frequentemente resultam em neurotoxicidade. A falta de oxigênio resulta em depleção dos estoques de energia dentro dos neurônios e das células gliais, com concomitante acidose e liberação de radicais livres. O déficit energético afeta o metabolismo celular, as bombas iônicas energia-dependentes e a manutenção do potencial de ação. Consequentemente, a despolarização das células resulta em potenciais de ação e liberação do glutamato dos terminais pré-sinápticos terminais que ativam os receptores pós-sinápticos AMPA e NMDA. A entrada de Ca^{2+} nas células através dos receptores glutamatérgicos aumenta a concentração de Ca^{2+} intracelular e ativa uma cascata de segundos mensageiros. A incapacidade das células de manter o potencial de membrana leva finalmente à lesão ou morte neuronal (Dingledine e MacBain, 1999). Nos últimos anos tem-se observado que a ativação excessiva de receptores NMDA e não-NMDA pode contribuir para a degeneração neuronal excitotóxica em várias doenças neurológicas cuja etiologia até então era totalmente desconhecida (Lipton e Rosenberg, 1994).

Recentemente tem-se atribuído à excitotoxicidade um papel na patogênese de doenças neurodegenerativas como doença de Huntington, Alzheimer, Parkinson e na Esclerose Amiotrófica Lateral (EAL) (Greenamyre e Porter, 1994).

Finalmente, foi observado por vários pesquisadores que antagonistas dos receptores NMDA e não-NMDA atenuam os danos causados pelo glutamato *in vivo* em modelos animais ou *in vitro* de isquemia cerebral e hipoglicemia (Choi, 1988; Meldrum e Garthwaite, 1990), pelo trauma ao SNC (Faden et al., 1989; Lipton, 1993) e por insultos aos neurônios motores (Regan e Choi, 1991).

1.4 - OBJETIVOS

Tendo em vista que pacientes com doença do xarope do bordo e com acidemia metilmalônica apresentam um grau variável de atraso na cognição, o presente trabalho objetivou estudar:

- 1) a influência de concentrações altas no hipocampo de ratos adultos jovens (através da administração intrahipocampal) dos principais metabólitos ácidos acumulados nestas doenças sobre o comportamento cognitivo de ratos nas tarefas de campo aberto e da esQUIVA inibitória;
- 2) o efeito dos metabólitos ácidos acumulados na doença do xarope do bordo sobre a viabilidade de células neurais e sobre alguns parâmetros do sistema glutamatérgico em cérebro de ratos jovens

Os metabólitos estudados foram:

- Doença do Xarope do Bordo
 - CIC – ácido α -cetoisocapróico
 - CIV – ácido α -cetoisovalérico
 - CMV – ácido α -ceto- β -metilvalérico
 - HIC – ácido α -hidroxiiisocapróico
 - HIV – ácido α -hidroxiiisovalérico
 - HMV – ácido α -hidroxi- β -metilvalérico
- Acidemia Metilmalônica
 - MMA – ácido metilmalônico

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - MATERIAL

2.1.1 - Reagentes

- α -Tocoferol - Sigma
- Ácido α -ceto- β -metilvalérico (CMV) - Sigma
- Ácido α -cetoisocapróico (CIC) - Sigma
- Ácido α -cetoisovalérico (CIV) - Sigma
- Ácido α -hidroxi- β -metilvalérico (HNV) - Sigma
- Ácido α -hidroxiisocapróico (HIC) - Sigma
- Ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) - Sigma
- Ácido Ascórbico - Sigma
- Ácido Clorídrico (HCl) - Merck
- Ácido Glutâmico - Sigma
- Ácido metilmalônico (MMA) - Sigma
- Ácido Succínico - Sigma
- Albumina Bovina - Sigma
- Azul de metileno - Merck
- Bicarbonato de Sódio - Merck
- Brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) -Sigma
- Cloranfenicol (quemicetina succinato) - Schering-Plough
- Cloreto de Cálcio Dihidratado - Sigma
- Cloreto de Magnésio Hexahidratado - Sigma
- Cloreto de Potássio - Sigma
- Cloreto de sódio (NaCl) - Merck
- Cloridrato de Ketamina - Vetbrands
- Cloridrato de Xilasina - König
- Creatina Monohidratada - Sigma
- Dimetilsulfóxido - Nuclear
- Folin - JLC
- Formaldeído - Merck

- Fosfato de Potássio - Merck
- Fosfato de Sódio Heptahidratado - Quimibrás
- Glicose - Sigma
- Glutamato radiativo - Amersham
- Hidróxido de Sódio (NaOH) - Merck
- Kit DHL - Dole
- Líquido de Cintilação - Perkin Elmer
- MK-801 (maleato de dizocilpina) - RBI
- Sulfato de Cobre - InLab
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado - Merck
- Tartarato de Potássio - Merck
- Xilocaina - AstraZeneca

2.1.2 - Vidraria e outros materiais

- Acrílico autopolimerizante clássico - Jet
- Agulha Descartável 25 x 7mm - BD
- Agulhas gengivais - 30G - Gengibrás
- Beckers
- Eppendorffs
- Pinceis de Marta - Faber Castell
- Pipetas de Vidro 1 e 5 ml
- Pipetas Pasteur
- Placas Acrílicas 24 poços
- Placas de Petri
- Placas p/ teste Elisa
- Ponteiras Descartáveis - Axygen Scientific
- Resina acrílica auto polimerizável - Jet

2.1.3 - Equipamentos

- Agitador de tubos do tipo vórtex - Daigger
- Balança analítica modelo E42-B - Gilbertini
- Banho-Maria Modelo 1052 - Biomatic
- Cintilador - Walac
- Espectrofotômetro Genesys 8 - Spectronic
- Leitor de Placas – Tecan Spectra
- Mini motor de suspensão 15000 rpm - Bethil
- pHmetro TEC-2 - Tecnal

2.1.4 - Material Permanente

- Aparelho Estereotáxico - SPS Ltda
- Discos de corte (cutt-off) n° 23 - Pontas Schelbe
- Material cirúrgico (tesoura, bisturi, espátula)
- Paquímetro 6” / 150mm - Starret
- Seringa Hamilton 5µl e 10µl

2.1.5 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 30 e 60 dias de idade do Biotério do Departamento de Bioquímica do ICBS, UFRGS. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração comercial contendo 20,5% proteína (predominantemente de soja), 54% de carboidratos, 4% de lipídios, 4,5% de fibras, 7% cinzas e 10% de umidade. Eles foram mantidos em ciclo claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$.

Ratos de trinta dias de idade foram utilizados para os estudos de captação de glutamato e de medidas de viabilidade celular mediante as técnicas da desidrogenase

lática e do sal de metiltetrazólio. Ratos de sessenta dias de vida foram utilizados para os estudos comportamentais.

2.2 - MÉTODOS

2.2.1 - Preparação das fatias cerebrais para a medida da captação de L-[³H]glutamato e para os testes de viabilidade celular

Ratos Wistar de 30 dias de vida foram decapitados sem anestesia e seus cérebros imediatamente removidos e submergidos em solução de Hank, pH 7,2, com glicose (glicose HBSS), contendo 137 mM NaCl, 0,63 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 4,17 mM NaHCO₃, 5,36 mM KCl, 0,44 mM KH₂PO₄, 1,26 mM CaCl₂·2H₂O, 0,41 mM MgSO₄·7H₂O, 0,49 mM MgCl₂·6H₂O, e 1,11 mM de glicose. O córtex cerebral foi dissecado da área parietal e fatias de 0,4 mm de espessura foram obtidas usando um fatiador McIlwain. As fatias corticais foram lavadas em glicose HBSS e separadas com o auxílio de uma lupa. Às fatias consideradas controles, adicionaram-se 280 µL de glicose HBSS. Às fatias consideradas testes, adicionaram-se 260 µL de glicose HBSS e 20 µL dos ácidos a serem testados (CIC, CIV, CMV, HIC, HIV e HMV) nas concentrações finais de 0,01 a 1 mM. Para os testes de viabilidade celular foram utilizadas também fatias de hipocampo dorsal sob o mesmo procedimento citado acima.

Obs.: Nos testes de desidrogenase lática realizados com os α-hidroxiácidos foi utilizada somente a concentração de 1mM para a incubação dos ácidos.

2.2.2 - Captação de L-[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral

As fatias cerebrais foram pré-incubadas por 23 min na presença de um dos ácidos orgânicos a serem estudados. Após isto, a captação foi iniciada pela adição de 20 µL de solução 1,5mM de glutamato contendo 0,1 µCi de L-[³H]glutamato em glicose-HBSS. A incubação foi interrompida depois de 7 minutos por duas lavagens com 1 mL de glicose-HBSS gelada, imediatamente seguida pela adição de 300 µL de NaOH 0,5 N para destruir o tecido. Após um período de aproximadamente 24 horas, alíquotas do tecido lisado foram utilizadas para a determinação do conteúdo intracelular

de L-[³H]glutamato através de um contador de cintilação líquida (Wallac). A concentração de proteínas foi medida pelo método de Lowry (1951). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a média foi utilizada para os cálculos estatísticos.

2.2.3 - Ensaio de Viabilidade

Método do Sal de Tetrazólio (MTT): O ensaio de viabilidade foi realizado pelo método colorimétrico do brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Hansen et al., 1989). Este ensaio é baseado na redução mitocondrial de MTT- (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) a sais de formazam que deixam a célula. Fatias de córtex (em triplicata) e hipocampo (em duplicata) de ratos de 30 dias de idade foram dispostas em placas acrílicas de 24 poços sobre tampão HBSS e pré-incubadas a 35°C em atmosfera contendo mistura carbogênica por 3h. Os ensaios foram realizados na presença ou ausência de 0,01-1,0mM de CIC, CIV, CMV, HIC, HIV e HMV. Imediatamente após a pré-incubação, 20 µL de MTT (0.5 mg/ml) foram adicionados ao meio contendo as fatias, seguindo-se uma incubação de 45 min a 35°C. O formazam, produto gerado durante a incubação, foi extraído com dimetilsulfóxido (DMSO) e medido a 570 e 630 nm, sendo o delta de absorbância utilizado como a medida de células viáveis ($\Delta A = A_{570nm} - A_{630nm}$). Nesta técnica somente as fatias viáveis conseguem reduzir o MTT.

Ensaio de Desidrogenase Láctica (DHL). A viabilidade das fatias também foi medida pela liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase para o meio extracelular. As fatias de córtex cerebral (em triplicata) e de hipocampo (em duplicata) tratadas com CIC, CIV, CMV, HIC, HIV ou HMV foram pré-incubadas, segundo o método descrito acima e alíquotas de 25 µL utilizadas para quantificação de DHL através de kit comercial (Doles). Este kit é uma modificação da técnica de Whitaker (1969), utilizando a reação lactato / piruvato, com determinação quantitativa e simultânea do NADH formado na reação enzimática. Os resultados são expressos em % do controle, sendo a unidade absoluta dos controles *DHL (U.I/L)*. Uma Unidade Internacional (*U.I.*) de DHL, corresponde à formação de 1µmol de NADH por litro de soro por minuto, a 37°C.

2.2.4 – Análise Estatística

A análise estatística utilizou o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) em um computador PC-compatível.

Foram utilizados os métodos paramétricos de análise de variância de uma via seguida do teste de raios múltiplos de Duncan quando o F foi significativo e alternativamente o teste de análise de variância de duas vias seguido da análise *post-hoc* mediante o teste de raios múltiplos de Duncan. Quando apenas dois grupos eram analisados utilizou-se o teste *t* de Student para amostras dependentes, ou alternativamente o teste para amostras independentes conforme necessário. Efeitos dose-resposta foram obtidos por testes de regressão linear.

Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Wilcoxon para comparação entre duas amostras dependentes e pelo teste de Mann-Whitney para amostras independentes, em ambos os casos quando os dados não seguiram a distribuição normal. Um $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS

3.1 - Efeito in vitro dos ácidos α -cetoisocapróico, α -cetoisovalérico e α -ceto- β -metilvalérico sobre a captação de L-[3 H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

Estudou-se inicialmente a influência do ácido α -cetoisocapróico sobre a captação de L-[3 H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos. A figura 3.1 mostra que o ácido α -cetoisocapróico diminuiu significativamente a captação de L-[3 H]glutamato [F(3,16)=8,520; p<0,01] a partir de 0,1mM de forma dose-dependente (β = -0,6058; p<0,01). Os resultados apresentados refletem os valores de captação de L-[3 H]glutamato em relação percentual do controle, cuja média encontrada para os valores absolutos foi de 0,421 \pm 0,071 nmol L-[3 H]glutamato /mg de proteína.min. Além disso, a figura 3.1 também mostra que os ácidos α -cetoisovalérico [F(3,16)=0,320; p=0,816] e α -ceto- β -metilvalérico [F(3,16)=0,231; p=0,874] em todas as concentrações testadas (0,01 a 1 mM) não produziram efeito significativo sobre a captação de L-[3 H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos. O valor absoluto médio para a captação de L-[3 H]glutamato do grupo controle para os ácido α -cetoisovalérico foi de 0,342 \pm 0,104 nmol L-[3 H]glutamato /mg de proteína.min e para o ácido α -ceto- β -metilvalérico foi de 0,313 \pm 0,122 nmol L-[3 H]glutamato /mg de proteína.min. Conclui-se, portanto, que houve um efeito específico inibitório do ácido α -cetoisocapróico sobre a captação de glutamato por fatias de córtex cerebral.

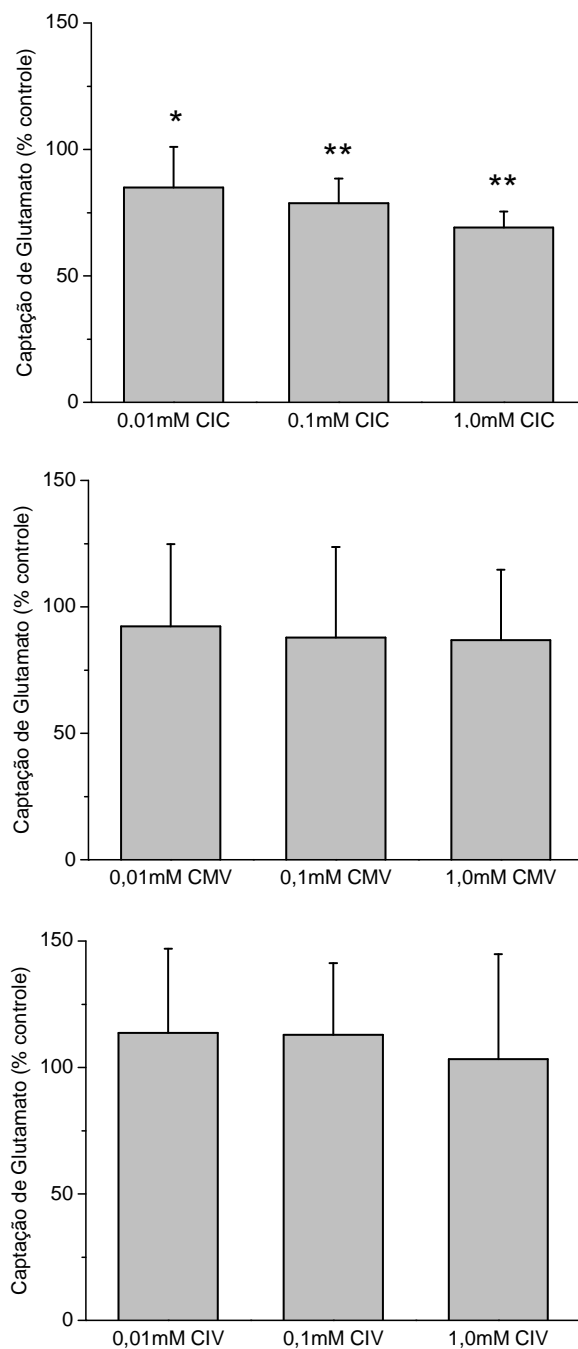


Figura 3.1 - Efeito dos α -cetoácidos de cadeia ramificada sobre a captação de [3 H]Glutamato em fatias de córtex cerebral de ratos de 30 dias. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 5-6 experimentos realizados em triplicata. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle). CIC= ácido α -cetoisocapróico, CIV= ácido α -cetoisovalérico, CMV= ácido α -ceto- β -metilvalérico.

3.2 - Efeito in vitro dos ácidos α -cetoisocapróico, α -cetoisovalérico e α -ceto- β -metilvalérico sobre a viabilidade celular em fatias de córtex cerebral e de hipocampo de ratos jovens medida pelos métodos da reação ao sal de metiltetrazólio (MTT) e da atividade da desidrogenase láctica (DHL).

A análise dos resultados dos testes de viabilidade celular medida pelo método de MTT, expressos em percentagem dos controles, demonstrou que os ácidos α -cetoisocapróico (CIC) [F(3,20)=1,05; $p>0,05$], α -cetoisovalérico (CIV) [F(3,12)=0,82; $p>0,05$] e α -ceto- β -metilvalérico (CMV) [F(3,20)=0,56; $p>0,05$], quando incubados por 3 horas, não diminuíram a viabilidade das células neurais das fatias de córtex cerebral (Figura 3.2). A viabilidade também não foi alterada em fatias de hipocampo incubadas com estes metabólitos (Figura 3.3). CIC: [F(3,20)=0,05; $p>0,05$], CIV: [F(3,12)=0,23; $p>0,05$] e CMV: [F(3,20)=0,45; $p>0,05$]. As médias e desvios padrões dos valores absolutos dos grupos controles para o delta (Δ) de absorbância utilizado nos experimentos dos α -cetoácidos para o córtex cerebral foram de $0,519 \pm 0,083$ para o CIC, $0,412 \pm 0,075$ para o CIV e de $0,432 \pm 0,026$ para o CMV. Nos ensaios realizados com o hipocampo os valores controle foram de $0,372 \pm 0,048$ para o CIC, de $0,413 \pm 0,046$ para o CIV e de $0,432 \pm 0,074$ para o CMV.

Os testes de viabilidade celular medidos pela técnica de LDH não evidenciaram qualquer efeito dos ácidos α -cetoisocapróico (CIC) [F(3,16)=0,681; $p>0,05$], α -cetoisovalérico (CIV) [F(3,12)=0,024; $p>0,05$] e α -ceto- β -metilvalérico (CMV) [F(3,12)=0,705; $p>0,05$] sobre a viabilidade das células neurais contidas nas fatias de córtex cerebral, quando incubadas por 3 horas (Figura 3.4). Verificou-se também que os ácidos α -cetoisocapróico (CIC) [F(3,16)=0,275; $p>0,05$], α -cetoisovalérico (CIV) [F(3,12)=0,0188; $p>0,05$] e α -ceto- β -metilvalérico (CMV) [F(3,12)=0,524; $p>0,05$] não produziram qualquer efeito na viabilidade de células contidas em fatias de hipocampo, para o mesmo tempo de incubação (Figura 3.5). As médias e desvios padrões dos valores absolutos em Unidades Internacionais de DHL dos grupos controles nos experimentos dos α -cetoácidos para o córtex cerebral foram de $15,48 \pm 2,02$ para o CIC, de $9,17 \pm 1,49$ para o CIV e de $8,84 \pm 0,95$ para o CMV. Para os ensaios realizados com o hipocampo os valores encontrados foram de $11,06 \pm 2,35$ para o CIC, de $8,22 \pm 0,78$ para o CIV e de $9,04 \pm 1,26$ para o CMV.

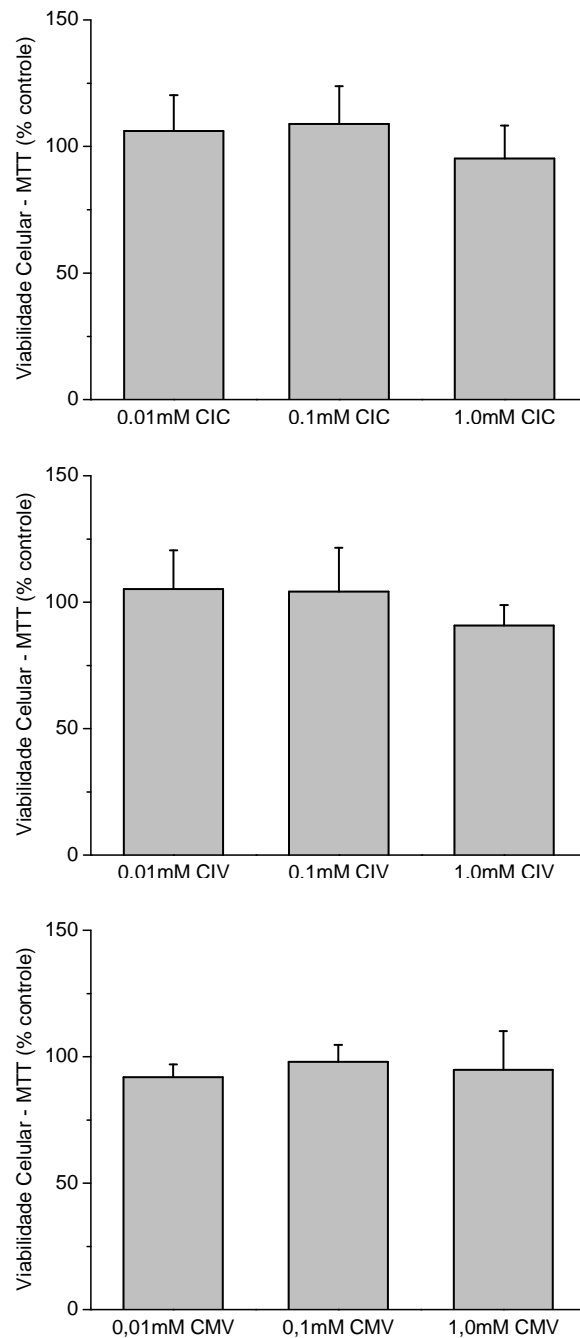


Figura 3.2 - Efeito dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (3h de incubação) sobre a viabilidade celular medida pelo método do sal de metiltetrazólio (MTT) em fatias de córtex cerebral de ratos de 30 dias. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 4-6 experimentos realizados em triplicata. Os valores absolutos dos grupos-controles são apresentados no texto. Não houve diferença significativa entre os vários grupos para o CIC, CIV e CMV (ANOVA).). CIC= ácido α -cetoisocapróico, CIV= ácido α -cetoisovalérico, CMV= ácido α -ceto- β -metilvalérico.

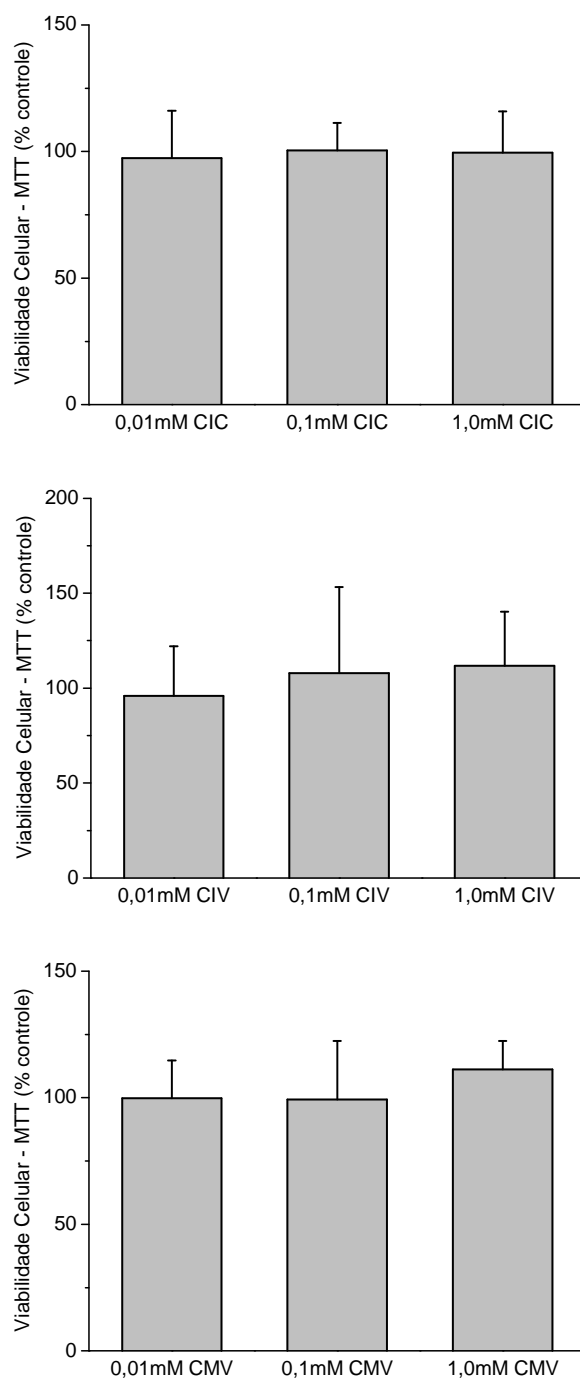


Figura 3.3 - Efeito dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (3h de incubação) sobre a viabilidade celular medida pelo método do sal de metiltetrazólio (MTT) em fatias de hipocampo de ratos de 30 dias. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 4-6 experimentos realizados em duplicata. Os valores absolutos dos grupos-controles são apresentados no texto. Não houve diferença significativa entre os vários grupos para o CIC, CIV e CMV (ANOVA).). CIC= ácido α -cetoisocapróico, CIV= ácido α -cetoisovalérico, CMV= ácido α -ceto- β -metilvalérico.

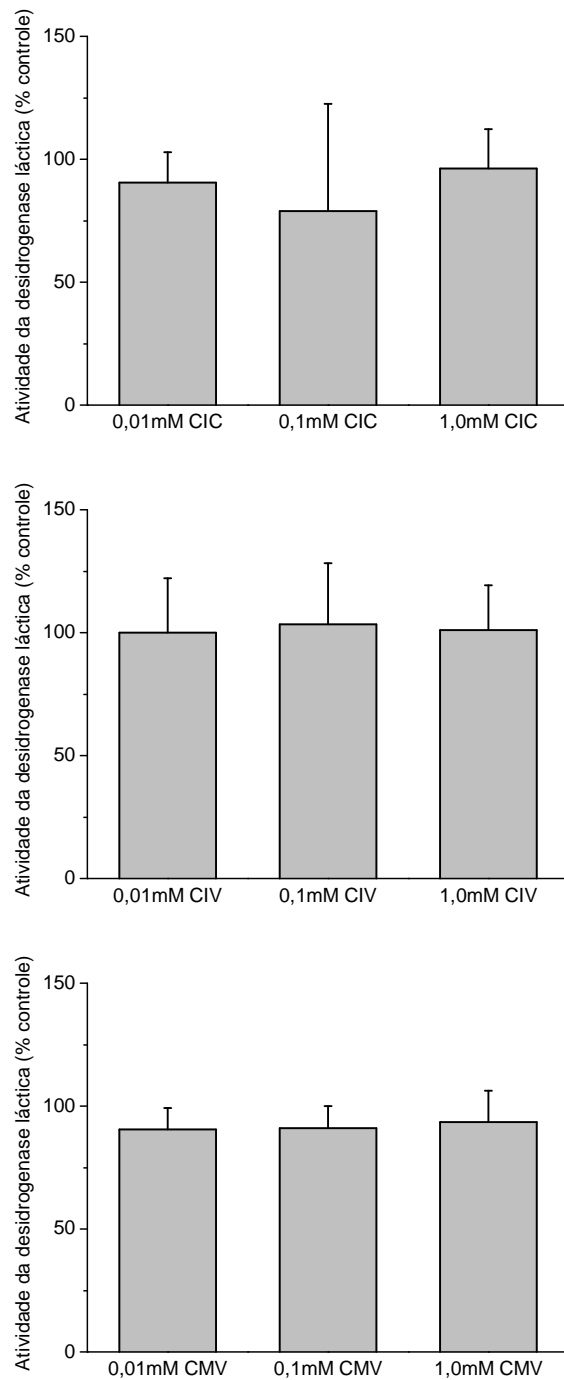


Figura 3.4 - Efeito dos α -ceto ácidos de cadeia ramificada sobre a liberação da enzima desidrogenase láctica no meio de incubação de fatias de córtex cerebral de ratos de 30 dias. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 4-6 experimentos realizados em triplicata. Os valores absolutos dos controles são apresentados no texto. Não houve diferença significativa entre os vários grupos para o CIC, CIV e CMV (ANOVA).). CIC= ácido α -cetoisocapróico, CIV= ácido α -cetoisovalérico, CMV= ácido α -ceto- β -metilvalérico.

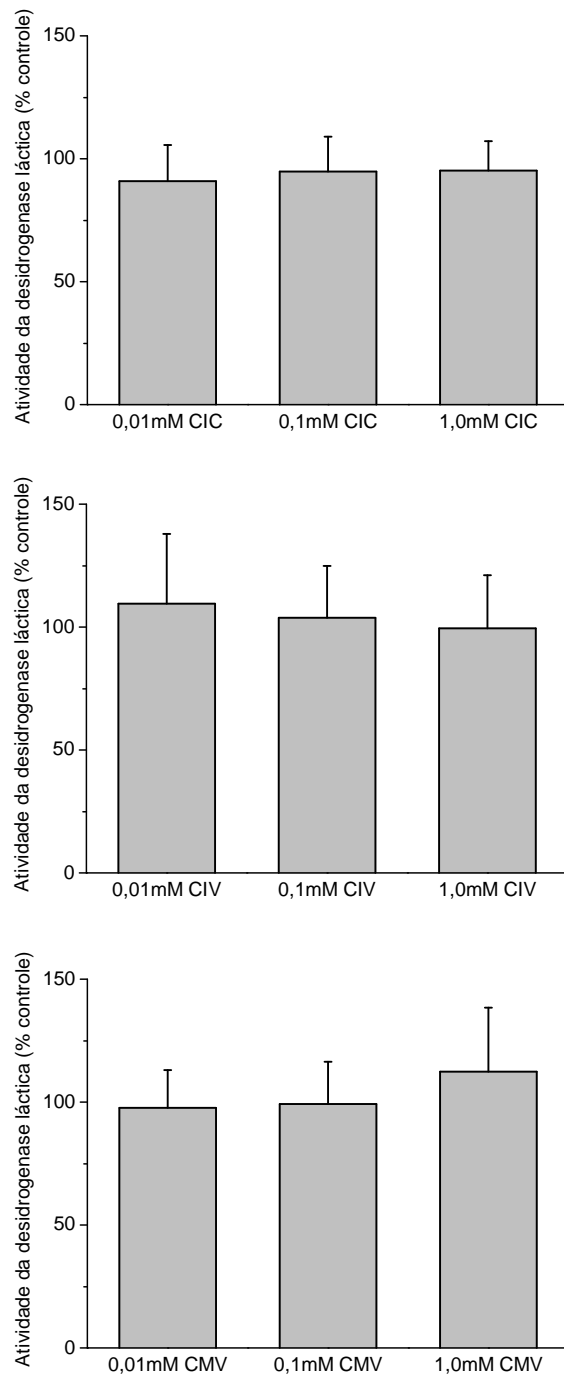


Figura 3.5 - Efeito dos α -ceto ácidos de cadeia ramificada sobre a liberação da enzima desidrogenase láctica no meio de incubação de fatias de hipocampo de ratos de 30 dias. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 4-6 experimentos realizados em duplicata. Os valores absolutos dos controles são apresentados no texto. Não houve diferença significativa entre os vários grupos para o CIC, CIV e CMV (ANOVA). CIC= ácido α -cetoisocapróico, CIV= ácido α -cetoisovalérico, CMV= ácido α -ceto- β -metilvalérico.

3.3 - Efeito in vitro dos ácidos α -hidroxiisocapróico, α -hidroxiisovalérico e 2-hidroxi-3-metilvalérico sobre a captação de L-[3 H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

A análise do efeito do ácido α -hidroxiisocapróico sobre a captação de L-[3 H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos não evidenciou qualquer alteração deste parâmetro [F(3,20)=0,850; $p>0,05$] quando testadas incubações de 23min em concentrações na faixa de 0,01mM-1,0mM. Os resultados apresentados (Figura 3.6) refletem os valores de captação de L-[3 H]glutamato em relação percentual do controle, cuja média dos valores absolutos foi de $0,407 \pm 0,162$ nmol L-[3 H]glutamato/mg de proteína.min.

De outra forma, a análise do efeito do ácido α -hidroxiisovalérico evidenciou que este metabólito induziu um aumento na captação de L-[3 H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos. [F(3,16)=8,033; $p<0,01$] a partir de 0,1mM de forma dose-dependente ($\beta= 0,671225$; $p<0,01$). Os resultados apresentados (Figura 3.6) refletem os valores de captação de L-[3 H]glutamato em relação percentual do controle. O valor absoluto médio para a captação de L-[3 H]glutamato do grupo-controle foi de $0,265 \pm 0,045$ nmol L-[3 H]glutamato /mg de proteína.min.

Ao contrário, o ácido α -hidroxi- β -metilvalérico diminuiu significativamente a captação de L-[3 H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos [F(3,12)=6,131; $p<0,01$] a partir de 0,1mM de forma dose-dependente ($\beta= -0,685860$; $p<0,01$). A figura 3.6 apresenta também os valores de captação de L-[3 H]glutamato em relação percentual do controle para o ensaio realizado com o CMV. O valor absoluto médio para a captação de L-[3 H]glutamato do grupo-controle foi de $0,469 \pm 0,084$ nmol L-[3 H]glutamato /mg de proteína.min.

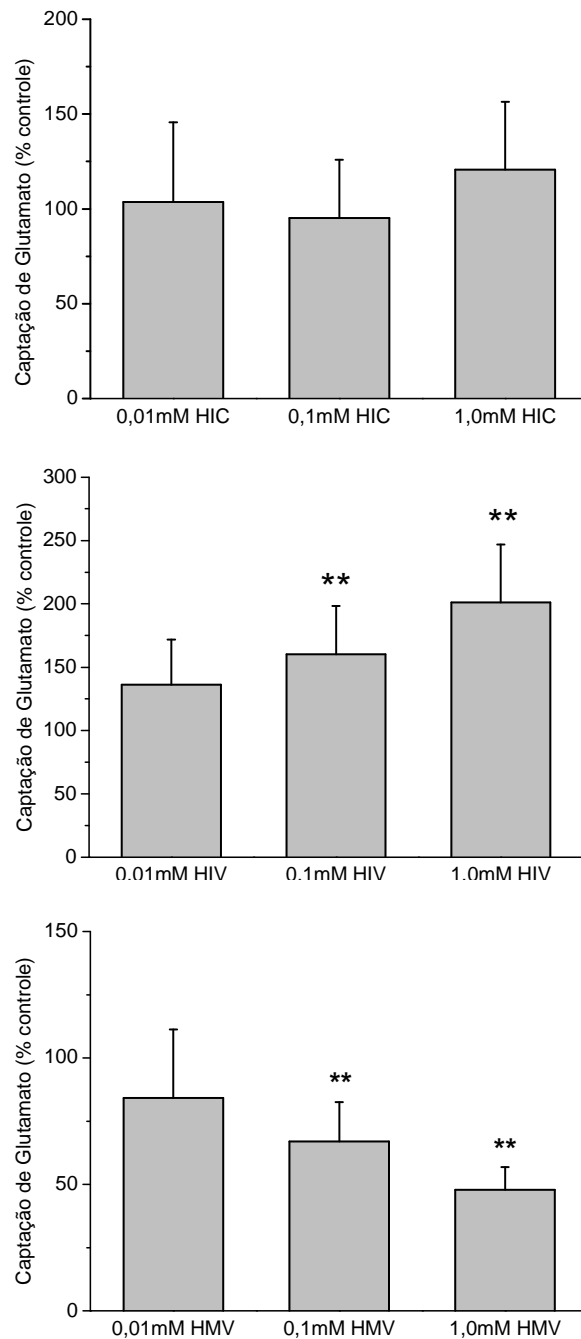


Figura 3.6 - Efeito dos α -hidroxiácidos de cadeia ramificada sobre a captação de L[3 H]Glutamato em fatias de córtex cerebral de ratos de 30 dias. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 4-6 experimentos realizados em triplicata. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle). HIC= ácido α -hidroxiisocapróico, HIV= ácido α -hidroxiisovalérico, HMV= α -hidroxi- β -metilvalérico.

3.4 - Efeito in vitro dos hidroxiácidos α -hidroxiisocapróico, α -hidroxiisovalérico e 2-hidroxi-3-metilvalérico sobre a viabilidade celular em fatias de córtex cerebral e hipocampo medida pelos métodos da reação ao sal de metiltetrazólio (MTT) e da atividade da desidrogenase láctica (DHL).

Os resultados para os ensaios com os α -hidroxiácidos nos testes de viabilidade celular mediante utilização da técnica de MTT demonstraram que os ácidos α -hidroxiisocapróico [F(3,20)=0,03; p>0,01], α -hidroxiisovalérico [F(3,20)=1,81; p>0,05] e 2-hidroxi-3-metilvalérico [F(3,20)=0,47; p>0,01), em incubações de 3 horas, não alteraram a viabilidade de células de fatias de córtex cerebral de ratos jovens (Figura 3.7). Da mesma forma, a incubação dos hidroxiácidos HIC [F(3,20)=0,06; p>0,05], HIV [F(3,20)=2,36; p>0,05] e HMV [F(3,20)=0,02; p>0,05] não produziu efeito significativo sobre a viabilidade celular de fatias de hipocampo de ratos jovens quando incubadas por 3 horas na presença destes metabólitos (Figura 3.8). Os valores absolutos médios e os desvios padrões para o delta (Δ) de absorbância dos grupos controles nos ensaios em córtex cerebral foram de $0,547 \pm 0,115$ para o HIC, $0,567 \pm 0,152$ para o HIV e $0,591 \pm 0,161$ para o HMV. Nos ensaios em fatias de hipocampo os valores encontrados foram de $0,381 \pm 0,083$ para o HIC, $0,475 \pm 0,081$ para o HIV e $0,360 \pm 0,113$ para o HMV.

Quando utilizamos a técnica de DHL como parâmetro de viabilidade celular, observamos resultados similares, i.e. não se evidenciou qualquer efeito dos α -hidroxiácidos HIC, HIV E HMV (na concentração de 1,0mM) sobre as células neurais de fatias de córtex cerebral [F(3,12)=0,110; p>0,05] de ratos jovens incubadas por 3 horas na presença destes metabólitos (Figura 3.9). O mesmo padrão foi encontrado quando o ensaio de viabilidade foi realizado em fatias de hipocampo de ratos jovens incubadas por 3 horas na presença dos ácidos HIC, HIV e HMV [F(3,12)=1,212; p>0,05]. Para os experimentos em córtex cerebral, o grupo controle apresentou média de $5,43 \pm 1,61$ Unidades Internacionais de DHL. Nos ensaios em células hipocampais a média do controle foi de Unidades Internacionais de DHL $4,14 \pm 0,51$.

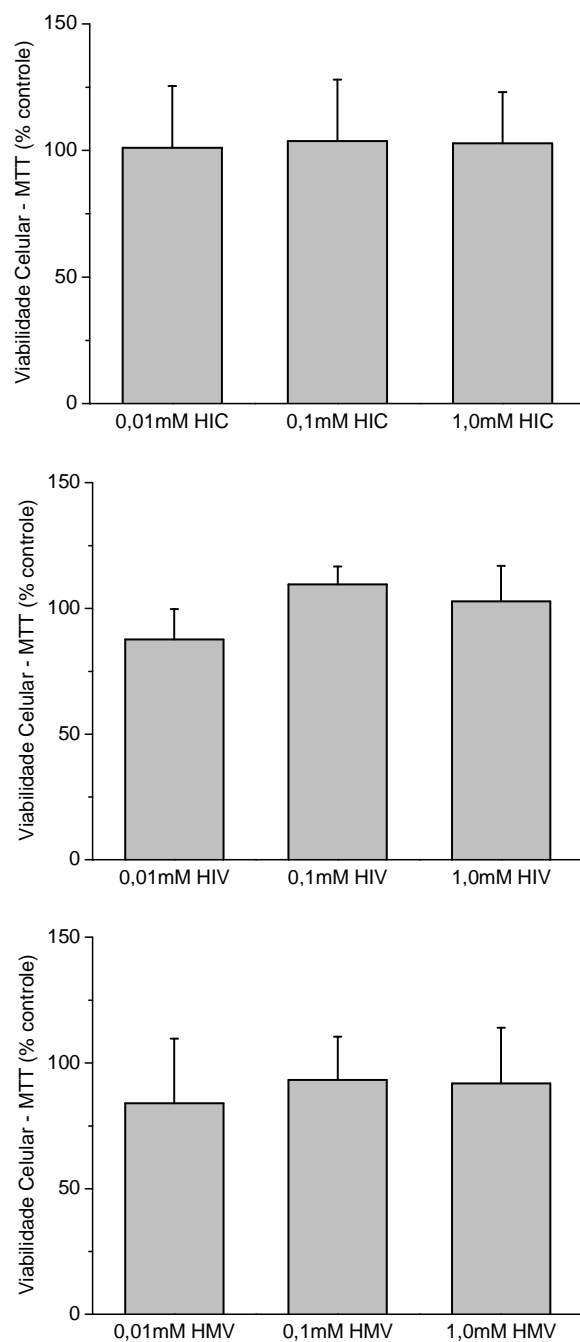


Figura 3.7 - Efeito dos α -hidroxiácidos de cadeia ramificada (3h de incubação) sobre a viabilidade celular medida pelo método do sal de metiltetrazólio (MTT) em fatias de córtex cerebral de ratos de 30 dias. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 4-6 experimentos realizados em triplicata. Não houve diferença significativa entre os vários grupos para o HIC, HIV e HMV (ANOVA). HIC= ácido α -hidroxiisocapróico, HIV= ácido α -hidroxiisovalérico, HMV= α -hidroxi- β -metilvalérico.

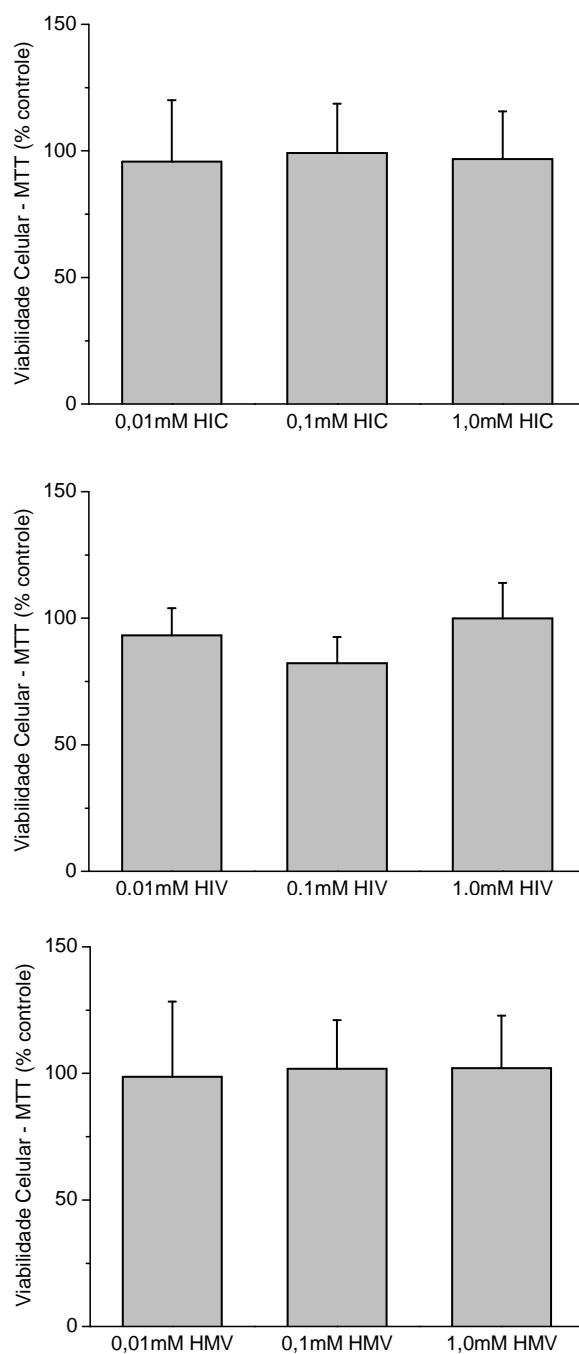


Figura 3.8 - Efeito dos α -hidroxiácidos de cadeia ramificada (3h de incubação) sobre a viabilidade celular medida pelo método do sal de metiltetrazólio (MTT) em fatias de hipocampo de ratos de 30 dias. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 4-6 experimentos realizados em duplicata. Não houve diferença significativa entre os vários grupos para o HIC, HIV e HMV (ANOVA). HIC= ácido α -hidroxiisocapróico, HIV= ácido α -hidroxiisovalérico, HMV= α -hidroxi- β -metilvalérico.

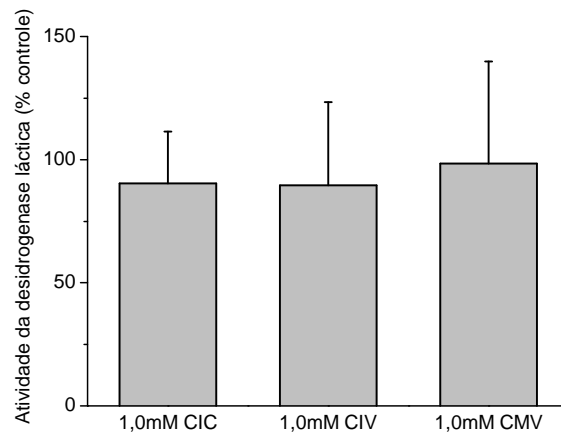


Figura 3.9 - Efeito dos α -hidroxiácidos de cadeia ramificada sobre a liberação da enzima desidrogenase láctica no meio de incubação de fatias de córtex cerebral de ratos de 30 dias. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicata, os valores absolutos dos controles são apresentados no texto. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle (ANOVA). HIC= ácido α -hidroxiisocapróico, HIV= ácido α -hidroxiisovalérico, HMV= α -hidroxi- β -metilvalérico.

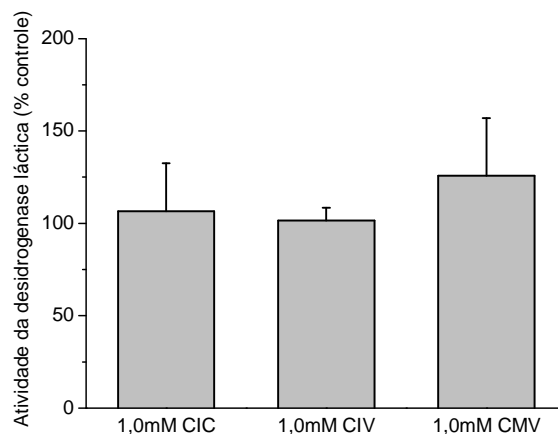


Figura 3.10 - Efeito dos α -hidroxiácidos de cadeia ramificada sobre a liberação da enzima desidrogenase láctica no meio de incubação de fatias de hipocampo de ratos de 30 dias. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 4 experimentos realizados em duplicata, os valores absolutos dos controles são apresentados no texto. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle (ANOVA). HIC= ácido α -hidroxiisocapróico, HIV= ácido α -hidroxiisovalérico, HMV= α -hidroxi- β -metilvalérico.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo principal estudar o efeito de altas concentrações hipocampais dos principais metabólitos ácidos acumulados em duas doenças neurometabólicas (doença do xarope do bordo e acidemia metilmalônica) caracterizadas por retardo mental sobre o comportamento cognitivo de ratos adultos jovens injetados agudamente com essas substâncias. A doença do xarope do bordo (DXB) caracteriza-se clinicamente por manifestações predominantemente neurológicas, tais como atraso psicomotor e retardo mental, coma e convulsões (Chuang e Shih, 2001). Os pacientes afetados acumulam em seus tecidos os α -cetoácidos de cadeia ramificada (CACR) α -cetoisocapróico (CIC), α -cetoisovalérico (CIV) e α -ceto- β -metilvalérico (CMV), bem como os α -hidroxiácidos e aminoácidos correspondentes. Acredita-se que esses compostos sejam neurotóxicos, com especial ênfase para o CIC e leucina (Gibson e Blass, 1976; Zielke et al., 1997). No entanto, os mecanismos dessa neurotoxicidade são pouco conhecidos. Neste particular, foi demonstrado que os CACR inibem o metabolismo energético (Pilla et al., 2003; Sgaravatti et al. 2003), apresentam propriedades convulsivantes (Coitinho et al., 2001), competem com o glutamato por descarboxilação (Zielke et al., 1997) e por conseguinte provocam uma redução dos níveis cerebrais de GABA (Dodd et al., 1992) e prejudicam o desenvolvimento da bainha mielínica (Treacy et al., 1992, Schonberger, 2004). Além disso, induzem apoptose em células gliais e neuronais (Jouvet et al. 2000a; Funchal et al., 2004), bem como são responsáveis por alterações morfológicas do citoesqueleto (Funchal et al., 2004).

Essa doença possui tratamento que é baseado na restrição de proteínas e dos aminoácidos ramificados leucina, isoleucina e valina, o que evita o acúmulo dos metabólitos acumulados e os seus efeitos, principalmente sobre o SNC. O importante é a manutenção dos níveis plasmáticos adequados destes aminoácidos para o crescimento e desenvolvimento psíquico, sem propiciar o acúmulo destas substâncias e de seus metabólitos. Em alguns casos, nos períodos de descompensação metabólica, a diálise peritoneal é o meio empregado para que se reduzam os níveis dos metabólitos que se acumulam na DXB em um tempo suficientemente rápido para se evitar os danos

neurológicos severos decorrentes da superexposição a estas substâncias e expressos nos pacientes com edema cerebral agudo (Snyderman et al., 1964).

A acidemia metilmalônica, da mesma forma que a DXB também está associada a manifestações neurológicas severas. Postula-se que o aparecimento destas alterações possa estar relacionado com a exposição contínua do cérebro aos metabólitos tóxicos que se acumulam nesta doença (De Souza et al., 1989). Além do ácido metilmalônico (MMA) encontrado em altas concentrações no sangue e na urina dos indivíduos afetados, outros metabólitos se acumulam secundariamente em concentrações bem menores, sendo os principais deles o ácido propiônico e o ácido 3-hidroxi propiônico, seguindo-se o ácido tíglico, a tiglil-CoA, o ácido metilcítrico e a propionilglicina (Fenton et al., 2001). Além de necrose no putâmen, podem ser encontradas lesões nos gânglios da base, hipodensidade e gliose do globo pálido, espongiose difusa do córtex central e da substância branca do cérebro e dos hemisférios cerebelares (Roodhooft et al., 1990).

Muitos estudos demonstraram os efeitos deletérios dos metabólitos acumulados na acidemia metilmalônica sobre a produção de energia no cérebro (Wajner et al., 1988; Dutra et al., 1991a; Wajner et al., 1992; Dutra et al., 1993; Toyoshima et al., 1995; Wajner e Coelho, 1997; McLaughlin et al., 1998; Brusque et al., 2002; Okun et al., 2002; Schuck et al., 2004).

O tratamento dos pacientes com acidemia metilmalônica também é baseado na restrição da proteína na alimentação e pela utilização de alimentos pobres em metionina, isoleucina, treonina e valina, todos precursores da propionil-CoA (Thomas, 1994). Devido à propriedade de ligação ao propionato e à propionil-CoA que a L-carnitina apresenta, a sua utilização como suplemento alimentar é extremamente importante pois leva à formação de propionilcarnitina o que facilita a excreção e conseqüentemente diminuindo os produtos reconhecidamente tóxicos gerados pelo bloqueio metabólico desta enfermidade. Da mesma forma que os pacientes da DXB, a diálise peritoneal, a hemodiálise e a transfusão também são importantes no tratamento durante os episódios de descompensação metabólica.

Nos últimos anos tem sido verificado que mesmo pacientes com DXB aparentemente “bem” tratados apresentam déficit cognitivo, o que reflete que o tratamento baseado fundamentalmente nos níveis séricos dos aminoácidos ramificados leucina, isoleucina e valina deve sofrer ajustes possivelmente no que se refere aos metabólitos ácidos tóxicos desta doença e à sua neurotoxicidade. Fator similar ocorre com a acidemia metilmalônica em que não há um controle efetivo da neurotoxicidade do ácido metilmalônico.

Os objetivos iniciais do presente trabalho foram portanto verificar o efeito agudo da administração intracerebral dos principais metabólitos ácidos acumulados nessas duas desordens sobre o comportamento cognitivo de ratos como forma de se avaliar a sua neurotoxicidade. Utilizamos para tal fim duas tarefas, uma não aversiva (campo aberto) e outra aversiva (esquiva inibitória). O hipocampo foi utilizado para as injeções, visto que o mesmo é essencial para tarefas de aprendizado/memória.

Neste particular, vários trabalhos sobre o estudo de lesões em animais (Moser e Moser, 1998; Zola e Squire, 1990; Zola e Squire, 2001) e pacientes (Rempel-Clower et al., 1996; Teng e Squire, 1999), bem como em modelos transgênicos (Bourtchuladze et al., 1994; Tsien et al., 1996; Minichiello et al., 1999) sugerem que a formação hipocampal desempenha um papel essencial em vários tipos de memória. A análise da neuroanatomia animal também nos permite concluir que o hipocampo recebe informação do córtex entorrinal e está conectado através dele à amígdala e a outras regiões corticais associadas com o processamento de memória (Izquierdo e Medina, 1997; Setlow et al., 2000; Wilensky et al., 2000; Goosens e Maren 2001)

Por outro lado, a formação hipocampal é bem conhecida por seu envolvimento em aprendizado estritamente espacial (Squire, 1992). Além disso, os estudos mais recentes apontam o hipocampo como essencial na associação dos sinais do meio ambiente produzindo uma percepção espaço-temporal coesa e unificada (Sweatt, 2004).

Embora o medo adquirido a lugares ou contextos e a sua associação com eventos aversivos seja uma forma de condicionamento Pavloviano, um período inicial de exploração é necessário para permitir ao animal formar uma memória integrada das

características do contexto antes que o condicionamento possa existir. A formação hipocampal também desempenha um papel crítico neste processo, onde células localizadas do hipocampo estão envolvidas na formação, armazenamento e consolidação de uma representação integrada do contexto das tarefas (Fanselow, 2000).

Na análise do aprendizado, e conseqüente formação de memória a partir deste, convêm lembrar que não se pode medir o aprendizado ou a memória de forma direta. A avaliação da memória é possível apenas ao medirmos a sua evocação, assumindo com isto que a evocação é função da memória e esta do aprendizado (McGaugh e Herz, 1972). Além disso, somente podemos demonstrar a aquisição de experiências (formação de memórias) nos animais através de alguma alteração de comportamento quantificável. Os experimentos de memória e aprendizado são feitos no sentido de adquirir comportamentos não naturais ou de suprimir respostas inatas, pois são de mais fácil quantificação (Izquierdo 1989, 1989a). Determinadas diferenças serão geradas entre as sessões de treino e as de teste na quantificação ou qualificação do aspecto motor estudado; podemos dizer então que “aprender” a tarefa (memorizá-la) passa por adquirir uma resposta ou suprimi-la (aumentar ou diminuir a ocorrência de um determinado comportamento motor em relação ao ocorrido na sessão de treino).

Quando estudamos os efeitos da administração intra-hipocampal aguda dos α -cetoácidos de cadeia ramificada sobre o aprendizado espacial e aversivo de ratos adultos verificamos que as concentrações administradas (5-8 μ mol) destes metabólitos provocaram déficits na performance cognitiva.

A administração dos ácidos α -cetoisovalérico (CIV) e α -ceto- β -metilvalérico (CMV) 10 min antes do treino revelou um padrão diferente de respostas de orientação espacial ao longo das sessões na tarefa de habituação ao campo aberto em relação com os animais injetados com NaCl e o ácido α -cetoisocapróico. Enquanto os animais injetados com NaCl diminuíram significativamente o número de respostas de orientação da sessão de treino para a sessão de teste, o grupo de animais injetado com CIV não apresentou variação no número de respostas entre as sessões treino e teste, ou seja, não se habituou. De forma mais marcante, o grupo de animais injetados com CMV apresentou um aumento significativo no número de respostas de orientação da sessão

treino para a sessão teste, enquanto o seu grupo controle apresentou a diminuição esperada na exploração ao campo aberto (número de respostas de orientação espacial). Os animais tratados com CIC também apresentaram habituação ao campo aberto, semelhante aos injetados com NaCl (controles), ou seja, apresentaram uma diminuição do número dessas respostas de orientação entre as sessões de treino e de teste. Estes resultados indicam que os ratos injetados com CIV e CMV não se habituaram a um novo ambiente (campo aberto), visto que, ao serem apresentados pela segunda vez à tarefa, continuaram com os mesmos níveis de exploração para localização (déficit de aprendizado espacial).

Por outro lado, a administração intrahipocampal desses ácidos orgânicos imediatamente após o treino não provocou qualquer alteração na performance dos animais nesta tarefa, indicando que esses metabólitos não provocaram *per se* lesões no hipocampo capazes de alterar o comportamento dos mesmos e explicar os resultados anteriores. Desses resultados podemos concluir que a administração dos CACR antes do treino é necessária para observarmos o déficit de cognição nessa tarefa. Este padrão aponta para efeitos deletérios no processo de aquisição da memória, visto que concentrações intrahipocampais elevadas destes metabólitos administradas anteriormente ao treino (dez minutos) foram responsáveis pelo aparecimento de déficits de aprendizado espacial na tarefa de habituação ao campo aberto. No entanto, são desconhecidos ainda os mecanismos biológicos pelos quais agem estes metabólitos e não podemos afastar a possibilidade de que uma janela de tempo maior possa ser necessária para que os seus efeitos sejam evidentes. Neste contexto, a administração intrahipocampal imediatamente após o treino pode não ter sido eficaz, pois os efeitos deletérios do CIV e do CMV podem estar iniciando a sua ação fora do tempo que se presuppõe que a estrutura hipocampal seja fundamental para os processos de aquisição e consolidação de memória (Zanatta et al., 1996, 1997; Izquierdo et al., 1997).

Na tarefa de esquivas inibitória, os animais injetados no hipocampo com cada um dos α -cetoácidos, antes da sessão de treino, apresentaram um déficit na retenção da tarefa, revelado pela ausência do aumento nas latências de descida da plataforma entre as sessões (diferença das latências treino/teste), contrastando com os animais dos grupos-controles (NaCl), que apresentaram tempos de descida da plataforma significativamente maiores na sessão de teste. Estes dados sugerem que o

CIC, o CIV e o CMV provocam deficit de aprendizado na tarefa da esquivia inibitória. Os resultados de nossas medidas de controle motor sugerem ainda que alterações nas atividades de locomoção não parecem ser as responsáveis pelos achados nas modificações de aprendizado descritas acima.

Verificamos também que a motricidade e a emocionalidade dos animais, medidos pelo número de cruzamentos na tarefa de campo aberto e pela latência de sair da plataforma no treino da esquivia inibitória e pelo número de bolos fecais, respectivamente, foi similar em todos os grupos de animais, indicando que alterações desses parâmetros não foram responsáveis pelo deficit cognitivo observado nessas tarefas pelos animais injetados com os alfa-cetoácidos específicos.

O próximo passo foi o de verificar se os α -hidroxiácidos de cadeia ramificada que se acumulam na DXB poderiam alterar o comportamento dos animais nas tarefas do campo aberto e da esquivia inibitória. Observamos que a administração dos ácidos α -hidroxiisocapróico (HIC), α -hidroxiisovalérico (HIV) e α -hidroxi- β -metilvalérico (HMV) 10 min antes do treino prejudicou diferencialmente a performance de ratos adultos na tarefa não aversiva da habituação ao campo aberto e também na tarefa de medo condicionado (aversiva), a esquivia inibitória. Os animais tratados com HIV e HMV 10 min antes do treino não demonstraram a diminuição característica nas respostas de orientações verticais ao longo das sessões na tarefa de habituação ao campo aberto, enquanto que os grupos-controles (NaCl) e os animais tratados com HIC apresentaram habituação, isto é, reduziram o número de respostas de orientação na segunda sessão. Visto que uma redução no número de respostas de orientação vertical ao longo das sessões na tarefa de habituação ao campo aberto pode ser interpretada como indicador de que os animais reconhecem e se recordam de uma prévia exposição ao ambiente, e que os animais tratados com HIV e HMV não apresentaram este padrão, assumimos que esses animais apresentaram um déficit de memória causado por estes alfa-cetoácidos.

No intuito de verificarmos os possíveis mecanismos que induziram o aparecimento dos déficits comportamental nesses animais, pré-injetamos diversos compostos (energéticos, antioxidantes e antagonistas glutamatérgicos) na tentativa de

prevenir o bloqueio de memória causado pelo ácido α -hidroxiisovalérico. Inicialmente, avaliamos se a superestimulação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA poderia estar implicada no déficit de aprendizado induzido pelo HIV. A pré-administração de MK-801, um antagonista NMDA não competitivo, não foi capaz de reverter o prejuízo de memória decorrente da administração intrahipocampal de HIV, indicando que o efeito do HIV não pode ser atribuído à superestimulação de receptores NMDA. O pré-tratamento (5 dias) concomitante de dois compostos antioxidantes conhecidos, o ácido ascórbico e o α -tocopherol, também não foi capaz de prevenir o déficit comportamental induzido pelo HIV, não causando qualquer alteração nos níveis de exploração vertical do grupo tratado com este ácido orgânico. Por outro lado, a pré-administração dos compostos energéticos isoladamente, a creatina monohidratada e o ácido succínico, preveniu totalmente o déficit cognitivo de memória espacial provocado pelo HIV na tarefa de campo aberto. Assim, a administração de ácido succínico (2.5 μ mol), 30 min antes da infusão de HIV, bem como o tratamento prévio durante 3 dias com creatina monohidratada (50mg/kg, 2 x dia), permitiu aos animais injetados habituares-se normalmente ao campo aberto, sem quaisquer alterações motoras ou de emocionalidade que pudessem explicar esse efeito. Nestes grupos, assim como no grupo controle, verificou-se uma redução característica no número de respostas verticais de orientação ao longo das sessões treino/teste, característica de aprendizado espacial coerente para animais não tratados.

Embora desconheçamos estudos que demonstrem prejuízo no metabolismo energético causado pelos HACR, nossos achados apontam para isso. Assim, torna-se interessante estudar o efeito desses compostos sobre o metabolismo energético no cérebro. Por outro lado, já está bem demonstrado que os CACR comprometem o metabolismo energético cerebral (Howell e Lee, 1963; Halestrap et al., 1974; Land et al., 1976; Danner e Elsas, 1989; Jouvet et al., 2000a; Pilla et al., 2003; Sgaravati et al., 2004). Não se pode, por outro lado, excluir que uma parte dos α -hidroxiácidos injetados tenha se convertido a α -cetoácidos.

A administração dos α -hidroxiácidos que se acumulam na DXB também provocou déficit cognitivo de memória aversiva na tarefa de esQUIVA inibitória. Os animais injetados com todos os hidroxiácidos isoladamente (HIC, HIV e

HMV) não aumentaram a latência de descida da plataforma durante a sessão de teste, o que é característico de déficit de memória aversiva para este teste de comportamento.

Verificamos também que os déficits cognitivos observados com a administração intrahipocampal dos HACR não se deveram a alterações motoras ou à emocionalidade dos animais, visto que todos os grupos apresentaram a mesma motricidade e a mesma emocionalidade, conforme os resultados das medidas do número de cruzamentos e do número de bolos fecais respectivamente, durante a sessão de treino na tarefa de habituação ao campo aberto, bem como dos valores de latência de descida da plataforma durante o treino na tarefa da esQUIVA inibitória.

Creemos que nossos resultados presentes relativos ao comprometimento cognitivo de animais injetados com os CACR e os HACR sejam pioneiros, embora já se tenha demonstrado que a injeção crônica de leucina, o aminoácido que mais se acumula na doença do xarope do bordo, durante o desenvolvimento provoca déficits cognitivos em ratos adultos em tarefas não aversivas e aversivas (Mello et al. 1999). Não podemos também excluir que os CACR e os HACR podem ter sido convertidos nos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) correspondentes no hipocampo, sendo estes últimos, ao menos parcialmente, responsáveis pelas alterações comportamentais observadas.

O passo a seguir em nossa investigação foi estudar o efeito da administração intrahipocampal do ácido metilmalônico, principal metabólito acumulado na acidemia metilmalônica, sobre o comportamento cognitivo de ratos jovens adultos nas tarefas do campo aberto e esQUIVA inibitória. Observamos que a administração intra-hipocampal de metilmalonato (MMA) prejudicou a performance de ratos adultos na habituação ao campo aberto (tarefa não aversiva). Foi observado, inicialmente, que os animais pré-tratados com MMA 10 minutos antes da sessão de treino não apresentaram habituação ao longo das sessões na tarefa do campo aberto, enquanto os controles apresentaram habituação, medida pela redução de respostas verticais de orientação espacial ao longo da sessão.

Investigamos também os possíveis mecanismos envolvidos na falta de habituação dos animais injetados com MMA. Os resultados apontam para uma

prevenção do déficit de aprendizado pela pré-administração de creatina. Por outro lado, a pré-administração de ácido succínico não foi capaz de prevenir as alterações de comportamento provocadas pela administração intrahipocampal de MMA. Este resultado é surpreendente já que o MMA é inibidor competitivo da enzima succinato desidrogenase (Dutra et al., 1993). É possível, portanto, que a dose de succinato injetada (1,5 μ mol) tenha sido pequena. Portanto, é importante administrar-se doses maiores de succinato para verificar se estas doses podem prevenir o efeito do MMA sobre a cognição dos animais. No entanto, a prevenção por creatina do déficit comportamental induzido pelo MMA sugere que o déficit cognitivo dos ratos injetados com MMA possa ser devido a um comprometimento no metabolismo energético cerebral.

Em contraste, a administração intrahipocampal de MMA não afetou a performance geral de ratos na esQUIVA inibitória (tarefa aversiva de medo condicionado), o que é bastante interessante e está de acordo com resultados prévios de administração crônica do MMA a ratos durante o seu desenvolvimento (Dutra et al., 1991). Verificamos previamente que a injeção crônica de MMA provoca um déficit significativo de aprendizado/memória em ratos adultos submetidos a uma tarefa não aversiva, mas não afeta o desempenho cognitivo em tarefas aversivas. Podemos, portanto, sugerir que a habituação ao campo aberto possa ser um parâmetro mais sensível na detecção de déficits mais específicos de aprendizado do que tarefas que empreguem um estímulo aversivo. Os resultados apresentados também estão de acordo com o de outros autores (Strupp et al., 1984) que, trabalhando com ratos fenilcetonúricos, concluíram que tarefas não essenciais são mais apropriadas para identificar pequenos déficits de comportamento do que tarefas de aprendizados essenciais, nas quais os animais devem aprender para satisfazer necessidades biológicas essenciais, tais como obter alimento ou escapar de um estímulo aversivo.

Neste contexto, deve ser mencionado que os seres humanos portadores de retardo mental respondem a testes de condicionamento clássico da mesma forma que os não portadores desta deficiência, mas, por causa de sua habilidade diminuída em adquirir informações novas de forma espontânea, apresentam muita dificuldade em responder a novas situações que requeiram experiências passadas (Zeaman e House, 1967). É possível então, que estudos comportamentais envolvendo modelos

experimentais, particularmente aqueles que utilizam situações sem estímulos aversivos, possam servir como método para detectar déficits comportamentais leves em certas patologias nas quais o retardo mental é comum. Mesmo assim, estudos adicionais que utilizem outras tarefas de aprendizado não essenciais são necessários para corroborar esta hipótese. Neste sentido, a utilização do mesmo modelo desenvolvido por Dutra e colaboradores (Dutra et al., 1991) com o objetivo de estudar o comportamento de ratos no labirinto aquático de Morris (Pettenuzzo et al. 2003), apontou um déficit de aquisição de um novo paradigma de localização espacial nos animais testados.

Tendo em vista que o glutamato é o principal neurotransmissor do SNC e desempenha uma função fundamental no aprendizado/memória, o próximo passo de nossa investigação foi estudar o efeito *in vitro* dos CACR e dos HACR sobre a captação de glutamato em fatias de cérebro (córtex cerebral) de ratos jovens. Por outro lado, aumento nas concentrações de glutamato na fenda sináptica pode provocar excitotoxicidade que resulta em morte neuronal. Verificou-se que, dentre os α -cetoácidos estudados, apenas o ácido α -cetoisocapróico foi capaz de diminuir os níveis de captação (preponderantemente astrocitária) de glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos jovens. Esta diminuição foi dose-dependente na faixa de 0,01 mM até 1,0 mM (inibição até 30 %), sendo que o efeito se tornou significativo, em relação ao grupo controle, a partir de 0,1mM.

Em relação aos α -hidroxiácidos, verificou-se que o ácido α -hidroxi- β -metilvalérico diminuiu significativamente a captação de glutamato nas doses de 0,1mM e 1,0mM (33 e 52%, respectivamente), enquanto um aumento expressivo da captação de glutamato foi encontrado quando da incubação das fatias com o ácido α -hidroxiisovalérico. Este aumento variou entre 40-110%, de forma dose-dependente na faixa de 0,01-1,0mM, sendo que se tornou significativo a partir de 0,1mM de concentração do ácido.

Não estudamos os mecanismos pelos quais esses ácidos orgânicos alteraram para mais ou menos a captação de glutamato. No entanto, uma explicação plausível para a diminuição da captação de glutamato pode ser devido ao seu efeito sobre o metabolismo energético, como já demonstrado previamente para o ácido α -

cetoisocapróico (Sgaravatti et al., 2003). Por outro lado, uma diminuição da captação de glutamato por morte neuronal é improvável, visto que verificamos que a incubação de fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos por 3 horas na presença dos ácidos α -cetoisocapróico, α -cetoisovalérico, α -ceto- β -metilvalérico, α -hidroxiisocapróico, α -hidroxiisovalérico e α -hidroxi- β -metilvalérico, nas concentrações de 0,01mM, 0,1mM e 1,0mM, não provocou uma diminuição da viabilidade celular determinada pelos métodos do MTT e LDH.. Tais resultados indicam que exposição aguda por até 3 horas de fatias do córtex cerebral a esses metabólitos não provoca morte celular. Tendo em vista que os pacientes afetados por essas doenças apresentam atrofia cerebral, é possível que somente uma exposição crônica do SNC a esses ácidos orgânicos seja capaz de causar dano cerebral irreversível.

Quanto ao aumento da captação de glutamato causado pelo HIV, embora o mecanismo não tenha sido investigado, resultados anteriores mostraram que agentes excitotóxicos como o próprio glutamato (Duan et al., 1999), aumentam a quantidade de transportadores glutamatérgicos na membrana de astrócitos. Resultados similares ocorreram com o ácido 3-hidroxiglutárico, um reconhecido agonista NMDA que se acumula (Frizzo et al., 2004) na acidemia glutárica tipo I.

Por outro lado, não sabemos o resultado final da incubação concomitante dos CACR e os HACR sobre a captação de glutamato como ocorre na doença humana, mas devemos lembrar que os metabólitos que mais se acumulam são os ácidos α -cetoisocapróico e α -hidroxiisovalérico que apresentaram efeitos opostos e que o ácido α -hidroxi- β -metilvalérico apresenta concentrações 100 vezes menores do que os supracitados. Nossos resultados demonstrando alteração na captação de glutamato por alguns desses ácidos, aliado a resultados anteriores demonstrando captação diminuída desse neurotransmissor em vesículas sinápticas provocada pelos CACR (Reis et al., 2000; Tavares et al., 2000) ou mesmo quando medida a captação em um modelo animal transgênico da doença com bloqueio do complexo CDCCR (Dodd et al., 1992) nos permitem propor que alterações no metabolismo glutamatérgico cerebral possam explicar ao menos em parte as alterações neurológicas dos pacientes afetados pela doença do xarope do bordo.

Não estudamos a ação do MMA sobre a viabilidade de fatias de células cerebrais, ou sobre a captação de glutamato, pois publicações recentes da literatura já demonstraram que o MMA induz morte neural nessas fatias (Maciel et al., 2004) e altera vários parâmetros do sistema glutamatérgico (Brusque et al., 2001).

Concluindo, observamos inicialmente no presente estudo que os metabólitos ácidos acumulados na doença do xarope do bordo provocam déficit cognitivo em tarefas aversivas e não aversivas, enquanto o MMA somente induz déficit cognitivo em tarefa não aversiva. Portanto, é possível que o aumento das concentrações desses metabólitos no hipocampo, estrutura fundamental para a cognição, possam alterar rotas bioquímicas necessárias para o processo normal de aprendizado/memória. Neste particular, tendo em vista que substâncias energéticas, como pro exemplo a creatina, previniram o déficit comportamental induzido por alguns dos ácidos de cadeia ramificada e por MMA, é possível que um mecanismo importante de ação desses ácidos seja diminuir a produção de energia no sistema nervoso central. Neste contexto, seria interessante testar se substâncias energéticas poderiam servir como tratamento coadjuvante para melhorar a cognição de crianças afetadas por essas doenças e tratar energeticamente as crises agudas dos pacientes afetados por DXB e acidemia metilmalônica com aporte substancial de soro glicosado e outras medidas que favoreçam o anabolismo.

5. CONCLUSÕES

1. Ratos adultos administrados intrahipocampalmente com os ácidos α -cetoisocapróico (CIC), α -cetoisovalérico (CIV) e α -ceto- β -metilvalérico (CMV) 10 minutos antes do treino apresentaram falta de habituação na tarefa não aversiva do campo aberto, refletindo um déficit de aprendizado espacial.
2. A administração intrahipocampal dos ácidos CIC, CIV e CMV imediatamente após o treino em ratos adultos não provocou déficit de aprendizado espacial na tarefa de habituação ao campo aberto.
3. A motricidade e a emocionalidade dos animais injetados intrahipocampalmente com CIC, CIV e CMV, medidas respectivamente pelo número de cruzamentos e de bolos fecais na sessão de treino da tarefa do campo aberto, não se alterou.
4. Ratos adultos administrados intrahipocampalmente com os ácidos CIC, CIV e CMV 10 minutos antes da tarefa aversiva da esquiava inibitória apresentaram déficit de aprendizado.
5. Ratos adultos administrados intrahipocampalmente com os ácidos α -hidroxiisocapróico (HIC), α -hidroxiisovalérico (HIV) e α -hidroxi- β -metilvalérico (HMV) 10 minutos antes do treino na tarefa do campo aberto apresentaram falta de habituação, refletindo um déficit de aprendizado espacial.
6. A administração intrahipocampal dos ácidos HIC, HIV e HMV imediatamente após o treino em ratos adultos não causou déficit de aprendizado espacial na tarefa do campo aberto.
7. A motricidade e a emocionalidade, medidas pelo número de cruzamentos e de bolos fecais na sessão de treino da tarefa de habituação ao campo aberto, dos animais injetados intrahipocampalmente com HIC, HIV e HMV não se altera

8. O pré-tratamento com os substratos energéticos creatina e ácido succínico previniram o déficit de aprendizado espacial induzido pela administração intrahipocampal do ácido HIV em ratos adultos na tarefa de habituação ao campo aberto, sugerindo que um déficit na produção de fosfatos de alta energia podem estar envolvidos na falta de habituação desses animais.
9. O pré-tratamento com compostos antioxidantes (ácido ascórbico e α -tocoferol) não previniu o déficit de aprendizado espacial provocado pela administração do ácido HIV em ratos adultos na tarefa de habituação ao campo aberto.
10. A pré-administração de 0,3 nmol MK-801 não previniu o déficit de aprendizado espacial provocado pela administração intrahipocampal do ácido HIV em ratos adultos na tarefa do campo aberto, porém a administração de 15 nmol de MK-801 provocou déficit de aprendizado nos animais do grupo controle.
11. Ratos adultos administrados intrahipocampalmente com os ácidos HIC, HIV e HMV 10 minutos antes da tarefa da esquiava inibitória apresentaram déficit de aprendizado de memória aversiva.
12. Ratos adultos administrados intrahipocampalmente com o ácido metilmalônico (MMA) 10 minutos antes do treino apresentaram falta de habituação na tarefa não aversiva do campo aberto, refletindo um déficit de aprendizado espacial.
13. A motricidade e a emocionalidade dos animais injetados intrahipocampalmente com o ácido MMA, medidas respectivamente pelo número de cruzamentos e de bolos fecais na sessão de treino da tarefa do campo aberto, não se alterou.
14. Ratos adultos administrados intrahipocampalmente com o ácido MMA 10 minutos antes da tarefa aversiva da esquiava inibitória não apresentaram déficit de aprendizado.
15. A incubação por três horas de fatias de córtex cerebral ou de hipocampo de ratos jovens com os metabólitos ácidos CIC, CIV, CMV, HIC, HIV e HMV

(0,01- 1 mM) não alterou a viabilidade celular medida pelas técnicas de MTT ou de DHL.

16.O CIC provocou uma redução significativa dose-dependente (0,01-1 mM) na captação de glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos jovens da ordem de 50% em relação aos animais não tratados com este metabólito, enquanto os ácidos CIV e CMV não alteraram esse parâmetro.

17. O ácido HVM provocou uma inibição significativa dose-dependente (0,01-1,0 mM) na captação de glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos jovens da ordem de 50% em relação aos animais não tratados com este metabólito, enquanto o ácido HIV provocou um aumento significativo dose-dependente (0,01-1,0mM) na captação de glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos jovens da ordem de 110% em relação aos animais não tratados com este metabólito.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ADVOKAT C.; PELLEGRIN, A.I. Excitatory amino acids and memory: evidence from research on Alzheimer's disease and behavioral pharmacology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, n. 1, p. 13-24, 1992.
- 2) AIGNER, T.G. Pharmacology of memory: cholinergic-glutamatergic interactions. *Current Opinion in Neurobiology*, n. 2, p. 155-160, 1995.
- 3) ALTMAN, H.J.; NORMILE, H.J. What is the nature of the role of the serotonergic nervous system in learning and memory: prospects for development of an effective treatment strategy for senile dementia. *Neurobiology of Aging*, n. 5-6, p. 627-638, 1988.
- 4) AMBRÓSIO, F.A., MALVA, J.O., CARVALHO, A.P., CARVALHO, C.M. Inhibition of N-,P/Q- and others types of Ca²⁺ channels in rat hippocampal nerve terminals by the adenosine A1 receptor. *European Journal of Pharmacology*, n. 340, p. 301-310, 1997.
- 5) ARAÚJO, P.; WASSERMANN, G.F.; TALLINI, K.; FURLANETTO, V.; VARGAS, C.R.; WANNMACHER, C.M.; DUTRA-FILHO, C.S., WYSE, A.T.; WAJNER, M. Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochemistry International*, n. 38, p. 529-537, 2001.
- 6) ASANUMA, H.; KELLER, A. Neuronal mechanisms of motor learning in mammals. *Neuroreport*, n. 5, p. 217-224, 1991.
- 7) BARNES, L.A.; YOUNG, D.G.; NOCHO, R. Methylmalonate excretion in vitamin B12 deficiency. *Science*, n. 5, p. 76-77, 1963.

- 8) BAXTER, M.G., FRICK, K.M., PRICE, D.L., BRECKLER, S.J., MARKOWSKA, A.L., GORMAN, L.K. Presynaptic markers of cholinergic function in the rat brain: relationship with age and cognitive status. *Neuroscience*, n. 3, p. 771-779, 1999.
- 9) BEAUDET, A.L.; SCRIVER, C.H.; SLY, W.S.; VALLE, D.; COOPER, D.N.; MCKUSIK, V.A.; SCHIMIDKE, J. Genetics and Biochemistry of variant human phenotype. In: *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (Eds.), 6^a ed., New York, McGraw-Hill, 1989, p. 3-53.
- 10) BERGMAN, A.J.I.W.; VAN DER KNAPP, M.S.; SMEITINK, A.M.; DURAN, M.; DORLAND, L.; VALK J.; POLL-THE, B.T. Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy of brain in Propionic Acidemia: Clinical and Biochemical. Consideration. *Pediatric Research*, n. 40, p. 404-409, 1996.
- 11) BIRKE, L.I.A.; ARCHER, J. Some issues and problems in the study of animal exploration. In: *Exploration in animals and humans*. BIRKE, L.I.A.; ARCHER, J. (Eds.), Cambridge, University Press, 1983, 279p.
- 12) BLOKLAND, A.L. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Research Brain Research Reviews*, n. 3, p. 285-300, 1995.
- 13) BOHMER, T.; BREMER, J. Propionylcarnitine, Physiological variations *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta*, n. 152, p. 559-567, 1968.
- 14) BOURTCHULADZE, R.; FRENGUELLI, B.; BLENDY, J.; CIOFFI, D.; SCHUTZ, G.; SILVA, A.J. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*, n. 79, p. 59-68, 1994.

- 15) BRIDI, R.; ARALDI, J.; SGARBI, M.B.; TESTA, C.G.; DURIGON, K.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *International Journal of Developmental Neuroscience*, n. 21, p. 327-32, 2003.
- 16) BRIONI, J.D.; MCGAUGH, J.L. Posttraining administration of GABAergic antagonist enhances retention of aversively motivated tasks. *Psychopharmacology*, n. 4, p. 505-510, 1988.
- 17) BRUSQUE, A.M.; ROTTA, L.N.; TAVARES, R.G.; EMANUELLI, T.; SCHWARZBOLD, C.V.; DUTRA-FILHO, C.S.; DE SOUZA WYSE, A.T.; DUVAN WANNMACHER, C.M.; GOMES DE SOUZA, D.O.; WAJNER, M. Effects of methylmalonic and propionic acids on glutamate uptake by synaptosomes and synaptic vesicles and on glutamate release by synaptosomes from cerebral cortex of rats. *Brain Research*, n. 1-2, p. 194-201, 2001.
- 18) BRUSQUE, A.M.; BORBA ROSA, R.; SCHUCK, P.F.; DALCIN, K.B.; RIBEIRO, C.A.; SILVA, C.G.; WANNMACHER, C.M; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T.; BRIONES, P.; WAJNER, M. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochemistry International*, n. 40, p. 593-601, 2002.
- 19) BURTON, B.K. Inborn Errors of Metabolism: the clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics*, n. 79, p. 359, 1987.
- 20) CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; BONINI, J.S.; ROSSATTO, J.I.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, N. Hippocampal glutamate receptors in fear memory consolidation. *Neurotoxicity Research*, n. 6, p. 205-212, 2004.
- 21) CARRASCO, M.A. *Estudo do papel dos opiáceos endógenos nos mecanismos de aprendizado e memória*. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Curitiba, 1983.

- 22) CASTELLANO, C.; PAVONE, F. Effects of ethanol in passive avoidance behavior in the mouse: involvement of GABAergic mechanisms. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, n. 2, p. 321-324, 1988.
- 23) CHALMERS, R.A.; LAWSON, A.M. *Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias*. London, Chapman and Hall, 1982.
- 24) CHOI, D.W. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends in Neurosciences*, n. 11, p. 465-469, 1988.
- 25) CHOI, D.W.; ROTHMAN, S. M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annual Review of Neuroscience*, n. 13, p. 171-182, 1990.
- 26) CHUANG, D.T.; SHIH, V.E. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (Eds.), *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th ed., New York, McGraw-Hill, 2001, p. 1971.
- 27) CHUANG, D.T. Maple syrup urine disease: it has come a long way. *Journal of Pediatrics*, n. 3, p. S17-S23, 1998.
- 28) CLEMENTS, M.P.; BOURNE, R.C. Passive avoidance learning in the day-old chick is modulated by GABAergic agents. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, n. 3, p. 629-634, 1996.
- 29) COITINHO, A.S.; DE MELLO, C.F.; LIMA, T.T.; DE BASTIANI, J.; FIGHERA, M.R.; WAJNER, M. Pharmacological evidence that alpha-ketoisovaleric acid induces convulsions through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *Brain Research*, n. 894, p. 68-73, 2001.
- 30) COOK, K.G.; LAWSON, R.; YEAMAN, S.J. Multi-site phosphorylation of bovine kidney branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex. *FEBS Letters*,

n. 157, p. 59, 1983.

- 31) COUEÉ, I.; TIPTON, K.F. Activation of glutamate dehydrogenase by L-leucine. *Biochimica et Biophysica Acta*, n. 1, p. 97-101, 1989.
- 32) COOK, K.G.; LAWSON, R.; YEAMAN, S.J.; AITKEN, A. Amino acid sequence at the major phosphorylation site on bovine kidney branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex. *FEBS Letters*, n. 164, p. 47, 1983a.
- 33) COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 5^aed., New York, Oxford University Press, 1986.
- 34) COUDE, F.X.; SWEETMAN, L.; NYHAN, W.L. Inhibition by propionyl-Coenzima A of N-Acethyl glutamate synthetase in rat liver Mitochondria. *The Journal of Clinical Investigation*, n. 64, p. 1544-1551, 1979.
- 35) DANCIS, J.; LEVITZ, M.; WESTALL, R.G. Maple syrup urine disease: branched-chain keto-aciduria. *Pediatrics*. n. 25, p. 72-79, 1960.
- 36) DANNER, D.J., LEMMON, S.K., BESHARSE, J.C., ELSAS, L.J. Purification and characterization of branched chain α -ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, n. 254, p. 5522-5526, 1979.
- 37) DANNER, D.J.; ELSAS, L.J. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. SCRIVER C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D. (Eds.), 6th ed., New York, McGraw-Hill, 1989, p. 671-692.
- 38) DAVIS, M., RAINNIE, D., CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends in Neurosciences*, n. 5, p. 208-214, 1994.
- 39) DE MATTOS-DUTRA, A.; FREITAS, M.S.; LISBOA, C.S.F.; PESSOA-PUREUR, R.; WAJNER, M. Effects of acute and chronic administration of

methylmalonic and propionic acids on the in vitro incorporation of ^{32}P into cytoskeletal proteins from cerebral cortex of young rats. *Neurochemistry International*. n. 33, p. 75-82, 1998.

- 40) DE MATTOS-DUTRA, A.; FREITAS, M.S.; SCHRODER, N.; LISBOA, C.S.F.; PESSOA-PUREUR, R.; WAJNER, M. *In Vitro* Phosphorylation of Cytoskeletal proteins in the rat cerebral cortex is decreased by propionic acid. *Experimental Neurology*, n. 147, p. 238-247, 1997.
- 41) DE MELLO, C.F.; BEGNINI, J.; JIMÉNEZ BERNAL, R.E.; RUBIN, M.A.; DE BASTIANI, J.; DA COSTA, J.R.E.; WAJNER, M. Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavioral and convulsion through glutamatergic mechanisms. *Brain Research*, n. 721, p. 120-125, 1996.
- 42) DE QUERVAIN, D.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J.L. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long –term spatial memory. *Nature*, n. 6695, p.787-790, 1998.
- 43) DE SOUZA, C.; PIESOWICZ, A.T.; BRETT, E.M.; LEONARD, J.V. Focal changes in the globi pallidi associated with neurological dysfunction in methylmalonic acidaemia. *Neuropediatrics*, n. 20, p. 199-201, 1989.
- 44) DE WIED, D.; VAN REE, J.M. Neuropeptides, mental performance and aging. *Life Sciences*, n. 8, p. 709-719, 1982.
- 45) DEL RIO, R.M. *Aminoacidopatias congenitas y sus repercusiones en el desarrollo del SNC*, Madrid, 1962.
- 46) DINGLEDINE, R.; MCBAIN, C.J. Glutamate and Aspartate. In: *Basic Neurochemistry – Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. DINGLEDINE, R.; MCBAIN, C.J. (Eds.), 6^a ed., Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1999, p. 315-333.

- 47) DODD, P.R.; WILLIAMS, S.H.; GUNDLACH, A.L.; HARPER, P.A.W.; HEALY, P.J.; DENNIS, J.A.; JOHNSTON, G.A.R. Glutamate and γ -aminobutyric acid neurotransmitter systems in the acute phase of maple syrup urine disease and citrullinemia encephalopathies in newborn calves. *Journal of Neurochemistry*, n. 59, p. 582-590, 1992.
- 48) DUAN, S.; ANDERSON, C.M.; STEIN, B.A.; SWANSON, R.A. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *The journal of Neuroscience*, n. 23, p. 10193-10200, 1999.
- 49) DUTRA, J.C.; DUTRA-FILHO, C.S.; CARDOZO, S.E.; WANNMACHER, C.M.D.; SARKIS, J.J.; WAJNER M. Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. *Journal of Inherited Metabolical Disease*, n. 16, p. 147-153, 1993.
- 50) DUTRA, J.C.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.F.; DUTRA-FILHO, C.S.; WANNMACHER, C.M.D. Effect of methylmalonate and propionate on uptake of glucose and ketone bodies in vitro by brain of developing rats. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, n. 45, p. 56-64, 1991a.
- 51) DUTRA, J.C.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WANNMACHER, L.E.; PIRES, R.F.; ROSA-JUNIOR, G. Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, n. 24, p. 595-605, 1991.
- 52) EISENSTEIN, R.S.; HOGANSON, G.; MILLER, R.H.; HARPER, A.E. Altered phosphorylation state of branched-chain acyltransferase deficient human fibroblast cell line. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, n. 14, p. 37-45, 1991.
- 53) ERECINSKA, M.; NELSON, D. Activation of glutamate dehydrogenase by leucine and its nonmetabolizable analogue in rat brain synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*, n. 4, p. 1335-1343, 1990.

- 54) ETEROVIC, V.A.; TORRES, E.; FERCHMIN, P.A. Spermine does not compete with omega-conotoxin GVIA in the stratum radiatum of the hippocampal slice. *Brain Research*, n. 1-2, p. 191-202, 1997.
- 55) FADEN, A.I.; DEMEDIUK, P.; PANTER, S.S.; VINK, R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*, n. 4906, p. 798-800, 1989.
- 56) FANSELOW, M.S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behavioral Brain Research*, n. 1-2, p. 73-81, 2000.
- 57) FEDELE, E.; RAITERI, M. In vivo studies of the cerebral glutamate receptor/NO/cGMP pathway. *Progress in Neurobiology*, n. 1, p. 89-120, 1999.
- 58) FENTON, W.A.; GRAVEL R.A.; ROSENBLATT, D.S. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SKY, W.S.; VALLE, D. (Eds.), 8^a ed., New York, McGraw-Hill, 2001, p. 2165- 2194.
- 59) FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; ESCORIHUELA, R.M.; NÚÑEZ, J.F.; ZAPATA, A.; BOIX, F.; SALAZAR, W.; TOBEÑA, A. The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behavior: Psychopharmacological validation. *Brain Research Bulletin*, n. 26, p. 173-176, 1991.
- 60) FIGHERA, M.R.; QUEIROZ, C.M.; STRACKE, M.P.; BRAUER, M.C.N.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, L.L.; FRUSSA-FILHO, R.; WAJNER, M.; MELLO, C.F. Ascorbic acid and α -tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. *Neuroreport*, n. 10, p. 2039-2043, 1999.
- 61) FISCHER, M.H.; GERRITSEN, T. Biochemical studies on a variant of branched chain ketoaciduria in a 19-year-old female. *Pediatrics*, n. 48, p. 795, 1971.
- 62) FONTELLA, F.U.; GASSE, E.; PULRONIK, V.; WANNMACHER, C.M.; KLEIN, A.B.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. Stimulation of lipid

peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metabolic Brain Disease*, n. 17, p. 47-54, 2002.

- 63) FRIZZO, M.E.; SCHWARZBOLD, C.; PORCIUNCULA, L.O.; DALCIN, K.B.; ROSA, R.B.; RIBEIRO, C.A.; SOUZA, D.O.; WAJNER, M. 3-hydroxyglutaric acid enhances glutamate uptake into astrocytes from cerebral cortex of young rats. *Neurochemistry International*, n. 5, p. 245-253, 2004.
- 64) FUNCHAL, C.; DALL BELLO PESSUTTO, F.; DE ALMEIDA, L.M.; DE LIMA PELAEZ, P.; LOUREIRO, S.O.; VIVIAN, L.; WAJNER, M.; PESSOA-PUREUR, R. Alpha-keto-beta-methylvaleric acid increases the in vitro phosphorylation of intermediate filaments in cerebral cortex of young rats through the gabaergic system. *Journal of the Neurological Sciences*, n. 217, p. 17-24, 2004a.
- 65) FUNCHAL, C.; DE LIMA PELAEZ, P.; LOUREIRO, S.O.; VIVIAN, L.; DALL BELLO PESSUTO, F.; DE ALMEIDA, L.M.; TCHERNIN WOFCHUK, S.; WAJNER, M.; PESSOA PUREUR, R. Alpha-Ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediate filaments in postnatal rat cortical slices through ionotropic glutamatergic receptors. *Brain Research Developmental Brain Research*, n. 139, p. 267-276, 2002.
- 66) FUNCHAL, C.; ROSA, A.M.; WAJNER, M.; WOFCHUCK, S.; PUREUR, R.P. Reduction of glutamate uptake into cerebral cortex of developing rats by the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochemical Research*, n. 29, p. 747-753, 2004.
- 67) GARROD, A.E. Inborn errors of metabolism. *Lancet*, n. 2, p. 1, 1908.
- 68) GARROD, A.E. *Inborn errors of metabolism*. Oxford, Oxford University Press, 1909.
- 69) GASIC, G.P.; HOLLMANN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annual Review of Physiology*, n. 54, p. 507-536, 1992.

- 70) GIBSON, G.E.; BLASS, J.P. Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohydrate utilization by maple syrup urine disease metabolites. *Journal of Neurochemistry*, n. 26, p. 1073-1078, 1976.
- 71) GLASGOW, A.M.; CHASE, P. Effect of Propionic Acid on Fatty Acid oxidation and ureagenesis. *Pediatric Research*, n. 19, p. 633-686, 1976.
- 72) GOLD, P.E. Memory modulation: Roles of peripheral catecholamines. In: *Neuropsychology of memory*. SQUIRE, L.R.; BUTTER, N. (Eds.), New York, Guilford, 1984. p. 566-578.
- 73) GOLD, P.E.; MCGAUGH, J.L. A single-trace, dual-process view of memory storage processes. In: *Short-term memory*. DEUTSCH, D.; DEUTSCH, J.A. (Eds.), New York, Academic Press, 1975, p. 356-378.
- 74) GOLD, P.E.; MCGAUGH, J.L. Neurobiology and Memory: Modulators, Correlates and Assumptions. In: *Brain and Learning*. TEYLER, T. (Ed.), Stamford, Greylock Publishers, 1978. p. 93-103.
- 75) GOLD, P.E.; ZORNETZER, S.F. The mnemon and its juices: neuromodulation of memory processes. *Behavioral and Neural Biology*, n. 2, p. 151-189, 1983.
- 76) GONZALES-RIOS, M.D.C.; CHUANG, D.T.; COX, R.P.; SCHMIDT, K.; KNOPF, K.; PACKMAN, S. A distinct variant of intermediate maple syrup urine disease. *Clinical Genetics*, n. 27, p. 153, 1985.
- 77) GOOSENS, K.A.; MAREN, S. Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learning & Memory*, n. 3, p. 148-155, 2001.
- 78) GREENAMYRE, J.T.; PORTER, R.H.P. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology*, n. 44 (Suplemento 8), S7-S12, 1994.

- 79) GREENE, J.P.; GREENAMYRE, J.T. Bioenergetics and excitotoxicity: the weak excitotoxic hypothesis. In: *Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson's disease*. OLANOW, C.W.; JENNER, P.; YOUDIM, M. (Eds.), London, Academic Press, p. 125-142, 1996.
- 80) GREGERSEN, N. The specific inhibition of the pyruvate dehydrogenase complex from pig kidney by propionyl-CoA and isovaleryl-CoA. *Biochemical Medicine*, n. 26, p. 20-27, 1981.
- 81) HALESTRAP, A.P.; BRAND, M.D.; DENTON, R.M. Inhibition of mitochondrial pyruvate transport by phenylpyruvate and α -Ketoisocaproate. *Biochimica et Biophysica Acta*, n. 367, p. 102– 108, 1974.
- 82) HANSEN, M.; NIELSEN, S.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*, n. 119, p. 203-210, 1989.
- 83) HASSELMO, M.E.; ANDERSON, B.P.; BOWER, J.M. Cholinergic modulation of cortical associative memory function. *Journal of Neurophysiology*, n. 5, p. 1230-1246, 1992.
- 84) HEIDENREICH, R.; NATOWICZ, M.; HAINLINE, B.E.; BERMAN, P.; KELLEY, R.I.; HILLMAN, R.E.; BERRY, G.T. Acute extrapyramidal syndrome in methylmalonic acidemia: "Metabolic stroke" involving the globus pallidus. *Journal of Pediatrics*, n. 113, p. 1022-1027, 1988.
- 85) HOLSCHER, C. Time, space and hippocampal functions. *Reviews in the Neurosciences*, n. 14, p. 253-284, 2003.
- 86) HOWELL, R.K.; LEE, M. Influence of α -keto acids on the respiration of brain in vitro, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, n. 113, p. 660– 663, 1963.

- 87) HUANG, Y.; ZIELKE, H.R.; TILDON, J.T.; ZIELKE, C.L.; BAAB, P.J. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: leucine infusion. *Developmental Neuroscience*, n. 5-6, p. 415-419, 1996.
- 88) ICHIHARA, K.; NABESHIMA, T.; KAMEYAMA, T. Effects of dopamine receptor agonists on passive avoidance learning in mice: interaction of dopamine D₁ e D₂ receptors. *European Journal of Pharmacology*, n. 213, p. 243-249, 1992.
- 89) INTROINI-COLLISON, I.B.; BARATTI, C.M. Ephinefrine mudolates lon term retention of an aversively motivated descrimination. *Behavioral and Neural Biology*, n.2, p. 227-241, 1986.
- 90) IZQUIERDO, I. Aprendizaje y memoria. In: *Fisiologia Humana*. CINGOLANI, H.E.; HOUSSAY, A.B. (Eds.), Buenos Aires, El Ateneo, 1989a, p. 311-319.
- 91) IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. *Behavioral and Neural Biology*, v. 51, p. 171-202, 1989.
- 92) IZQUIERDO, I. Effect of naloxone and morphine on various forms of memory of the rat: Possible role of endogenous opiates in memory consolidation. *Psychopharmacology*, v. 66, p. 199-203, 1979.
- 93) IZQUIERDO, I. Effects of a low and a high dose of b-endorphin on acquisition and retention in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, v. 30, p. 460-464, 1980.
- 94) IZQUIERDO, I. Endogenous state dependency: memory depends on the relation between the neurohumoral and hormonal states present after training and at the time testing. In: *Neurobiology of Learning and Memory*. LYNCH, G.; MCGAUGH, J.L.; WEINBERGER, N.M. (Eds.), New York, Guilford, 1984, p. 333-350.
- 95) IZQUIERDO, I. Role of NMDA receptors in memory. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 12, p. 128-129, 1991.

- 96) IZQUIERDO, I. Role of opioid peptides in learning, memory and retrieval. In: Centrally Acting Peptides. DHAWAN, B.N. (Ed.), New York, Pergamon Press, 1982a, p. 93-100.
- 97) IZQUIERDO, I. The neurobiology of memory consolidation. *Neuroscience*, n. 18, p. 1-11, 1992.
- 98) IZQUIERDO, I. The role of an endogenous amnesic mechanism mediated by brain beta-endorphin in memory modulation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, n. 2-3, p. 119-134, 1982.
- 99) IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; HUANG, C.H.; WALZ, R.; WOLFMAN, C.; MEDINA, J.H. Post-training down-regulation of memory consolidation by a GABA-A mechanism in the amygdala modulated by endogenous benzodiazepines. *Behavioral and Neural Biology*, v. 54, p.105-109, 1990.
- 100) IZQUIERDO, I.; DIAS, R.D. Effect of ACTH, epinephrine, beta-endorphin, naloxone, and of the combination of naloxone or beta-endorphin with ACTH or epinephrine on memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, n. 1, p. 81-87, 1983.
- 101) IZQUIERDO, I.; DIAS, R.D. Endogenous state-dependency: memory regulation by post-training and pre-testing administration of ACTH, beta-endorphin, adrenaline and tyramine. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 16, p. 55-64, 1983a.
- 102) IZQUIERDO, I.; DIAS, R.D. Memory as a state dependent phenomenon: Role of ACTH and epinephrine. *Behavioral and Neural Biology*, n. 38, p. 144-149, 1983b.
- 103) IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. GABA-A receptor modulation of memory: The role of endogenous benzodiazepines. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 12, p. 260-265, 1991.

- 104)** IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, n. 68, p. 285-316, 1997.
- 105)** IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; DA CUNHA, C.; WOLFMAN, C.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M.B.C. Memory modulation by brain benzodiazepines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 24, p. 865-881, 1991.
- 106)** IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; JERUSALINSKY, D.L.; DA CUNHA, C. Post-training memory processing in amygdala, septum and hippocampus: role of benzodiazepine gaba/A receptors, and their interaction with other neurotransmitter systems. *Reviews in the Neurosciences*, n. 1, p. 11-23, 1992.
- 107)** IZQUIERDO, I.; QUILLFELDT, J.A.; ZANATTA, M.S.; QUEVEDO, J.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P.K.; MEDINA, J.H. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *The European Journal of Neuroscience*, n. 4, p. 786-793, 1997.
- 108)** IZQUIERDO, L.A.; SCHRÖDER, N.; ARDENGHI, P.; QUEVEDO, J.; BEVILAQUA, L.; NETTO, C.A.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Systemic administration of ACTH or vasopressin in rats reverses the amnesic effect of posttraining β -endorphin but not that of intrahippocampal infusion of protein kinase inhibitors. *Neurobiology of Learning and Memory*, n. 68, p. 197-202, 1997.
- 109)** JAN, W.; ZIMMERMAN, R.A.; WANG, Z.J.; BERRY, G.T.; KAPLAN, P.B.; KAYE, E.M. MR diffusion imaging and MR spectroscopy of maple syrup urine disease during acute metabolic decompensation. *Neuroradiology*. n. 45, p. 393-399, 2003.
- 110)** JERUSALINSKY, D.; FIN, C.; QUILLFELDT, J.A.; FERREIRA, M.B.C.; SCHMITZ, P.K.; DA SILVA, R.C.; WALZ, R.; BAZAN, N.G.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Effect of antagonists of platelet-activating factor receptors on

memory of inhibitory avoidance in rats. *Behavioral and Neural Biology*, n.1, p.1-3, 1994.

- 111)** JOUVET, P.; KOZMA, M.; MEHMET, H. Primary human fibroblasts from a maple syrup urine disease patient undergo apoptosis following exposure to physiological concentrations of branched chain amino acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, n. 26, p. 116-121, 2000.
- 112)** JOUVET, P.; RUSTIN, P.; TAYLOR, D.L.; POCOCK, J.M.; FELDERHOFF-MUESER, U.; MAZARAKIS, N.D.; SARRAF, C.; JOASHI, U.; KOZMA, M.; GREENWOOD, K.; EDWARDS, A.D.; MEHMET, H. Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. *Molecular Biology of the Cell*. n. 11, p. 1919-1932, 2000a.
- 113)** KLEIJER, W.J.; WORSMAN, D.; MANCINI, G.M.; FOIS, A.; BOUE, J. First-trimester diagnosis of maple syrup urine disease on intact chorionic villi. *New England Journal of Medicine*, n. 25, p. 1608, 1985.
- 114)** KORF, B.; WALLMAN, J.K.; LEVY, H.L. Bilateral lucency of the globus pallidus complicating Methylmalonic acidemia. *Annals of Neurology*, n. 3, p. 364-366, 1986.
- 115)** KOVÁCS, G.L.; DE WIED, D. Peptidergic modulation of learning and memory processes. *Pharmacological Reviews*, n. 3, p. 269-291, 1994.
- 116)** LA DU, B.N.; ZANNONI, V.G.; LASTER, L.; SEEGMILLER, J.E. The nature of the defect in tyrosine metabolism in alcaptonuria. *The Journal of Biological Chemistry*, n. 230, p. 251-260, 1958.
- 117)** LAND, J.M.; MOWBRAY, J.; CLARK, J.B. Control of pyruvate and h-hydroxybutyrate utilization in rat brain mitochondria and its relevance to

phenylketonuria and maple syrup urine disease. *Journal of Neurochemistry*, n. 26, p. 823–830, 1976.

- 118)** LAU, K.S.; PHILIPS, C.E.; RANDLE, P.J. Multi-site phosphorylation in ox-kidney branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex. *FEBS Letters*, n. 160, p. 149, 1983.
- 119)** LEHNERT, W.; SPERL, W.; SUORMALA, T.; BAUMGARTNER, E.R. Propionic acidaemia: clinical, biochemical and therapeutic aspects. Experience in 30 patients. *European Journal of Pediatrics*, n. 153 (suplemento 1), p. S68-S80, 1994.
- 120)** LIPTON, S.A.; ROSENBERG, M.D. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England Journal of Medicine*, n. 9, p. 613-622, 1994.
- 121)** LIPTON, S.A. Molecular mechanisms of trauma-induced neuronal degeneration. *Current Opinion in Neurology and Neurosurgery*, n. 4, p. 588-596, 1993.
- 122)** LO, D. Animal models of disease and basic science. *Hormone and Metabolic Research*, n. 28, p. 296, 1996.
- 123)** LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, n. 1, p. 265-75, 1951.
- 124)** MACIEL, E.N.; KOWALTOWSKI, A.J.; SCHWALM, F.D.; RODRIGUES, J.M.; SOUZA, D.O.; VERCESI, A.E.; WAJNER, M. CASTILHO R.F. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca²⁺ and respiratory chain complex II inhibition. *Journal of Neurochemistry*, n. 5, p. 1025-1035, 2004.
- 125)** MARKOWITSCH, H.J.; PRITZEL, M. The neuropathology of amnesia. *Progress in Neurobiology*, n. 3, p.189-287, 1985.

- 126)** MASSACHUSETTS Department of Public Health. Newborn Screening for metabolic disorders. *The New England Journal of Medicine*, n. 288, p. 1299-1300, 1994.
- 127)** MAYATEPEK, E.; HOFFMANN, G.F.; BAUMGARTNER, R.; SCHULZE, A.; JAKOBS, C.; TREFZ, F.K.; BREMER, H.J. Atypical vitamin B₁₂ -unresponsive methylmalonic aciduria in a sibship with severe progressive encephalomyopathy: a new genetic disease? *European Journal of Pediatrics*, n. 155, p. 398-403, 1996.
- 128)** MCEWEN, B.S. Adrenal Steroid Actions on Brain: Dissectin the Fine Line between Protection and Damage. In: *Neurobiological and Clinical Consequences of Stress From Normal Adaptation to PTSD*. FRIEDMAN, M.J.; CHARPEY, D.S.; DEUTCH, A.Y. (Eds.), Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1995, p. 135-147.
- 129)** MCEWEN, B.S.; SAPOLSKY, R.M. Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology*, n.5, p.205-216, 1995
- 130)** MCGAUGH, J.L. Modulation of memory storage processes. In: *Perspectives of Memory Research*. SOLOMON, P.R., GOETHALS, G.R.; KELLEY, C.M.; STEPHENS, B.R., (Eds.), New York, Springer-Verlag, 1988. p. 33-64.
- 131)** MCGAUGH, J.L. Dissociating learning and performance: drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain Research Bulletin*, n. 23, p. 339-345, 1989b
- 132)** MCGAUGH, J.L. *Facilitation of memory storage processes*. In: BOGOCH, S. (Ed.). New York, Plenum Press, 1969, p. 355-370.
- 133)** MCGAUGH, J.L. Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annual Review of Neuroscience*, v. 12, p. 255-287, 1989a.

- 134)** MCGAUGH, J.L. Time-dependent processes in memory storage. *Science*, v. 153, p. 1351-1358, 1966.
- 135)** MCGAUGH, J.L.; CAHILL, L. Interaction of neuromodulatory systems in modulating memory storage. *Behavioural Brain Research*, n. 1-2, p. 31-38, 1997.
- 136)** MCGAUGH, J.L.; HERZ, M.Z. *Memory Consolidation*. San Francisco, Albion Publishing Company, 1972.
- 137)** MCGAUGH, J.L.; INTROINI-COLLISON, I.B.; CAHILL, L.F.; CASTELLANO, C.; DALMAZ, C.; PARENT, M.B.; WILLIAMS, C.L. Neuromodulatory systems and memory storage: role of the amygdala. *Behavioural Brain Research*, n.1-2, p. 81-90, 1993.
- 138)** MCGAUGH, J.L.; LIANG, K.C.; BENNETT, C.; STERNBERG, D.B. Adrenergic influences on memory storage: Interaction of peripheral and central systems. In: *Neurobiology of learning and memory*. LINCH, G.; MCGAUGH, J.L.; WEINBERGER, N.M. (Eds.), New York, 1984, p. 312-332.
- 139)** McKUSICK, V.A. *Mendelian inheritance in man. Catalogs of human genes and genetic disorders*. 12^a ed., Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 1998.
- 140)** MCLAUGHLIN, B.A.; NELSON, D.; SILVER, I.A.; ERESCINSKA, M.; CHESSELET, M.F. Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience*, n. 86, p. 279-290, 1998.
- 141)** MEANEY, M.J.; O'DONNELL, D.; ROWE, W.; TANNENBAUM, B.; STEVERMAN, A.; WALKER, M.; NAIR, N.P.; LUPIEN, S. Individual differences in hypothalamic-pituitary-adrenal activity in later life and hippocampal aging. *Experimental Gerontology*, n. 3-4, p. 229-251, 1995.

- 142) MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, n. 11, p. 379-387, 1990.
- 143) MELDRUM, B.S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology*, n. 44 (suplemento 8): p. S14-S22, 1994.
- 144) MELLO, C.F.; BEGNINI, J.; JIMÉNEZ BERNAL, R.E.; RUBIN, M.A.; DE BASTIANI, J.; DA COSTA, J.R.E.; WAJNER, M. Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavioral and convulsion through glutamatergic mechanisms. *Brain Research*, n. 721, p. 120-125, 1996.
- 145) MELLO, C.F.; FEKSA, L.; BRUSQUE, A.M.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M. Chronic early leucine administration induces behavioral deficits in rats. *Life Sciences*, n. 8, p. 747-755, 1999.
- 146) MELLO, C.F.; SOMMER, J.; TAVARONI, V.; GRACIOLLI, R.; WU, V.; TORRES, G.; AGUIAR, C.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M. Effects of postnatal methylmalonate administration on neurobehavioral development of rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, n. 27, p. 655-661, 1994.
- 147) MENKES, J.H. Maple syrup urine disease. Isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics*, n. 23, p. 348, 1959.
- 148) MENKES, J.H.; HURST, P.L.; CRAIG, J.M. A new syndrome: Progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics*, n. 14, p. 462, 1954.
- 149) MINICHELLO, L.; KORTE, M.; WOLFER, D.; KUHN, R.; UNSICKER, K.; CESTARI, V.; ROSSI-ARNAUD, C.; LIPP, H.P.; BONHOEFFER, T.; KLEIN, R. Essential role for TrkB receptors in hippocampus mediated learning. *Neuron*, n. 24, p. 401-414, 1999.

- 150)** MISHKIN, M.; MALAMUT, B.; BACHEVALIER, J. Memories and habits: two neural systems. In: *Neurobiology of Learning and Memory*. LYNCH, G.; MCGAUGH, J.L.; WEINBERGER, N.M. (Eds.), New York, 1984, p. 65-77.
- 151)** MORRIS, R.G.M.; ANDERSON, E.; LYNCH, G.S.; BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP-5. *Nature*, v.319, p.774-776, 1986.
- 152)** MOSER, M.B.; MOSER, E.I. Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, n. 18, p. 7535-7542, 1998.
- 153)** MOSIMANN, R.; IMBODEN, H.; FELIX, D. The neuronal role of angiotensin II in thirst, sodium appetite, cognition and memory. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, n. 4, p. 545-559, 1996.
- 154)** MULLER, H.; BICKEL, H.; FEIST, D.; LUTZ, P. Maple syrup urine disease with an intermittent relatively benign course. *Verlauf. Deutsche Medizinische Wochenschrift*, n. 96, p. 1552, 1971.
- 155)** NAGAHARA, A.H.; MCGAUGH, J.L. Muscimol infused into the medial septal area impair long-term memory but not short-term memory in inhibitory avoidance, water maze place learning and rewarded alternation tasks. *Brain Research*, n. 591, p. 54-61, 1992.
- 156)** NAKANISHI, S.; NAKAJIMA, Y.; MASU, M.; UEDA, Y.; NAKATARA, K.; WATANABE, D.; YAMAGUCHI, S.; KAWABATA, S.; OKADA, M. (1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Research Brain Research Reviews*, n. 26, p. 230-235, 1998.
- 157)** NAYLOR, E.W. Newborn screening for maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: *Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism*. BICKEL, H.; GUTHRIE, R.; HAMMERSEN, G. (Eds.), Berlin, Springer-Verlag, 1980, p. 19.

- 158)** NETTO, C.A.; OLIVEIRA, C.B.; GIANLUPI, A.; QUILLFELDT, J.; IZQUIERDO, I. β -Endorphin and electroconvulsive shock alter the retrieval of two avoidance tasks when given after the first, but not the second, training session. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, n. 22, p. 199-204, 1989.
- 159)** NOBUKUNI, Y.; MITSUBUCHI, H.; OHTA, K.; AKABOSHI, I.; INDO, Y.; ENDO, F.; MATSUDA, I. Molecular diagnosis of maple syrup urine disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, n. 15, p. 827-833, 1992.
- 160)** OBERHOLZER, V.G.; LEVIN, B.; BURGESS, E.A.; YOUNG, W.F. Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. *Archives of Disease in Childhood*, n. 42, p. 492-504, 1967.
- 161)** OKUN, J.G.; HÖRSTER, F.; FARKAS, L.; FEYH. P.; HINZ, A.; SAUER, S.; HOFFMANN, G.F.; UNSICKER, K.; MAYATEPEK, E.; KÖLKER, S. Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, n. 277, p. 14674–14680, 2002.
- 162)** ORLANDO, M.; FIORI, A.; COSTA, M. Methylmalonic aciduria and vitamin B12 deficiency in the rat. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, n. 19, p. 383-388, 1973.
- 163)** OVERSTREET, D.H. Behavioural plasticity and the cholinergic system. *Progress in Neuro Psychopharmacology Biological Psychiatry*, n. 1, p. 133-151, 1984.
- 164)** OVERTON, D.A. Experimental methods for the study of state dependent learning. *Federation Proceedings*, v. 33, p. 1800-1813, 1974.
- 165)** OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, n. 54, p. 581-618, 1998.

- 166)** PANTEN, U.; KRIGSTEIN, W.V.; POSER, W.; SCHONBORN, J.; HASSELBLATT, A. Effects of L-leucine and α -ketoisocaproic acid upon insuline secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS letters*, n. 20, p. 225, 1972.
- 167)** PARRELLA, T.; SURREY, A.; IOLASCON, A.; SARTORE, M.; HEIDENREICH, R.; DIAMOND, G.; PONZONE, A.; GUARDAMAGNA, O.; BURLINA, A.B.; CERONE, R.; PARINI, R.; DIONISI-VICI, C.; RAPPAPORT, E.; FORTINA, P. Maple syrup urine disease (MSUD): screening for known mutations in italian patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, n. 17, p. 652-660, 1994.
- 168)** PATEL, M.S.; OWEN, O.E.; RAEFSKY, C. Effect of methylmalonate on ketone body metabolism in developing rat brain. *Life Sciences*, n. 19, p. 41-47, 1976.
- 169)** PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2^a ed., Sydney, Academic Press, 1986.
- 170)** PAXTON, R.; KUNTZ, M.; HARRIS, R.A. Phosphorylation sites and inactivation of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase isolated from rat heart, bovine kidney, and rabbit liver, kidney, heart, brain and skeletal muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, n. 244, p. 187, 1986.
- 171)** PEINEMANN, F.; DANNER, D.J. Maple syrup urine disease 1954-1993. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, n. 17, p. 3-15, 1994.
- 172)** PESSOA-PUREUR, R.; FUNCHAL, C.; DE LIMA PELAEZ, C.; VIVIAN, L.; OLIVEIRA LOUREIRO, S.; DE FREITAS MIRANDA, R.; WAJNER, M. Effect of the branched-chain alpha-ketoacids accumulating in maple syrup urine disease on the high molecular weight neurofilament subunit (NF-H) in rat cerebral cortex. *Metabolic Brain Disease*, n. 17, p. 65-75, 2002.
- 173)** PETTENUZZO, L.F.; SCHUCK, P.F.; WYSE, A.T.; WANNMACHER, C.M.;

DUTRA-FILHO, C.S.; NETTO, C.A.; WAJNER, M. Ascorbic acid prevents water maze behavioral deficits caused by early postnatal methylmalonic acid administration in the rat. *Brain Research*, n. 976, p. 234-242, 2003.

174) PILLA, C.; CARDOZO, R.F.; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochemical Research*, n. 28, p. 675-679, 2003.

175) QUILLFELDT, J.A. *O papel dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na expressão da memória no córtex entorrinal e estruturas relacionadas*. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

176) QUIRARTE, G.L., GALVEZ, G.L., ROOZENDAAL, B., MCGAUGH, J.L. Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Research*, n. 2, p. 134-140, 1998.

177) REED, L.J., HACKERT, M.L. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, n. 265, p. 8971-8974, 1990.

178) REGAN, R.F.; CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity in spinal cord cell culture, *Neuroscience*, n. 2-3, p. 585-591, 1991.

179) REIS, M.; FARAGE, M.; WOLOSKER, H. Chloride-dependent inhibition of vesicular glutamate uptake by alpha-keto acids accumulated in maple syrup urine disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, n. 2, p. 114-118, 2000.

180) REMPEL-CLOWER, N.L.; ZOLA, S.M.; SQUIRE, L.R.; AMARAL, D.G. Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *The Journal of Neuroscience*, n. 16, p. 5233-5255, 1996.

- 181)** RIEDEL, G.; MICHEAU, J.; LAM, A.G.; ROLOFF, E.L.; MARTIN, S.J.; BRIDGE, H.; DE HOZ, L.; POESCHEL, B.; MCULLOCH, J.; MORRIS, R.G. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nature Neuroscience*, n. 10, p. 898-905, 1999.
- 182)** ROGERS, Q.R.; SPOLTER, P.D.; HARPER, A.E. Effect of leucine-isoleucine antagonism on plasma amino acid pattern of rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, n. 97, p. 497, 1962.
- 183)** ROODHOOFT, A.M.; BAUMGARTHER, E.R.; MARTIN, J.J.; BLOM, W.; VAN ACKER, K.J. Symmetrical necrosis of the basal ganglia in methylmalonic acidemia. *European Journal of Pediatrics*, n. 149, p. 582-584, 1990.
- 184)** ROTHMAN, S.M. Excitoxins: Possible mechanisms of action. *Annals of the New York Academy of Sciences*, n. 648, p. 132-139, 1992.
- 185)** ROTHMAN, S.M.; OLNEY, J.W. Excitatory and the NMDA receptor. *Trends in Neurosciences*, n. 10, p. 299-302, 1987.
- 186)** ROTHSTEIN, J.D.; DYKES-HOBERG, M.; PARDO, C.A. Knockout of glutamate transporter reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, n. 16, p. 675-686, 1996.
- 187)** ROYES, L.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; DA SILVA, L.G.; MALFATTI, C.R.; SCHNEIDER, P.H.; BRAGA, A.L.; WAJNER, M.; MELLO, C.F. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience*, n. 4, p. 1079-1090, 2003.
- 188)** SAHGAL, A.; MASON, J. Drug effects on memory: assessment of a combined active and passive avoidance task. *Behavioural Brain Research*, n. 17, p. 251-255, 1985.

- 189)** SALINAS, J.A.; MCGAUGH, J.L. The amygdala modulates memory for changes in reward magnitude: involvement of the amygdaloid GABAergic system. *Behavioral Brain Research*, n. 1-2, p. 87-98, 1996.
- 190)** SCHACTER, D.L. *Stranger Behind the Engram – Theories of Memory and the Psychology of Science*, Hillsdale, Lawrence Erlbaum Associate, 1982.
- 191)** SCHADEWALDT, PL; WENDEL. U. Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *European Journal of Pediatrics*, n. 156 (suplemento 1), p. S62-S66, 1997.
- 192)** SCHADEWALDT, PL; HAMMEN, H.W.; DALLE-FESTE, C.; WENDEL. U. On the mechanism of L-alloisoleucine formation: studies on a healthy subject and in fibroblasts from normals and patients with maple syrup urine disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, n. 2, p. 137-150, 1989.
- 193)** SCHONBERGER, S.; SCHWEIGER, B.; SCHWAHN, B.; SCHWARZ, M.; WENDEL, U. Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, n. 82, p. 69-75, 2004.
- 194)** SCHUCK, P.F.; ROSA, R.B.; PETTENUZZO, L.F.; SITTA, A.; WANNMACHER, C.M; WYSE, A.T.; WAJNER, M. Inhibition of mitochondrial creatine kinase activity from rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochemistry International*, n. 45, p. 661-667, 2004.
- 195)** SCHULZ, B.; FENDT, M.; GASPARINI, F.; LINGENHOHL, K.; KUHN, R.; KOCH, M. The metabotropic glutamate receptor antagonist 2-methyl-7-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) blocks fear conditioning in rats. *Neuropharmacology*, n. 41, p. 1-7, 2001.
- 196)** SCHÜTZ, R.A.; IZQUIERDO, I. Effect of brain lesions on rat shuttle behavior in four different tests. *Physiology Behavior*, n. 1, p. 97-105, 1979.

- 197) SCRIVER, C.R.; BEAUDET A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8^a ed., New York, McGraw-Hill Inc., 2001.
- 198) SETLOW, B.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J.L. Involvement of a basolateral amygdale complex-nucleus accumbens pathway in glucocorticoid-induced modulation of memory consolidation. *The European Journal of Neuroscience*, n. 1, p. 367-375, 2000.
- 199) SGARAVATTI, A.M.; ROSA, R.B.; SCHUCK, P.F.; RIBEIRO, C.A.; WANNMACHER, C.M.; WYSE, A.T.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M. Inhibition of brain energy metabolism by the alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, n. 1639, p. 232-238, 2003.
- 200) SHEN, M.; THAYER, S.A. The cannabinoid agonist Win55,212-2 inhibits calcium channels by receptor-mediated and direct pathways in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Research*, p. 77-84, 1998.
- 201) SHIGEMATSU, Y.; KIKUCHI, K.; MOMOI, T.; SUDO, M.; KIKAWA, Y.; NOSAKA, K.; KURIYAMA, M.; HARUKI, S.; SANADA, K.; HAMANO, N. et al. Organic acids and branched-chain amino acids in body fluids before and after multiple exchange transfusions in maple syrup urine disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, n. 6, p. 183-189, 1983.
- 202) SINCLAIR, L.A. A new look at the inborn errors of metabolism. *Annals of Clinical Biochemistry*, n. 19, p. 314-21, 1982.
- 203) SIRVIO, J.; LARSON, J.; QUACH, C.N.; ROGERS, G.A.; LYNCH, G. Effects of pharmacologically facilitating glutamatergic transmission in the trisynaptic intrahippocampal circuit. *Neuroscience*, n. 4, p. 1025-1035, 1996.
- 204) SNYDERMAN, S.E.; NORTON, P.M.; ROITMAN, E.; HOLT LE Jr. Maple syrup urin disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics*, n. 34, p. 454-472, 1964.

- 205) SQUIRE, L.R. *Memory and Brain*. New York, Oxford University Press, 1987.
- 206) SQUIRE, L.R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, n. 2, p. 195-231, 1992.
- 207) STEELE, R.J.; MORRIS, R.G. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA antagonist D-AP5. *Hippocampus*, n. 2, p. 118-136, 1999.
- 208) STEWART, P.M.; WALSER, M. Failure of the normal ureagenic response to amino acids in organic acid loaded rats. Proposed mechanism for the hiperamonemia of propionic and methylmalonic acidemia. *The Journal of Clinical Investigation*, n. 66, p. 484-492, 1980.
- 209) STRUPP, B.J.; LEVITSKY, D.A.; BLUMSTEIN, L. PKU, learning, and models of mental retardation. *Developmental Psychobiology*, n. 2, p. 109-120, 1984.
- 210) SWEATT, J.D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, n. 14, p. 311-317, 2004.
- 211) SWEETMAN, L.; WEYLER, W.; SHAFAI, T.; YOUNG, P.E.; NYHAN, W.L. Prenatal diagnosis of propionic acidemia. *Journal of the American Medical Association*, n. 242, p. 1048-1052, 1979.
- 212) SZAPIRO, G.; GALANTE, J.M.; BARROS, D.M.; STEIN, M.L. VIANNA, M.R.M.; IZQUIERDO, L.A.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Molecular Mechanisms of Memory Retrieval. *Neurochemical Research*, n. 11, p. 1491-1498, 2002.
- 213) SZAPIRO, G.; IZQUIERDO, L.A.; ALONSO, M.; BARROS, D.; PARATCHA, G.; ARDENGHI, P.; PEREIRA, P.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, L. Participation of hippocampal metabotropic receptors, protein kinase A and

mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience*, n. 99, p. 1-5, 2000.

- 214)** TANABE, S.; MASU, M; ISHII, T. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron*, n. 8, p. 167-172, 1992.
- 215)** TASHIAN, R.E.; Inhibition of brain glutamic acid decarboxylase by phenylalanine, valine, and leucine derivatives: a suggestion concerning the etiology of the neurological defect in phenylketonuria and branched-chain ketonuria. *Metabolism*, n. 10, p. 393,402, 1961.
- 216)** TAVARES, R.G.; SANTOS, C.E.; TASCA, C.I.; WAJNER, M.; SOUZA, D.O.; DUTRA-FILHO, C.S. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Journal of the Neurological Sciences*, n. 1-2, p. 44-49, 2000.
- 217)** TENG, E.; SQUIRE, L.R. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature*, n. 6745, p. 675-677, 1999.
- 218)** THIEBOT, M.H. Some evidence for amnesic-like effects of benzodiazepines in animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 9, p.377-389, 1985.
- 219)** THINUS-BLANC, C.; BOUZOUBA, L.; CHAIX, N.; CHAPUIS, M.; POU CET, B. A study of spatial parameters encoded during exploration in hamsters. *Journal of Experimental Psychology*, n. 13, p. 418-427, 1987.
- 220)** THOMA, N.H.; LEADLAY, P.F. Homology modeling of human methylmalonyl-CoA mutase: a structural basis for point mutations causing methylmalonic aciduria. *Protein Science*, n. 9, p. 1922-1927, 1996.
- 221)** THOMAS, E. A study of the response to protein-modified diets for propionic acidemia in twelve patients. *Brain Development*, n. 16, p. 58-63, 1994.

- 222) THOMPSON, R.F. Are memory traces localized or distributed? *Neuropsychologia*, n. 29, p. 571-582, 1991.
- 223) TOYOSHIMA, S.; WATANABE, F.; SAIDO, H.; MIYATAKE, K.; NAKANO, Y. Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. *The Journal of Nutrition*, n. 125, p. 2846–2850, 1995.
- 224) TREACY, E.; CLOW, C.L.; READE, T.R.; CHITAYAT, D.; MAMER, O. A.; SCRIVER, C.R. Maple syrup urine disease: interrelations between branched-chain, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; Associations with CNS dysmyelination. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. n. 15, p. 121-135, 1992.
- 225) TSIEN, J.Z.; HUERTA, P.T.; TONEGAWA, S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*. n. 7, p. 1327-1338, 1996.
- 226) VIANNA, M.R.; BARROS, D.M.; SILVA, T.; CHOI, H.; MADCHE, C.; RODRIGUES, C.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory formation and retrieval of one trial avoidance in rats. *Psychopharmacology*, n. 150, p. 77-84, 2000.
- 227) WAJNER, M.; BRITES, C.; DUTRA, J.C.; BUCHALTER, M.S.; PONS, A.H.; PIRES, R.F.; WANNMACHER, L.E.; ROSA JUNIOR A.; TRINDADE, V.M.T.; WANNMACHER, C.M.D. Diminished concentrations of ganglioside N-acetylneuraminic acid (G-NeuAc) in cerebellum of young rats receiving chronic administration of methylmalonic acid. *Journal of the Neurological Sciences*, n. 85, p. 233-238, 1988.
- 228) WAJNER, M.; COELHO, J.C. Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, n. 20, p. 761-768, 1997.

- 229) WAJNER, M.; DUTRA, J.C.; CARDOSO, S.E.; WANNMACHER, C.M.D.; MOTTA, E.R. Effect of Methylmalonate on in vitro Lactate Release and Carbon Dioxide Production by Brain of suckling rats. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, n. 15, p. 92-96, 1992.
- 230) WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin*, n. 83, p. 482-504, 1976.
- 231) WENDEL, U.; LANGENBECK, U.; LOMBECK, I.; BREMER, H.J. Maple syrup urine disease – Therapeutic use of insulin in catabolic states. *European Journal of Pediatrics*, n. 139, p. 172, 1982.
- 232) WESTALL, R.G.; DANCIS, J.; MILLER, S. Maple syrup urine disease. *American Journal of Diseases of Children*, n. 94, p. 571-572, 1957.
- 233) WHITAKER, J.F. A general colorimetric procedure for the estimation of enzymes which are linked to the NADH-NAD⁺ system. *Clinica Chimica Acta*, n. 1, p. 23-37, 1969.
- 234) WILENSKY, A.E.; SCHAFE, F.E.; LEDOUX, J.E. The amygdale modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, n. 20, p. 7059-7066, 2000.
- 235) WILLIAMS, C.L.; MCGAUGH, J.L. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus *tractus solitarius*. *Brain Research*, n. 654, p. 251-256, 1994.
- 236) XAVIER, G.F. *Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso*, São Paulo, Plêiade, 1999, 238p.
- 237) YEAMAN, S.J. The mammalian 2-oxo acid dehydrogenases: a complex family. *Trends in Biochemical Sciences*, n. 11, p. 293-296, 1986.

- 238) YEAMAN, S.J. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochemical Journal*, n. 3, p. 625-632, 1989.
- 239) YIELDING, K.L.; TOMKINS, G.M. An effect of L-leucine and other essential amino acids on the structure and activity of glutamic dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, n. 47, p. 983-990, 1961.
- 240) YOSHIMI, K.; IWATA, N. A supplemental measure of stay-times in the light Box on step-thorough passive avoidance. *Japanese Journal of Pharmacology*, n. 67, p. 211-218, 1995.
- 241) YUDKOFF, M.; NISSIM, I.; DAIKHIN, Y.; LIN, Z.P.; NELSON, D.; PLEASURE, D.; ERECINSKA, M. Brain glutamate metabolism: neuronal-astroglial relationships. *Developmental Neuroscience*, n. 3-5, p. 343-350, 1993.
- 242) YUDKOFF, M.; DAIKHIN, Y.; NISSIM, I.; PLEASURE, D.; STERN, J.; NISSIM, I. Inhibition of astrocyte glutamine production by alpha-ketoisocaproic acid. *The Journal of Neurochemistry*, n. 4, p. 1508-1515, 1994.
- 243) YUWILER, A.; GELLER, E. Serotonin depletion by dietary leucine, *Nature*, n. 5, p. 83-84, 1965.
- 244) ZANATTA, M.S.; QUILLFELDT, J.H.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P.K.; QUEVEDO, J.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Involvement of the hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. n. 2, p. 235-240, 1997.
- 245) ZANATTA, M.S.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P.K.; MEDINA, J.H.; QUEVEDO, J.; QUILLFELDT, J.A.; IZQUIERDO, I. Sequential involvement of NMDA receptor-dependent processes in hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in memory processing. *Behavioural Pharmacology*, n. 4, p. 341-345, 1996.

- 246) ZARRINDAST, M.R., LAHIJI, P., SHAFAGHI, B., SADEGH, M. Effects of GABAergic drugs on physostigmine-induced improvement in memory acquisition of passive avoidance learning in mice. *General Pharmacology*, v.31, n.1, p.81-86, 1998.
- 247) ZEAMAN, D.; HOUSE, B.J. Approach and avoidance in the discrimination learning of retardates, *Child Development*, n. 33, p. 355-372, 1962.
- 248) ZHANG, Y.; SAITO, H.; NISHIYAMA, N. Thymectomy-induced deterioration of learning and memory in mice. *Brain Research*, n. 1-2, p. 127-134, 1994.
- 249) ZIELKE, H.R.; HUANG, Y.; BAAB, P.J.; COLLINS, R.M.; ZIELKE, C.L.; TILDON, J.T. Effect of α -ketoisocaproate and leucine on the *in vivo* oxidation of glutamate and glutamine in the rat brain. *Neurochemical Research*, n. 22, p. 1159-1164, 1997.
- 250) ZIELKE, H.R.; HUANG, Y.; TILDON, J.T.; ZIELKE, C.L.; BAAB, P.J. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: alpha-ketoisocaproate infusion. *Developmental Neuroscience*, n. 5-6, p. 420, 425, 1996.
- 251) ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. Neurotransmitters. In: *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, 1999, p. 193-234.
- 252) ZOLA, S.M.; SQUIRE, L.R. The primate hippocampal formation: Evidence for a time limited role in memory storage. *Science*, n. 250, p. 288-290, 1990.
- 253) ZOLA, S.M.; SQUIRE, L.R. Relationship between magnitude of damage to the hippocampus and impaired recognition memory in monkeys, *Hippocampus*, n. 2, p. 92-98, 2001.

