

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

SASCKIA KADISHARI MEDEIROS DUARTE

**USO DE CANABIDIOL EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DA
URINA DO XAROPE DO BORDO: AVALIAÇÃO DE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E SISTEMA
COLINÉRGICO**

CRICIÚMA

2023

SASCKIA KADISHARI MEDEIROS DUARTE

**USO DE CANABIDIOL EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DA
URINA DO XAROPE DO BORDO: AVALIAÇÃO DE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E SISTEMA
COLINÉRGICO**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde**

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

CRICIÚMA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

D812u Duarte, Sasckia Kadishari Medeiros.

Uso de canabidiol em modelo animal de doença da urina do xarope do bordo : avaliação de parâmetros comportamentais e sistema colinérgico / Sasckia Kadishari Medeiros Duarte. - 2023.

43 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2023.

Orientação: Emilio Luiz Streck.

1. Canabidiol - Uso terapêutico. 2. Doença da urina do xarope de bordo - Tratamento. 3. Leucinose. 4. Aminoácidos de cadeia ramificada. 5. Doenças do sistema nervoso. I. Título.

CDD 23. ed. 615.7827

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 431

Com início às 10 (dez) horas do dia 05 (cinco) de fevereiro de 2024 (dois mil e vinte e quatro), realizou-se, na Sala 227/Bloco S, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **SASCKIA KADISHARI MEDEIROS DUARTE**, sob a orientação do **Prof. Dr. Emilio Luiz Streck**, intitulada “**USO DE CANABIDIOL EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E SISTEMA COLINÉRGICO**”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Prof. Dr. Rafael Teixeira (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 11h (onze) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 05 (cinco) de fevereiro de 2024 (dois mil e vinte e quatro).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Samiris Albano Pereira
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT, sendo apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Doenças Neurometabólicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

AGRADECIMENTOS

O mestrado foi uma experiência ímpar. Uma mistura de sentimentos se formou no meu peito, senti-me incapaz como nunca, uma sensação incômoda que muitas vezes foi incapacitante. “Quantas coisas eu não sei! Será que conseguirei aprender tudo que preciso a tempo?”. Deparei-me aqui com a infinitude do conhecimento. É mesmo impossível saber tudo, mas é diante do impossível que evoluímos.

A distância entre o começo e o fim do mestrado parecia infinita e, quando vi, terminou. Mais rápido do que pude contar.

Quero agradecer primeiramente à Deus e Maria, meu pai e mãe do céu, que sei me olham lá de cima e de quem tenho ficado cada dia mais próxima.

Aos meus pais, Marcelo Duarte e Tacla Souza, e padrasto e madrasta, Luciano Hausmann e Fernanda Padua, por serem meus exemplos de pessoas, e à minha avó, Jussara, que esteve presente em várias idas a Criciúma dando seu maior apoio em forma de afeto e preparando comidas para que eu estivesse sempre pronta no horário.

Ao meu noivo, Guilherme, por ser, de fato, a minha rocha.

Ao meu orientador, Dr. Emilio Luiz Streck, por toda paciência de Jó com todos os meus atrasos. Se Deus permitir, prometo que serei uma doutoranda melhor.

Ao pessoal do laboratório, em especial, à Isabela Lemos, que me sustentou em todo esse trajeto e me ensinou mais do que ela é capaz de sonhar.

À Unifebe, por se preocupar com seu corpo docente e proporcionar essa oportunidade a todos nós.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
1.1 Doença da urina do xarope de bordo	09
1.2 Quadro clínico.....	11
1.3 Diagnóstico e tratamento.....	12
1.4 Neuroquímica.....	13
1.5 Canabidiol e sistema endocanabinoide	15
1.6 Justificativa	17
2 OBJETIVOS	18
3 METODOLOGIA	19
3.1 Desenho experimental.....	19
3.2 Testes comportamentais	21
3.4 Análises neuroquímicas.....	22
3.5 Análises estatísticas.....	23
4 RESULTADOS	23
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

RESUMO

A Doença da Urina do Xarope de Bordo (DXB) é um erro inato do metabolismo de caráter autossômico recessivo causador de inatividade parcial ou total do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada, com consequente acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina e dos seus α -cetoácidos, sendo eles: ácido α -cetoisocapróico, α -ceto- β -metilvalérico e α -cetoisovalérico. Essa condição culmina em crises metabólicas de maior ou menor grau, com prejuízo celular e neurocognitivo significativo, sintomatologia importante, progressiva e que pode levar à óbito ainda na vida neonatal ou primeira infância. O tratamento vigente consiste no controle dos sintomas, restrição dietética destes aminoácidos com fórmulas especiais e, em determinados casos, recomenda-se transplante hepático. Devido inexistência de tratamento que consiga reverter os danos causados pela neurotoxicidade do acúmulo dos AACR citados, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do CBD como neuroprotetor em modelo animal de DXB. Para isto, foram utilizados 6 grupos experimentais: 1) Controle, 2) DXB 3) CBD 3,5 4) CBD 7,5, 5) DXB + CBD 3,5 e 6) DXB + CBD 7,5. O pool de AACR e a solução salina foram administrados durante 21 dias por via subcutânea de 12 em 12 horas; enquanto o tratamento com CBD ou TCM foi administrado via gavagem de 24 em 24 horas, durante 21 dias. Foram realizados testes comportamentais de habituação em campo aberto e reconhecimento de objetos, além da análise das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e colina acetiltransferase (ChAT) em amostras de córtex cerebral. No teste comportamental de habituação ao campo aberto observou-se que os animais não apresentaram nenhuma alteração locomotora ou de exploração e, no teste de reconhecimento de objeto, foi demonstrado que o grupo DXB apresentou deficiência cognitiva, sendo revertida pelo CBD na avaliação da memória de curto prazo. Em relação às enzimas, foi observado o aumento da AChE e redução da ChAT, que também foi revertido com uso de CBD. Assim, conclui-se que há potencial uso terapêutico do CBD na DXB, porém mais estudos são necessários para descrever o correto mecanismo de ação e perfil de segurança para auxiliar na contenção do déficit cognitivo causado pela doença.

Palavras-chave: Leucinose; aminoácidos de cadeia ramificada; dano neurológico; tratamento; canabidiol

ABSTRACT

Maple Syrup Urine Disease (MSUD) is an inborn error of autosomal recessive metabolism caused by partial or total deficiency of the branched chain α -keto acid dehydrogenase complex, leading to the accumulation of branched chain amino acids (BCAA) leucine, isoleucine and valine and its correspondents α -ketoacids. This condition leads to metabolic crisis with cellular and neurocognitive damage, progressive and important symptoms which could cause impairments and death still on neonatal age or childhood. Current treatment includes symptom control by restricting these amino acids with special formulas and, in some cases, liver transplant is advised. Due to the lack of treatment that can reverse the damage caused by the neurotoxicity of the accumulation of the cited BCAA, the aim of the present study was to evaluate the effect of cannabidiol as a neuroprotector in rats submitted to an animal model of MSUD on cholinergic and behavioral parameters. For this, Wistar rats with 7 days of life were used, divided into 6 experimental groups: 1) Control, 2) MSUD 3) CBD 3,5 4) CBD 7,5, 5) MSUD + CBD 3,5 e 6) MSUD + CBD 7,5. The animals received the administration of saline and BCAA every 12 hours via subcutaneous, while the treatment with CBD or TCM was administered every 24 hours via gavage for 21 days. After 21 days, the animals were submitted to open field and novel object recognition tests and were subsequently euthanized to evaluate the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and choline acetyltransferase (ChAT) in cortex samples. Open field test didn't show any changes in exploration or locomotor activity and in novel object recognition it was demonstrated that MSUD group showed cognitive loss, being reversed by cannabidiol in short term memory. On enzyme activity, was shown an increase on AChE and reduction of ChAT, which was also reversed by cannabidiol. Therefore, there is potential therapeutic use of CBD on MSUD to assist reducing cognitive impairment, but more studies are necessary to describe correct mechanism of action and safety profile.

Keywords: Leucinosi; branched-chain amino acids; neurological damage; treatment; cannabidiol

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Aminoácidos
AACR – Aminoácidos de Cadeia Ramificada
Ach – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
CAT – Catalase
CBD – Canabidiol
CDCCR – Complexo desidrogenase de cadeia ramificada
ChAT - Colina acetiltransferase
CIC - Ácido α -cetoisocapróico
CIV – Ácido α -cetoisovalérico
CMV - α -ceto- β -metilvalérico
DXB – Doença da Urina do Xarope de Bordo
EIM – Erros inatos do metabolismo
Gpx – Glutathione peroxidase
GSH – Glutathione
HIC - Ácido α -hidroxiiisocapróico
HIV – Ácido α -hidroxiiisovalérico
HNV - Ácido 2-hidroxi 3-metilvalérico
IFN – Interferon
IL – Interleucina
Leu – Leucina
NT – Neurotransmissores
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SNC – Sistema Nervoso Central
SOD – Superóxido dismutase
SUS – Sistema Único de Saúde
TNF – Fator de necrose tumoral

1 INTRODUÇÃO

Erros inatos do metabolismo (EIM) são desordens de natureza genética que, em sua maioria, levam a defeitos na produção enzimática e falhas de síntese, degradação, armazenamento ou transporte de substâncias (van Rijt et al., 2016; Chuang e Shih, 2019). A consequente interrupção das vias metabólicas levará à ausência do produto esperado desta via gerando acúmulo de seu substrato ou criando rota metabólica alternativa a partir do acúmulo ou falta destas substâncias, com comprometimento orgânico local ou sistêmico, a depender do erro presente (van Rijt et al., 2016; Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

Totalizam aproximadamente 10% das doenças genéticas e manifestam-se em qualquer faixa etária – ainda que sejam mais prevalentes e graves na primeira infância. São conhecidas aproximadamente 500 doenças desta natureza e, individualmente, são pouco expressivas em quantidade, mas podem chegar a 1:5000 a 1:2000 nascidos vivos no mundo se avaliadas em conjunto, havendo divergências na literatura. (Chuang e Shih, 2019; Husny e Fernandes- Caldato, 2006)

Como exemplo, fazem parte deste conjunto de patologias a fenilcetonúria, a deficiência de biotinidase, as mucopolissacaridoses e a Doença da Urina do Xarope de Bordo (DXB).

1.1 DOENÇA DA URINA DO XAROPE DE BORDO

A DXB – ou leucinose – é um EIM de herança genética autossômica recessiva e caracterizado pela diminuição da atividade do complexo desidrogenase de alfacetoácidos cadeia ramificada (CDCCR), levando ao acúmulo em fluidos corporais de 3 aminoácidos essenciais de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina, e de seus α -cetoácidos correspondentes, sendo eles: ácido α -cetoisocapróico (CIC), α -ceto- β -metilvalérico (CMV) e α -cetoisovalérico (CIV), além dos hidroxíácidos correspondentes, ácido α -hidroxiisocapróico (HIC), ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e ácido 2-hidroxi 3-metilvalérico (HMV) (Figura 1) (Barschak et al., 2008; Chuang e Shih, 2019; Neinast et al., 2019).

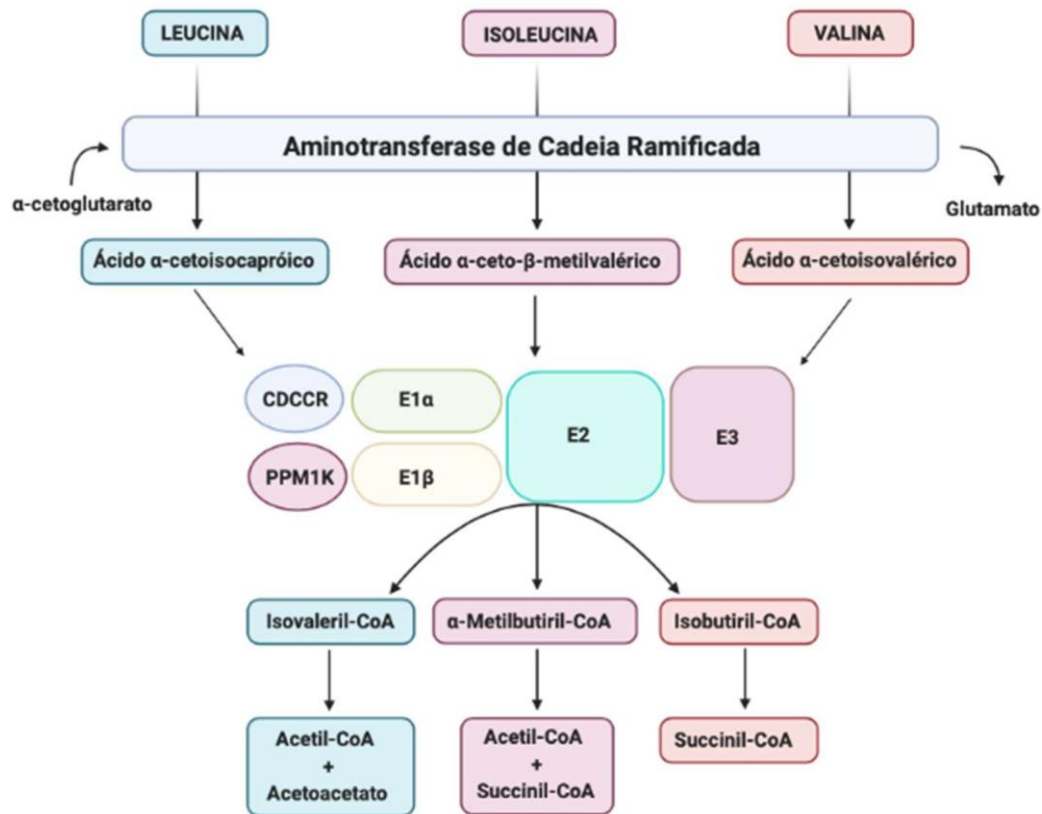


Figura 1 - Catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada.

Fonte: Adaptado de Blackburn et al., 2017.

Em 1954 ocorre a primeira menção à esta condição, quando Menkes e colaboradores relataram uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada por espasticidade muscular, edema cerebral e insuficiência respiratória associada à cetoacidose neonatal. Foi observada a presença de odor característico de xarope de bordo na urina desses pacientes (Menkes et al., 1954). Entre 1957 e 1959, Dancis e colaboradores demonstraram acúmulos de AACR na urina e plasma destes pacientes, ainda com mecanismo bioquímico pouco compreendido. Somente em 1960 foi possível associar este acúmulo de aminoácidos e seus cetoácidos correspondentes ao bloqueio da CDCCR, sendo possível adquirir melhor compreensão da condição através de estudo publicado por Dancis e colaboradores (Dancis et al, 1957; Dancis et al., 1960)

A DXB possui prevalência mundial de 1:185.000 nascidos vivos, sendo maior nas comunidades menonitas e holandesas, podendo chegar a 1:200 nascidos vivos (Frazier, 2014). No Brasil não existem dados epidemiológicos concisos e a prevalência estimada é

de 1:100.000 nascidos vivos, porém, o número de diagnósticos realizados em estudos em centros especializados demonstra uma incidência real superior (Quental et al., 2008; Herber et al., 2015).

O CDCCR humano é codificado por seis loci gênicos ($E1\alpha$, $E1\beta$, E2, E3, CDCCR quinase e CDCCR fosfatase) que, a depender das posições de acometimento, formarão os fenótipos clínicos da doença, subdivididos em quatro grupos moleculares: mutações no gene *CDCCRA* ($E1\alpha$), *CDCCRB*, ($E1\beta$), *DTB* (subunidade E2) e *DLD* (subunidade E3), sendo já descritas cerca de 280 mutações causadoras da DXB (Nellis e Danner, 2001; Imtiaz et al., 2017; Ali e Ngu., 2018).

1.2 QUADRO CLÍNICO

Existem 5 fenótipos clínicos conhecidos, sendo eles clássico, intermediário, intermitente, responsivo à tiamina e tipo 3 (ou com deficiência de E3), e a distribuição e intensidade dos sintomas variam a depender do percentual de atividade do complexo desidrogenase de cadeia ramificada. Os sintomas neurológicos são os mais prevalentes, sendo eles: convulsões, coma, ataxia, opistótono, encefalopatia progressiva, acidose láctica, hipoglicemia, vômitos, letargia/irritabilidade e alterações de neurodesenvolvimento (Chuang e Shih, 2019; Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

A forma clássica é a mais prevalente e grave, representando 80% dos casos. A atividade residual do CDCCR varia entre 0-2% e os sintomas são mais agressivos, podendo levar a óbito rapidamente se não tratado. A forma intermediária costuma apresentar-se de forma mais branda em relação à clássica e possui atividade de CDCCR oscilando entre 0 e 30%. Na forma responsiva à tiamina, que é clinicamente similar à intermediária, a atividade de CDCCR fica em torno de 2 e 40% com predomínio de sintomas neurológicos. Já na forma intermitente a atividade residual é de 5-20% sendo ataxia o sintoma principal. Por último, na deficiência da subunidade E3, têm-se uma atividade residual de 0-25% e usualmente não apresenta sintomas neonatais, sendo uma forma de DXB muito rara e tardia. A chamada crise metabólica, uma descompensação aguda e grave do acúmulo dos aminoácidos séricos, é precipitada por febre alta ou jejum prolongado, sendo óbito um desfecho comum devido episódios de acidose láctica e atraso no desenvolvimento cognitivo e neuropsicomotor uma das características mais evidentes nos sobreviventes (Strauss e Morton, 2003; Serra, Sánchez e Visus, 2010; Chuang e Shih, 2019).

1.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico se dá através da presença de características clínicas, bioquímicas e moleculares. Diante de quadro suspeito, realiza-se a aferição de AACR no plasma através de cromatografia de massas em Tandem, além da presença dos α -cetoácidos na urina (van Rijt et al., 2016; Blackburn et al., 2017). A DXB ainda não é contemplada na triagem neonatal básica (teste do pezinho) do Sistema único de saúde (SUS) sendo possível realizar o diagnóstico pelo teste ampliado, disponível principalmente em laboratórios particulares (Herber et al., 2015). Em 2021 foi sancionada a Lei 14.154/21 que amplia o teste de triagem neonatal disponibilizado pelo SUS. A DXB, sendo uma aminoacidopatia, fará parte da etapa 2 de implementação, facilitando o diagnóstico, tratamento e, conseqüentemente, a qualidade de vida. Além disso, também é disponibilizado nas redes particulares o “teste da bochechinha”, com coleta simplificada via swab de mucosa jugal, sendo uma triagem neonatal genética que investiga mais de 340 doenças tratáveis que se manifestam na infância, incluindo a análise dos 3 genes (*CDCCRA*, *CDCCRB*, *DTB*) que estão associados à quase totalidade dos casos da DXB (District of Columbia department of Health, 2010; van Rijt et al., 2016).

Do ponto de vista clínico existem dois alvos de tratamento: fase aguda (durante crises de descompensação metabólica) e fase de manutenção. Na fase aguda o tratamento é baseado em três pilares: rápida redução das concentrações dos níveis plasmáticos de AACR, suporte nutricional e indução do anabolismo através do aporte de proteínas hidrolisadas isentas de AACR, principalmente da leucina, onde o paciente será suplementado através de uma fórmula especial que possui outros aminoácidos, minerais, vitaminas e oligoelementos (Barschak et al., 2008; Strauss et al., 2010; Frazier et al., 2014; Strauss et al., 2020). A fórmula livre dos AACR não é disponibilizada pelo SUS e é de alto custo, podendo ser adquirida pelas famílias ou solicitada através da via judicial (Herber et al., 2015). Em casos mais graves, onde há sinais clínicos de descompensação grave e concentração sérica de AACR muito elevada, pode ser necessária a realização de hemodiálise de urgência (Strauss et al., 2020).

A literatura também traz o transplante hepático eletivo como uma opção de tratamento promissora, podendo restaurar entre 9 e 13% da atividade do CDCCR, levando o paciente a ter alimentação normal, sem a restrição dos AACR porém, além de pouco acessível, também não é indicado para todos os casos (Strauss et al., 2020)

1.4 NEUROQUÍMICA

É descrito que pacientes com DXB possuem alterações neurológicas e cognitivas importantes, devido a competição com outros aminoácidos essenciais e outros neurotransmissores (NT) pela passagem na barreira hematoencefálica e neurotoxicidade do acúmulo destas substâncias (Muelly et al., 2013; van Rijt et al., 2016). O acúmulo de leucina no tecido cerebral causa alteração das funções bioquímicas locais e reduz as concentrações de outros aminoácidos importantes para o bom funcionamento local, como a tirosina e o triptofano, levando à má formação de NT, disfunção sináptica e consequente distúrbios funcionais e lesão celular (Killian e Chikhale 2001; Zinnanti et al., 2009). Segundo Gibson e Blass (1976), o CIC é o mais tóxico dos α -cetoácidos (Gibson e Blass, 1976). Ele inibe o consumo de oxigênio no cérebro e provoca deficiência na formação de mielina no cerebelo de ratos (Tribble e Shapira, 1983). A elevação sérica de leucina e CIC no espaço extracelular altera a concentração no sistema nervoso central (SNC) dos aminoácidos de cadeia longa que incluem a metionina, valina, isoleucina, triptofano, tirosina, fenilalanina e glutamima (Araújo et al., 2001), afetando assim a biossíntese de alguns NT cerebrais como as catecolaminas e a serotonina. Além disso, outros parâmetros importantes para o desenvolvimento do cérebro parecem estar ligados com os danos neurológicos apresentados na doença, como a diminuição global de outros NT (Kadowaki e Knox, 1982; Zielke et al., 1996; Araújo et al., 2001; Zinnanti et al., 2009; Chuang e Shih, 2019).

A acetilcolina (Ach) foi o primeiro NT a ser identificado nas sinapses cerebrais (Van Der Zee e Luiten, 1999), é amplamente distribuída no SNC e desempenha múltiplas funções em aspectos comportamentais, processos de aprendizagem, motricidade e memória (Sekeres et al., 2018). É sintetizada no neurônio pré-sináptico pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) a partir do Acetil-CoA e da colina, e a etapa final da sua síntese ocorre no citoplasma, sendo transportada para o interior de vesículas pré-sinápticas para ser armazenada (Soreq e Seidman, 2001; Hampel et al., 2018). Uma vez liberada na sinapse, a Ach é degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) em acetato e colina, sendo esta última recaptada pelo neurônio pré-sináptico (Sarter e Parikh, 2005). A AChE é uma enzima que metaboliza, de forma específica, a Ach. A rápida degradação da mesma desativa o NT após a sua ligação ao receptor de modo a impedir seu acúmulo nas sinapses e evitar a produção de estímulos contínuos por interações repetitivas (Soreq e Seidman, 2001).

Essas alterações nos níveis de Ach correlacionam-se com as alterações comportamentais e de cognição, além de maior prevalência de depressão, ansiedade, autismo e outros transtornos neuropsiquiátricos nesses pacientes (Muelly et al., 2013; Walterfang et al., 2013; Bouchereau et al., 2017; Strauss et al., 2020).

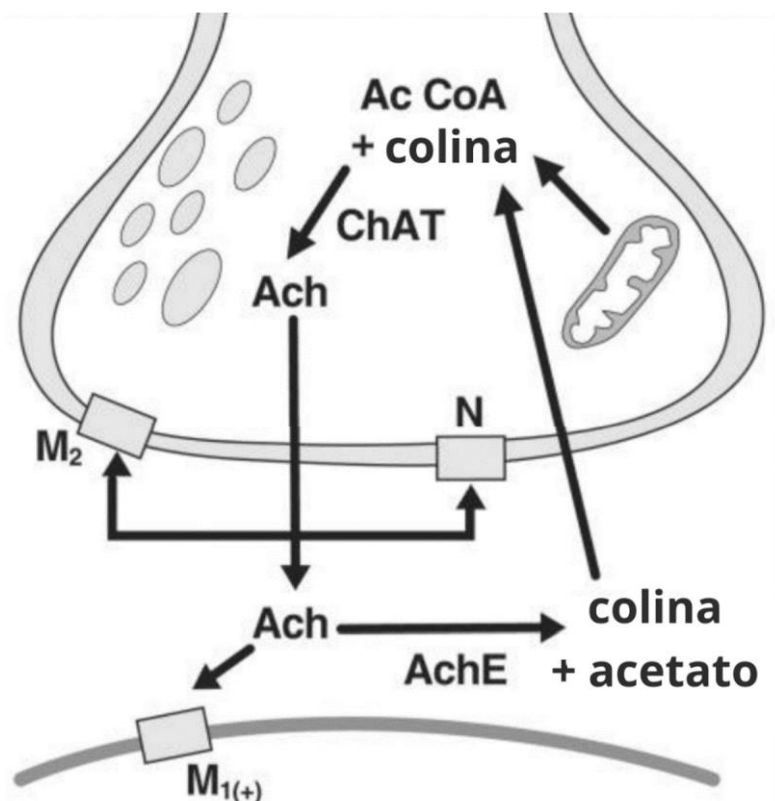


Figura 2 – Fisiologia da sinapse colinérgica: A colina é o substrato crítico para a síntese de Ach. A acetil coenzima A (Ac CoA), que é produzida pela quebra da glicose (carboidrato) através da glicólise (ciclo de Krebs), juntamente com a enzima colina acetiltransferase (ChAT), são essenciais para a síntese de acetilcolina (Ach). Uma vez que o NT Ach é liberado na sinapse, ele se liga ao receptor pós-sináptico (M1), transmitindo um sinal de um neurônio ao outro. O excesso de Ach na fenda sináptica é degradado pela enzima acetil colinesterase (AChE) em colina e acetato, que são devolvidos por um mecanismo de recaptção para reciclagem em acetil coenzima A.

Fonte: Adaptado Hampel et al., 2018

1.5 CANABIDIOL E SISTEMA ENDOCANABINOIDE

O canabidiol (CBD) é um derivado fitocanabinoide não-psicotomimético da *Cannabis sp*, de fórmula molecular $C_{21}H_{30}O_2$, composta de um ciclohexano associado a um fenol e um radical pentila (Figura 3) (Campos et al, 2015). Tem sido alvo de pesquisas desde meados de 1970, inicialmente para tratamento de epilepsia e abuso de

drogas, tendo aumento exponencial do número de publicações onde seu uso foi pesquisado para outras comorbidades como esclerose múltipla, ansiedade, depressão, psicose, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, Parkinson e Alzheimer (Garcia-Arencibia et al, 2007; Sagredo et al., 2007; Campos et al., 2016; Boccardi et al., 2017; Mcguire et al., 2018). Apresenta efeito ansiolítico, antidepressivo, neuroprotetor, antiinflamatório e imunomodulador em modelos animais e humanos, possui bom perfil de segurança para estudos clínicos e uso terapêutico, com baixo risco de toxicidade, e encontra suas evidências de tratamento medicamentoso mais robustas em formas graves de epilepsia (Campos et al, 2016).

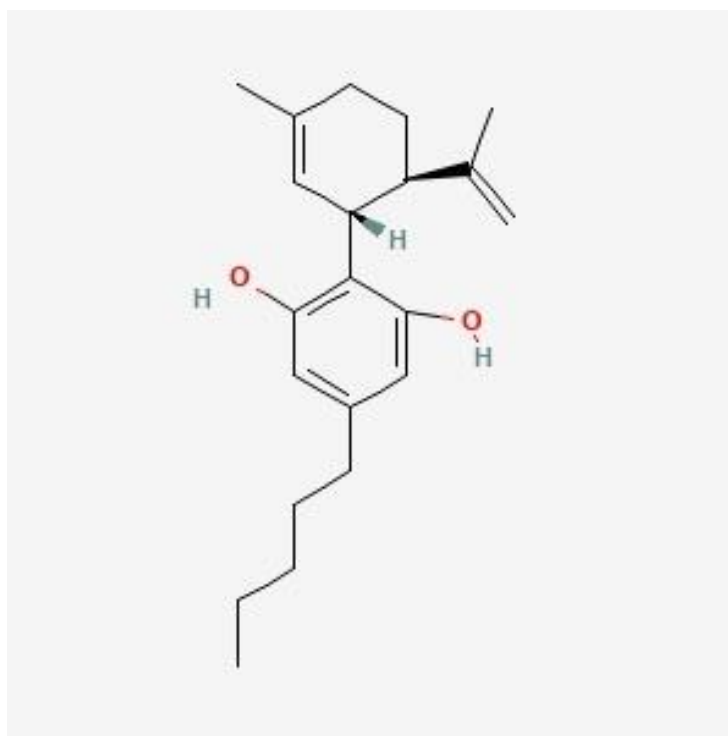


Figura 3 – Canabidiol: (2-[(6R)-3- metil-6-prop-1-en-2-ilciclohex-2-en-1-il]-5-pentilbenzeno-1,3- diol)

Fonte: IUPAC

Nos processos moleculares torna-se um agente redutor, doando elétrons às reações, e foi mais efetivo que ascorbato e α -tocoferol como antioxidante em modelo de toxicidade de glutamato (Hampson et al., 1998). Além disso, aumentou a expressão de mRNA da superóxido dismutase (SOD) em modelo animal de doença de Parkinson (Garcia-Arencibia et al., 2007) e no núcleo caudado-putâmen de ratos em modelo experimental de doença de Huntington (Sagredo et al., 2007).

O sistema endocanabinoide compreende os receptores celulares CB1 e CB2,

acoplados a proteína G, e seus agonistas endógenos anandamida (AEA) e 2-aracdonoilglicerol (2-AG), além das proteínas responsáveis pela sua modulação, síntese e degradação (Schlicker, 2005). Essas substâncias interagem com seus receptores próprios e com outros mais, podendo citar o receptor serotoninérgico 5HT1A e interações alostéricas com a serotonina, responsável por parte dos efeitos ansiolíticos e antidepressivos atribuídos ao CBD (Campos e Guimarães, 2008; Scuderi et al., 2009). O PPAR- γ , um receptor ativado por proliferadores de peroxissoma, que são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares regulados por esteroides e metabólitos derivados de lipídeos, também possui afinidade pelo CBD e atua em proliferação, apoptose e redução de danos por ROS, inibindo a transcrição de genes pró-inflamatórios e prevenindo, por exemplo, a ativação da via de sinalização NF- κ B, uma via pró-inflamatória, e estimulando mecanismos antioxidantes enzimáticos como a SOD, a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (Gpx), além dos não enzimáticos, como a glutathiona (GSH) (García-Arencibia et al, 2007; Pisoschi et al., 2015; Niedzielska et al., 2015).

Estes mecanismos citados estão direta e indiretamente associados com a eficácia de canabinoides em induzir neuroproteção e aumento de viabilidade celular em modelos experimentais animais e com uso de cultura de células que envolvem hipóxia, insulto isquêmico e privação de glicose com posterior reperfusão, conforme descritos a seguir. Castillo (2010) e Pazos (2013) demonstraram que em modelo experimental de dano neurológico hipóxico-isquêmico em células de cérebro de rato e porcos recém-nascidos, respectivamente, a presença do CBD foi capaz de reduzir a neuroinflamação, apoptose, as concentrações de glutamato, IL-6 e de TNF- α , além de reduzir a expressão de ciclo-oxigenase 2 e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), aumentando o número de neurônios viáveis ao final do experimento em relação aos controles (Castillo et al., 2010; Pazos et al., 2013). Hayakawa (2004) e (2007) em modelo de injúria isquêmica aguda de artéria cerebral média de ratos observou, após o uso de CBD, redução da área de infarto causada pela oclusão arterial sem o desenvolvimento de tolerância à dose, além da redução da atividade de mieloperoxidases em neutrófilos. (Hayakawa et al., 2004; Hayakawa et al., 2007). Iuvone e colaboradores (2004) demonstram em modelo de neurotoxicidade por beta amiloides em linhagem celular PC12 que houve aumento da viabilidade celular, redução de espécies reativas de oxigênio, de níveis de caspase 3 e de fragmentação de DNA, comprovando efeitos antioxidantes e antiapoptóticos do CBD (Iuvone et al., 2004). Em modelo semelhante ao anterior, Scuderi, Steardo e Esposito

(2014) demonstram que, em cultura de neurônios SHSY5Y (APP +), houve ativação de receptores PPAR- γ e redução da produção de beta amiloides (Scuderi et al., 2014). Ainda, Kozela e colaboradores (2010) demonstram, em modelo experimental de ativação de micróglia através de indução por lipopolissacarídeos (LPS), que houve bloqueio da ativação do gene STAT-1, que seria ativado pelo LPS, não transcrevendo a proteína homônima que é responsável por ativação de vias pró inflamatórias (Kozela et al).

1.6 JUSTIFICATIVA

Conforme descrito, a DXB trata-se de uma doença rara de acometimento precoce, com possíveis desfechos desfavoráveis, incluindo óbito. O diagnóstico por vezes é tardio e o tratamento, mesmo quando instituído precocemente, não é capaz de reverter os danos já instituídos. Além disso, apesar da primeira opção de tratamento ser teoricamente simples – dieta com restrição de aminoácidos de cadeia ramificada -, o acesso às fórmulas com restrição de aminoácidos não é facilmente acessado e possui custo financeiro significativo. A segunda linha de tratamento, o transplante hepático eletivo, apesar de efetivo, é ainda menos acessível e indicado apenas a alguns pacientes (Scaini et al., 2012; Strauss et al., 2020; Wessler et al., 2020). Ainda que estudos estejam sendo desenhados na linha de pesquisa com moduladores mitocondriais, não há protocolos com estratégias medicamentosas que sejam satisfatórias na prevenção dos danos neurocognitivos, que podem ser muito graves e comprometer a qualidade de vida. Frequentemente, estes pacientes apresentam fases de exposição à dano celular e neurológico durante as crises metabólicas e é fundamental que novas alternativas terapêuticas complementares seguras e aplicáveis precocemente sejam estudadas. Nesse contexto, existem moléculas de interesse médico e bioquímico em evidência hoje, sendo o CBD escolhido para compor este projeto devido bom perfil de segurança, acessibilidade, e bons resultados em estudos de fase 1 e 2 para outras desordens psiquiátricas e neurodegenerativas (Campos et al., 2008; Bergamaschi et al., 2011; Mehrotra e Sandhir., 2014; Campos et al., 2016; Boccardi et al., 2017; Sun et al., 2017; Wessler et al., 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do canabidiol em ratos submetidos a um modelo de doença da urina do xarope do bordo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do canabidiol sobre locomoção e exploração utilizando teste de habituação em campo aberto em ratos submetidos a um modelo de doença da urina do xarope do bordo.

Avaliar os efeitos do canabidiol sobre memória utilizando teste de reconhecimento de objeto em ratos submetidos a um modelo de doença da urina do xarope do bordo.

Avaliar os efeitos do canabidiol sobre a atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE) em ratos submetidos a um modelo de doença da urina do xarope do bordo

Avaliar os efeitos do canabidiol sobre a atividade enzimática da colina acetiltransferase (ChAT) em ratos submetidos a um modelo de doença da urina do xarope do bordo

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Este trabalho caracterizou-se como pesquisa experimental, onde o tamanho amostral deste projeto (60 ratos Wistar machos) e a curva de doses foi baseado em dados da literatura e em estudos prévios (Lemos et al., 2024; Barriga et al, 2021). Os grupos experimentais seguem abaixo:

- Grupo 1 (n=10) – Controle: Salina 0,9% via subcutâneo + TCM 100% via gavagem.
- Grupo 2 (n=10) – DXB: Pool de AACR (15,8 µL/g) via subcutâneo + TCM 100% via gavagem.
- Grupo 3 (n=10) – CBD 3,5: Salina 0,9% via subcutâneo + CBD 3,5mg/kg via gavagem.
- Grupo 4 (n=10) – CBD 7,5: Salina 0,9% via subcutâneo + CBD 7,5mg/kg via gavagem.
- Grupo 5 (n=10) – DXB + CBD 3,5: Pool de AACR (15,8 µL/g) via subcutâneo + CBD 3,5mg/kg via gavagem.
- Grupo 6 (n=10) – DXB + CBD 7,5: Pool de AACR (15,8 µL/g) via subcutâneo + CBD 7,5mg/kg via gavagem.

O CBD foi obtido da empresa *HealthyCann*, de apresentação HC Full 1500mg nº1 50mg/ml, e o veículo utilizado foram triglicerídeos de cadeia média (TCM) a 100% da marca VitaFor. O pool de AACR e a solução salina foram administrados durante 21 dias por via subcutânea de 12 em 12 horas; enquanto o tratamento com CBD ou TCM foi administrado via gavagem de 24 em 24 horas, durante 21 dias. O início do experimento se deu quando os animais apresentaram 7 dias de idade, sendo iniciado o tratamento com solução salina ou AACR. Após 12 horas da última administração (21º dia), os animais foram submetidos ao teste de habituação de campo aberto, em seguida, ao teste de reconhecimento de objetos. Os animais sofreram eutanásia após o teste comportamental por guilhotina, e foi realizada a dissecação do córtex cerebral para posterior análise de sistema colinérgico.

3.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.2.1 Teste de campo aberto

A atividade motora espontânea dos animais de todos os grupos experimentais foi realizada em um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo três de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 09 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual podia explorar livremente o ambiente por 5 minutos. Foram contados por pesquisador treinado o número de cruzamentos (crossings) e o número de levantamentos (rearings) dos animais no período de 5 minutos (Réus et al., 2017).

3.2.2 Memória de Reconhecimento de Objetos

A tarefa de reconhecimento de objetos ocorreu no aparato do campo aberto. Todos os animais foram submetidos a uma sessão de habituação onde exploram livremente o aparato por 5 min. Não sendo colocados objetos na caixa durante o ensaio de habituação. Vinte e quatro horas após a habituação, os animais foram recolocados no aparato, no qual dois objetos idênticos (objetos A1 e A2, ambos cubos) sendo posicionados em dois cantos adjacentes, a 10 cm das paredes, onde o animal explorou por 5 min. No teste de memória de reconhecimento de curta duração, 1h e 30 min após o treino, os animais foram colocados novamente no aparato e exploraram durante 5 min na presença de um objeto familiar (A) e um outro objeto novo (B, um retângulo). No teste de memória de reconhecimento de longo prazo, 24 horas após o treino, os animais foram recolocados no aparato e exploraram durante 5 min na presença de um objeto familiar (A) e um novo objeto (C, uma pirâmide). Todos os objetos possuíam texturas semelhantes (lisas), cores (azul) e tamanhos (peso 150-200 g), mas formas distintas. Um índice de reconhecimento foi calculado para cada animal durante as sessões de teste. A relação $TB/(TA + TB)$ (TA = tempo gasto explorando o objeto familiar A, TB = tempo gasto explorando o novo objeto B) e a relação $TC/(TA + TC)$ (TA = tempo gasto explorando o objeto familiar A; TC = tempo gasto explorando o novo objeto C). Entre os ensaios, os objetos foram lavados com solução de etanol a 10%. A exploração foi definida como “sniffing” (explorando o objeto 3-5 cm de distância dele) ou tocando o objeto com o nariz e/ou as

patas dianteiras (Figura 4) (Barichello et al., 2007).

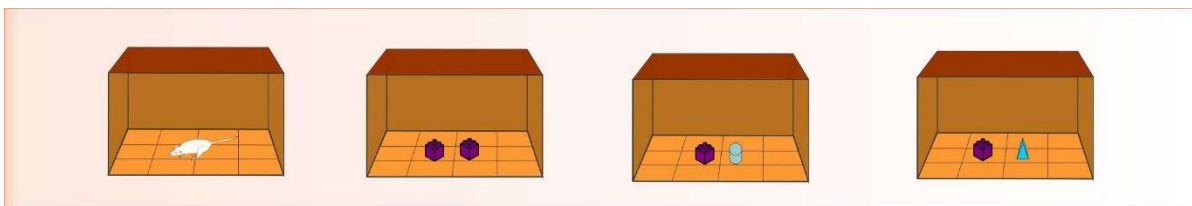


Figura 4: Representação do teste comportamental de reconhecimento de objeto.

Fonte: Autor, 2023.

3.3 ANÁLISES NEUROQUÍMICAS

3.3.1 Determinação de Proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada utilizando-se albumina bovina como padrão, de acordo com o método de Lowry. O princípio do método é baseado na redução do reagente Folin- Ciocalteu na presença do catalisador cobre (II) quando reage com as proteínas de uma amostra. Dessa forma, as amostras serão homogeneizadas na proporção 1:10, em tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4. Para posterior centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. Para a curva padrão foi utilizada albumina bovina 1mg/mL, 1mL de reativo C formado pela mistura dos reagentes A, B1 e B2 (100:1:1) e água. Para as amostras, foi utilizado volume de 10 uL, 1 mL de reativo C e 190 uL de água. Após pipetar todos os reagentes, foi misturado utilizando vórtex, e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Logo após, foi adicionado no escuro 100 uL do reagente Folin-Ciocalteu 1N em todas as amostras e na curva, agitado no vórtex novamente e incubado novamente por 20 min no escuro a temperatura ambiente. Após incubação parte do volume foi colocado em placa de 96 poços para realização da leitura na *spectramax* a 650 nm. Os valores foram expressos em mg (Lowry et al., 1951).

3.3.2 Atividade Enzimática da AChE

A atividade da AChE foi determinada através do ensaio colorimétrico. As amostras foram lavadas e ressuspendidas em solução salina tamponada (PBS) (pH 7,4), sendo o extrato total de proteína incubado com tampão fosfato (pH 7,4) e 10 mM de ácido

5,5'- ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) por cinco minutos. A essa preparação, foi adicionado 8 mM de acetiltiocolina, sendo a absorbância lida em 412 nm durante 5 minutos. Assim, atividade enzimática foi medida através da reação de grupamentos tióis, liberados da degradação de acetiltiocolina, com DTNB, sendo os resultados expressos como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Ellman et al., 1961).

3.3.3 Atividade Enzimática da ChAT

A atividade da enzima ChAT foi determinada apresentando algumas modificações. Neste protocolo, as amostras foram incubadas com o tampão de reação (PBS pH 7,2; acetilcoenzima A 6,2 mM; cloreto de colina 1 M, sulfato de neostigmina 0,76 mM; NaCl 3 M; EDTA 1,1 mM). A essa mistura foi adicionado 1 mM de 4,4'-ditiopiridina (4-TP), sendo a absorbância lida durante 20 minutos a 324 nm, em um leitor de microplaca SpectraMax® Microplate Reader (Molecular Devices®). A medida da atividade enzimática ocorreu por meio da formação do conjugado de Coenzima A com 4-TP. Os resultados obtidos foram expressos em nmol/min/ μg de proteína, calculado por meio do coeficiente de extinção molar $1,98 \times 10^4$ (Chao e Wolfgram, 1973).

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os testes comportamentais, os dados estão apresentados como média e erro padrão da média. As diferenças entre as sessões de treinamento e teste foram analisadas pelo teste t de *Student* para amostras pareadas e analisadas pelo *software Statistical Package for the Social Science* (SPSS) 21.0. As análises bioquímicas foram inicialmente avaliadas pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk seguido pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido de *Post Hoc* Tukey. As diferenças entre os grupos serão consideradas significativas quando $p < 0,05$. Para a construção dos gráficos deste estudo, foi utilizado o *software GraphPad Prism*, versão 9.0.

4 RESULTADOS

Para verificar parâmetros comportamentais foi realizado o teste de campo aberto que avalia a atividade exploratória de roedores. Não foi observada diferença significativa com relação ao número de cruzamentos (*crossing*) em nenhum dos grupos avaliados, indicando que os grupos apresentam atividade locomotora normal. O número de levantamentos (*rearings*) é utilizado como parâmetro de exploração, estando diretamente associado com a capacidade de aprendizado e de memória. Neste parâmetro, também não foi observada alteração, indicando que os animais não apresentavam danos na locomoção e exploração (Figura 5).

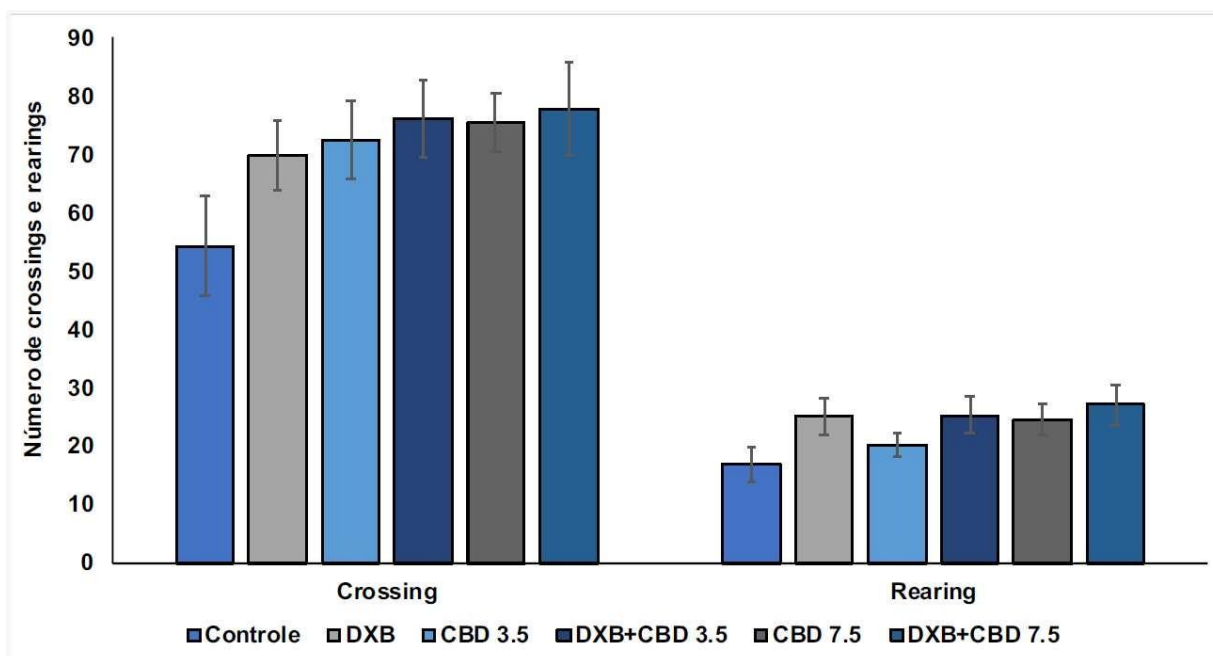


Figura 5 - Efeito do CBD sobre comportamento de habituação ao campo aberto em ratos induzidos a um modelo da DXB. Dados expressos como média e erro padrão da média, considerando * $p < 0,05$ comparado ao treino (Analisado por teste T de *Student*).

O teste de reconhecimento de objeto é utilizado para avaliação de memória e aprendizagem de curto e longo prazo. Foi observado que, com exceção do grupo DXB e o grupo DXB+CBD 7,5, todos os grupos apresentaram diferenças significativas entre o treino e teste de curta duração. Esses resultados indicam que a presença da doença isoladamente prejudica o índice de reconhecimento de curto prazo, além de demonstrar que a presença do CBD em dose 3,5 é protetora e devolveu a capacidade de reconhecimento dos objetos nos ratos com doença. Em relação à aprendizagem de longo prazo, observou-se que apenas os grupos controle e CBD 3,5 obtiveram aumento

estatisticamente significativo. Isso pode sugerir que o benefício do uso do CBD na DXB agiria apenas na retenção de curto prazo, além de estar atrelado à dose, já que nenhum grupo com dose 7,5 obteve diferença significativa na avaliação da memória de longo prazo (Figura 6).

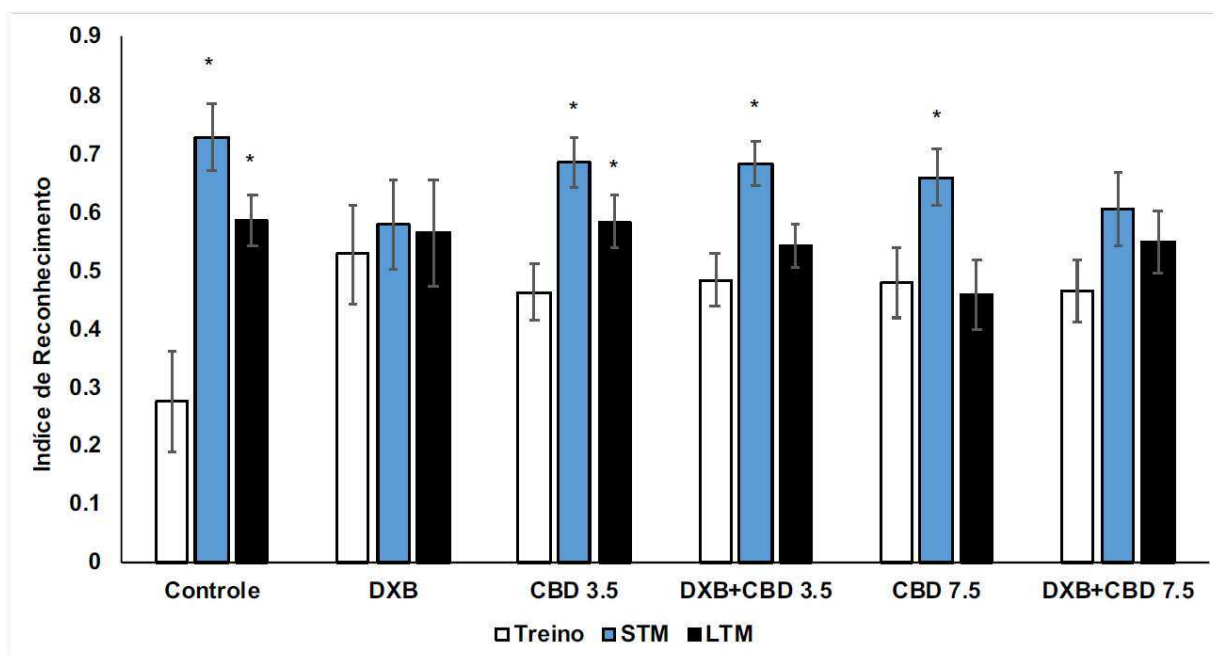


Figura 6 - Efeito do CBD sobre comportamento de reconhecimento de objetos em ratos induzidos a um modelo da DXB.

Dados expressos como média e erro padrão da média, considerando * $p < 0,05$ comparado ao treino (Analisado por teste T de Student). STM: Short term memory / LTM: Long term memory

As figuras 7A e 7B demonstram a atividade de duas enzimas relacionadas ao sistema colinérgico. Na figura 7A é demonstrada a atividade da enzima ChAT, responsável por sintetizar a Ach. No grupo DXB controle observou-se redução da atividade da enzima em relação ao salina-controle. Observa-se, ainda, aumento da atividade da ChAT nos grupos DXB + CBD 3,5 e DXB+CBD 7,5 quando comparados ao grupo DXB-controle, estando o DXB + CBD 7,5 aumentado também em relação ao grupo salina controle. Isso demonstra que a presença de CBD recuperou a capacidade síntese da ACh, sendo a dose 7,5 a mais efetiva para esta enzima.

Na figura 7B há a demonstração da atividade da AChE, enzima que degrada a Ach na fenda sináptica. No grupo salina-controle observa-se redução de sua atividade no

grupo CBD 7,5 em comparação ao controle. Isso sugere que doses mais altas de CBD podem interferir na atividade da enzima, mesmo na ausência de doença. Já no grupo DXB controle observa-se aumento na atividade da enzima quando comparada ao grupo salina-controle, o que também vai ao encontro da fisiopatologia da doença. Adicional a isso, é visto a redução estatisticamente significativa da atividade da enzima nos grupos DXB+CBD 3,5 e DXB + CBD 7,5. Essa diferença sugere que o CBD pode ter curva de ação em U nos modelos de doença, perdendo parte da sua eficácia com o aumento da dose.

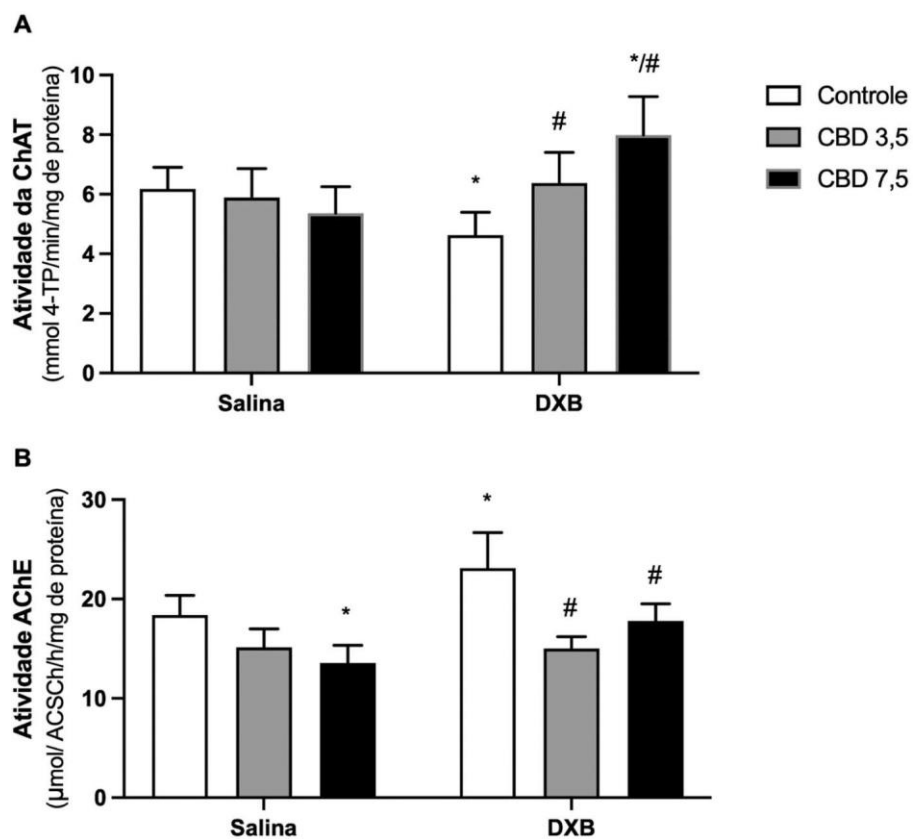


Figura 7 - Efeito do CBD sobre sistema colinérgico em ratos induzidos a um modelo da DXB.

A) Atividade da ChAT. B) Atividade da AChE. Dados expressos como média e desvio padrão, considerando $p < 0,05$ como significativo, sendo * comparado ao controle e # comparado ao grupo DXB (ANOVA de duas vias, seguido de *Post hoc* de Tukey).

5 DISCUSSÃO

A DXB apresenta-se de forma habitual com sintomas neurológicos decorrentes de crises metabólicas, distúrbios psiquiátricos e do neurodesenvolvimento, sendo particularmente grave por ser um EIM de manifestação precoce que atinge o paciente ainda na fase neonatal (Chuang e Shih, 2019, Scaini et al, 2012; Scaini et al., 2016; de Medeiros et al., 2022). Esta é uma fase crítica do desenvolvimento humano e patologias que acometem este período comprometem muito a aquisição de habilidades neuropsicomotoras, afetivas e relacionais e podem causar danos irreversíveis. Os pacientes que sobrevivem às crises metabólicas acumulam sequelas ao longo dos meses ou anos de vida, apresentando maior risco de ansiedade, psicose, depressão, esquizofrenia, deficiência intelectual e de memória e transtornos de aprendizado. Estes transtornos e deficiências estão associados aos danos neurológicos causados pela DXB nos neurônios e sinapses, principalmente na vigência de crises metabólicas (Muelly et al, 2013). Estudos demonstram que para aquisição de habilidades ou retenção de memória são necessárias ativação de sinapses específicas e, para que essa memória se consolide no longo prazo, são necessárias modificações estruturais e funcionais destes neurônios, sendo formadas novas sinapses e fortalecendo as antigas (Kandel et al., 2014; Cassilhas et al., 2016; Sekeres et al., 2018). Todo esse processo estará comprometido na DXB (Walterfang et al., 2013; van Rijt et al., 2016; Scaini et al., 2016; Chuang e Shih., 2019; Wessler et al., 2019; de Medeiros et al., 2022). Devido ao avanço das opções de tratamento, o melhor conhecimento da fisiopatologia da doença e a melhora da acurácia dos testes diagnósticos, a sobrevida tem aumentado sendo cada vez mais comum a presença de adolescentes e adultos com DXB, o que traz novos desafios à equipe assistente (Bouchereau et al., 2017). A prevalência de transtornos do neurodesenvolvimento nestes pacientes é alta e, de fato, é descrito que pacientes que desenvolvem descompensações metabólicas tem de cinco a dez vezes mais chances de evoluir com transtornos psiquiátricos – principalmente depressão e ansiedade – do que pacientes que permanecem metabolicamente estáveis durante sua vida (Blackburn et al, 2017), e que o transplante hepático não é capaz de melhorar a deficiência cognitiva ou doença psiquiátrica já estabelecida, apesar de normalizar a questão dietética e ser capaz de prevenir novas crises metabólicas (Mazariegos et al, 2012; Muelly et al, 2013).

Em nível celular, demonstra-se que os metabólitos acumulados na DXB afetam o metabolismo energético (Land et al., 1976; Pilla et al., 2003; Sgaravatti et al.,

2003; Ribeiro et al., 2008; Amaral et al., 2010), induzem o estresse oxidativo através de aumento de produção de radicais livres e diminuição das defesas antioxidantes (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005; Garcia-Arencibia et al., 2007; Mescka et al., 2011; Mescka et al., 2013; Wessler et al., 2020; de Medeiros et al., 2022) promovem quebra da barreira hematoencefálica, apoptose e morte celular em neurônios e outros tipos de células (Jouvet et al., 2000a; Jouvet et al., 2000b; Funchal et al., 2002; Pessoa-Pureur et al., 2002). Além da toxicidade direta da leucina e de seus alfa-cetoácidos correspondentes, é demonstrado que o prejuízo cognitivo de pacientes com DXB deve-se à redução do influxo de aminoácidos essenciais para o tecido cerebral, resultando em baixas concentrações de NT imprescindíveis, como a Ach, que age através da ativação de receptores nicotínicos e muscarínicos (Strauss et al., 2020; Amaral e Wajner, 2022). Esses achados repetem-se nos modelos celulares e animais da doença, onde observa-se padrão de alterações enzimáticas, de cadeia respiratória e estresse oxidativo, e podem explicar os achados bioquímicos e comportamentais evidenciados neste estudo nos grupos DXB. Lemos et al (2024) pesquisou a ação do uso de memantina em modelo de DXB em ratos, realizando testes comportamentais de reconhecimento de objeto, além de avaliações enzimáticas de sistema colinérgico e estresse oxidativo. O grupo DXB demonstrou perda cognitiva nos testes comportamentais e aumento de atividade enzimática da AChE e redução da ChAT, além de diminuição da CAT e da SOD, enzimas antioxidantes. Scaini e colaboradores (2012) também recriaram o modelo de DXB em ratos através do modelo proposto por Bridi e colaboradores (2006), tratando-os com pool de AACR via subcutânea de forma aguda e crônica. O grupo DXB foi comparado a um grupo tratamento com as substâncias antioxidantes n-acetilcisteína (NAC) e deferoxamina. Após, foram realizados os testes SHIRPA, esQUIVA inibitória, esQUIVA inibitória de treinos contínuos, reconhecimento de objetos, teste de anedonia, nado contínuo, além de dosagens da AChE, BDNF e NGF, *immunoblotting* para pro-BDNF e testes genéticos. Foi demonstrada perda cognitiva significativa nos testes comportamentais além de redução de atividade da AchE no grupo DXB, além de indução de comportamento depressivo. Este déficit foi revertido após administração concomitante de NAC e deferoxamina no grupo tratamento comparados aos DXB-controles. Lemos et al (2024) e Scaini et al (2012) corroboram os resultados encontrados neste estudo, onde foi encontrado maior prejuízo cognitivo e alterações de sistema colinérgico no grupo DXB. Wessler e colaboradores (2019) recriaram o modelo de DXB em peixes zebra em estudo que avaliou comportamento e atividade de sistema colinérgico. Foram observadas

alterações comportamentais e enzimáticas, com os modelos apresentando padrão do tipo ansioso e aumento da atividade da AChE e diminuição da ChAT nos grupos DXB, muito similares às encontradas neste estudo. Mello et al (1999) pesquisou modelo animal de DXB e realizou testes de habituação em campo aberto e esquiva inibitória, além de avaliar outros parâmetros como defecação. Observou-se prejuízo de latência, redução global de atividade motora nos ratos tratados com pool de leucina e padrão não habitual de defecação. É importante frisar que os autores sinalizam que, além da perda cognitiva, uma outra possibilidade para explicar os resultados seria que a DXB causaria alterações de atividade motora por alteração da afetividade, alterando a forma como o indivíduo interage com o ambiente. Isso é particularmente interessante, pois vai ao encontro do atraso psicomotor e deficiência intelectual vistas em pacientes com DXB e mencionados anteriormente.

Assim como em Scaini et al (2012) e Lemos et al (2024), este estudo testou a capacidade de neuroproteção de uma substância em modelo animal. A ação do CBD como substância antioxidante, apesar de ainda não ser totalmente compreendida, é bem descrita em literatura (Valvassori et al., 2013; Campos et al., 2016; Niedzielska et al., 2016). Além de ser um antagonista e/ou agonista inverso do receptor CB1 e agonista fraco do receptor CB2 do sistema endocanabinoide, o CBD age por múltiplas vias, como pela interrupção de vias de estresse oxidativo, expressão de genes para transcrição de enzimas antioxidantes, aumento de GSH (um dos mais importantes antioxidantes intracelulares), interrupção de modificações oxidativas de lipídeos e proteínas de membrana, entre outros (Forman et al., 2008; Campos et al., 2016). O CBD possui propriedades antioxidantes que dependem de sua estrutura química, apresentando efeitos neuroprotetores ao diminuir os parâmetros oxidativos e aumentar a viabilidade celular (Hampson et al., 1998; Garcia- Arencibia et al., 2007; Magen et al., 2010; Barrichello et al., 2012; Mecha et al., 2012; Niedzielska et al., 2016).

Em relação ao sistema colinérgico, este estudo avaliou a atividade enzimática da AChE e da ChAT. Nos grupos DXB, o CBD preservou de forma significativa a atividade da ChAT, tendo aumento progressivo de sua atividade com o aumento da dose. Sendo a enzima responsável pela síntese da Ach, a queda da atividade da ChAT é esperada nos modelos animais da doença. Além disso, foi observado aumento da atividade da AChE nos ratos com DXB e, após tratamento com CBD, observa-se redução significativa desta atividade em forma de U, com seu maior poder de redução no grupo DXB+CBD 3,5. Neste estudo, no teste de reconhecimento de objetos foi demonstrado que

a presença do CBD foi protetora em ratos com DXB na memória de curto prazo no grupo DXB+CBD 3,5, mas não no grupo DXB+CBD 7,5. Isso pode ser explicado pelo efeito bifásico do CBD como já demonstrado por Valvassori e colaboradores (2013) em estudo que avaliou a bioenergética mitocondrial em ratos. O CBD foi aplicado de forma intraperitoneal em grupos separados por doses de 15, 30 e 60mg/kg em aplicações agudas e crônicas e foram avaliados os complexos I, II, II-III e IV em amostras de córtex pré-frontal, estriado, córtex e hipocampo. Como exemplo, ao avaliar o complexo I, o córtex pré-frontal e o hipocampo responderam às doses de 30 e 60mg/kg, mas apenas a dose de 60mg/kg foi capaz de aumentar a atividade no estriado e no córtex. Isso evidencia ativação e inativação de respiração celular mediante uso de diferentes doses de CBD em células neuronais de ratos, além de demonstrar que, com a variação do tipo de célula, há diferente resposta mesmo sob vigência da mesma dose de tratamento. Os autores sugerem também que a presença do CBD possa ter aumentado o acúmulo de cálcio (Ca^{2+}) na mitocôndria, aumentando a acessibilidade do NADH ao complexo mitocondrial. Chan e Duncan, (2021) também sumarizam em extenso estudo sobre as ações do CBD sobre a bioenergética mitocondrial acerca deste efeito (Chan e Duncan, 2021). Houve, ainda, diferença observada nos regimes de tratamento. Os ratos tratados de forma crônica com CBD ativaram mais áreas cerebrais e com mais doses do que os ratos tratados de forma aguda, sendo uma evidência do efeito cumulativo do CBD. Buscando explicar estes resultados, os autores demonstram que a ativação dos receptores endocanabinoides próprios CB1 e CB2 são distintos em áreas diferentes do cérebro, como também foi demonstrado por outros autores (Hayakawa et al., 2004; Magen et al., 2010; Campos et al., 2015), e sofrem ativação de forma desigual, a depender do tipo de célula avaliada e dose de CBD utilizada, além de demonstrar efeito cumulativo. Isso pode ser explicado pela variação enzimática das células de cada região do encéfalo, além da expressão de receptores endocanabinoides e nucleares de forma não linear nas mitocôndrias de células de diferentes tecidos. Os autores concluem que é possível que esses resultados sugiram um efeito bifásico do CBD na respiração mitocondrial, onde as concentrações em nanomolar ativam, mas as concentrações em micromolar inibem. Além disso, os complexos enzimáticos de cadeia respiratória citados possuem sistemas de ativação, inativação e saturação específicos, que são diferentes para cada contexto e doses, podendo agir de forma diferente dentro das mesmas condições (Harkenham et al., 1991; Rodriguez et al., 2001; Sun et al., 2017; Chan e Duncan, 2021).

Em outro estudo, Fisar e colaboradores (2014) avaliam a ação de substâncias

canabinoides agonistas, antagonistas e agonistas inversos do receptor CB1 do sistema endocanabinoide, incluindo THC e CBD (3,18 mM), nas taxas de respiração celular de um preparado de mitocôndrias retiradas de células de córtex de porcos. Diferentemente do que foi mencionado no estudo citado anteriormente, é apontado que, com o aumento da dose, há inativação progressiva da respiração celular nos complexos I, II e IV, sendo o CBD o mais potente em inibir completamente esta reação nos complexos I e II. Os autores sugerem, ainda, um papel significativo de mecanismos não mediados por receptores na inibição da respiração mitocondrial, através de, por exemplo, acúmulo na membrana da mitocôndria, devido ao CBD ser altamente lipofílico. Estes resultados demonstram novamente a ação do CBD sobre a respiração celular e, apesar de aparentemente conflituosos com os resultados demonstrados anteriormente, podem ser explicados pois trata-se de estudo de cultura de células, onde o CBD age diretamente, diferentemente do que foi trazido por Valvassori e colaboradores (2013), que utilizaram modelo animal.

Magen e colaboradores (2010) realizaram estudo em modelo de doença hepática crônica realizado através de ligadura do ducto biliar comum (BDL) em ratos. Este modelo mimetiza, além da doença hepática, a encefalopatia encontrada em pacientes com cirrose. Após a cirurgia, foi realizada aplicação de CBD na dose de 5mg/kg por via intraperitoneal por 4 semanas. Foram performados os testes de campo aberto e labirinto de 8 braços radiais, e RT-PCR para avaliação de receptor TNF- α 1, BDNF e receptor 5HT1A no hipocampo. Foi demonstrada perda cognitiva no grupo BDL, havendo recuperação desta perda após aplicação de CBD no teste de labirinto realizado 3 semanas após a primeira injeção. Ao bloquear o receptor 5HT1A com o antagonista WAY-100635, este benefício se perdeu, demonstrando que este resultado pode estar associado à ativação do receptor 5HT1A. Não houve ação do CBD nos animais salina controle. A função motora, que também sofreu declínio no grupo BDL, foi recuperada pelo uso do CBD e foi perdida pelo bloqueio de receptor 5HT1A pelo seu antagonista WAY-100365. Houve redução da expressão RNAm de BDNF no grupo BDL e o CBD reverteu essas alterações. Esses resultados demonstram que o CBD tem capacidade de neuroproteção por ativação de outros receptores, como o serotoninérgico 5HT1A, além de reversão de danos já estabelecidos pelo modelo proposto. Esta ativação já foi descrita como a principal responsável pelos efeitos ansiolíticos do CBD (Campos et al, 2008; Mecha et al, 2012; Valvassori et al, 2013; Campos et al, 2015) e estes resultados demonstram que, além de ansiólise, esta ativação pode ser responsável também por neuroproteção.

Ao encontro do estudo anterior, Campos e colaboradores (2015) demonstraram a atividade neuroprotetora do CBD em modelo murino de malária cerebral. Ratas fêmeas foram contaminadas com o *Plasmodium berghei* e o grupo CBD foi tratado na dose de 30mg/kg/dia por 3 ou 7 dias. No quinto dia, todos foram tratados com Artesunato, uma droga antimalárica. Foram realizados os testes de reconhecimento de objeto, teste de campo aberto, teste de labirinto elevado, teste de labirinto aquático de Morris e dosagens de BDNF, NGF e citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α . Foi visto que o tratamento com CBD por 7 dias aumentou a sobrevivência, preveniu o comportamento ansioso e reduziu déficit cognitivo e motor, principalmente através do aumento da expressão de BDNF no hipocampo e reduzindo a expressão do RNAm para os receptores TNF- α . Os autores associam o aumento de BDNF a melhores desfechos cognitivos, o que vai ao encontro da literatura (Carlino et al. 2013; Dincheva et al. 2012), e a redução da expressão dos receptores TNF- α à redução da neuroinflamação, ainda que o maior potencial antiinflamatório tenha sido creditado à presença do artesunato. Foi observado que este aumento de BDNF ocorre apenas no hipocampo e não no córtex pré-frontal e o motivo é desconhecido, podendo ser explicado por sub ou supradosagens ou interações do tipo inibitória nesta região. O CBD também foi capaz de diminuir o comportamento do tipo ansioso e os autores associam majoritariamente este efeito à atividade do receptor 5HT1A (Campos et al, 2008; Mecha et al, 2012; Campos et al, 2015) ainda que outros mecanismos de interação não possam ser descartados, como os já mencionados CB1, CB2, e outros como vaniloide TRPV1, GPR55 e PPAR- γ (Rodriguez et al., 2001; Sagredo et al., 2007).

Neste presente estudo não houve diferença estatística na avaliação da memória de longo prazo no teste de reconhecimento de objetos. Indo ao encontro dos estudos citados (Scaini et al, 2012; Valvassori et al, 2013; Fisar et al, 2014; Campos et al, 2016) este resultado pode ser explicado por sub ou supradosagem de CBD, efeito bifásico, incapacidade do CBD de conter o dano neurológico causado pela DXB no longo prazo ou ser decorrente de efeito colateral (intoxicação ou letargia) atrelado à dose do medicamento. Essa última hipótese é reforçada pelo maior tempo de treino dos ratos tratados com CBD, mesmo na ausência de doença, em comparação aos salina-controle. Por último, como demonstrado por Valvassori e colaboradores (2013) e Chan e Ducan (2021), o CBD age de forma diferente nas mitocôndrias de células diferentes e este estudo avaliou a atividade enzimática apenas em células do córtex. É possível que o CBD tenha outro tipo de interação em células do hipocampo de ratos com DXB, área associada à

retenção da memória de longo prazo, podendo até apresentar algum tipo de atividade inibitória via receptores de membrana celular ou através de modulação de maquinaria mitocondrial (Casarotto et al., 2010; Scaini et al., 2012; Valvassori et al., 2013; Campos et al., 2014; Fisar et al., 2014; Campos et al., 2016; Sun et al., 2017; Chan e Duncan, 2021).

O CBD possui mecanismos de ação muito amplos e em parte desconhecidos. Age por via direta e indireta, ora agindo via sistema endocanabinoide e receptores CB1, CB2 e A2A, ora agindo via receptores nucleares, receptores serotoninérgicos do tipo 5HT1A, modulando respiração celular através de ação sobre complexos mitocondriais ou agindo em todas essas vias ao mesmo tempo, o que dificulta a explicação do mecanismo exato de sua ação. É muito provável que a ação do CBD na DXB seja múltipla, não podendo ser possível atrelar os resultados encontrados à apenas um mecanismo. Ainda que os resultados tenham sido positivos e haja na literatura, muitos estudos que evidenciem as atividades antiinflamatórias, neuroprotetores, anticonvulsivantes (Hampson et al., 1998; Iuvone et al., 2004; Castillo et al., 2010; Stern et al., 2012; Campos et al., 2016), não há descrição na literatura de outro estudo que tenha utilizado CBD em modelo animal de DXB que possa ser comparado com estes resultados e auxiliar a explicar melhor os achados deste trabalho.

O CBD é aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso em humanos com bom perfil de segurança para tratamento de formas graves de epilepsias (síndrome de Lennox-Gastaut, síndrome de Dravet e complexo de esclerose tuberculosa) e é comercializado com o nome de Epidiolex[®] para este fim. Estudos clínicos estão em fase 3 para espasticidade refratária de esclerose múltipla (Sativex[®] - iniciado em 2008) (NIH, 2023) e já há estudo controlado por placebo para uso do CBD para formas graves de esquizofrenia refratárias, associado à medicação antipsicótica, com resultado positivo (Mcguire et al., 2018). Possui bom perfil de segurança, baixo risco de toxicidade e poucos efeitos colaterais. Estudos em humanos com CBD oral (200-800 mg) e sublingual (20 mg) relataram pouco efeito sobre funções fisiológicas, incluindo frequência cardíaca e pressão arterial (Haney et al., 2016; Babalonis et al., 2017; Taylor et al., 2018), e Bergamaschi e colaboradores (2011) demonstram que doses de até 1500mg/dia são seguras em humanos.

Sugerem-se novos estudos, com avaliação de mais doses e outros sistemas e funções, para corroborar os achados neste trabalho.

6 CONCLUSÃO

O CBD foi efetivo em proteger contra danos cognitivos e melhorar parâmetros de memória, bem como foi capaz de aumentar a concentração da ChAT e reduzir a concentração da AChE no córtex cerebral de ratos submetidos a modelo de DXB. Dessa forma, conclui-se que o CBD possui potencial de uso terapêutico na DXB através de modulação de sistema colinérgico. Há, provavelmente, outras vias associadas a seu efeito, principalmente associadas ao seu efeito sinérgico serotoninérgico em receptores 5HT1A. Há necessidade de mais estudos para compreender qual é sua real ação farmacológica neste cenário e verificar a viabilidade de testes em humanos a depender do perfil de segurança.

REFERÊNCIAS

- Ali, Ernie Zuraida, and Lock-Hock Ngu. "Fourteen new mutations of BCKDHA, BCKDHB and DBT genes associated with maple syrup urine disease (MSUD) in Malaysian population." *Molecular genetics and metabolism reports* vol. 17 22-30. 13 Sep. 2018, doi:10.1016/j.ymgmr.2018.08.006
- Araújo, P et al. "Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats." *Neurochemistry international* vol. 38,6 (2001): 529-37. doi:10.1016/s0197-0186(00)00100-5
- Barriga, Jessica RM et al (2021). Anxiolytic and antidepressant effects of cannabidiol: a systematic review. *Journal of Health & Biological Sciences*. 9. 1. 10.12662/2317-3076jhbs.v9i1.3366.p1-7.2021.
- Barschak, Alethéa G et al. "Maple syrup urine disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles." *Clinical biochemistry* vol. 41,4-5 (2008): 317-24. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.11.015
- Bergamaschi, Mateus Machado et al. "Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent." *Current drug safety* vol. 6,4 (2011): 237-49. doi:10.2174/157488611798280924
- Blackburn, Patrick R et al. "Maple syrup urine disease: mechanisms and management." *The application of clinical genetics* vol. 10 57-66. 6 Sep. 2017, doi:10.2147/TACG.S125962
- Bouchereau, Juliette et al. "Neurocognitive profiles in MSUD school-age patients." *Journal of inherited metabolic disease* vol. 40,3 (2017): 377-383. doi:10.1007/s10545-017-0033-7
- Boccardi, Marina et al. "The biomarker-based diagnosis of Alzheimer's disease. 2-lessons from oncology." *Neurobiology of aging* vol. 52 (2017): 141-152. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.01.021

Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Wajner M, Dutra-Filho CS. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Dev Neurosci*. 2003 Oct;21(6):327-32. doi: 10.1016/s0736-5748(03)00074-1. PMID: 12927581.

Bridi, Raquel et al. "Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease." *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* vol. 21,6 (2003): 327-32. doi:10.1016/s0736-5748(03)00074-1

Bridi, Raquel et al. "A chemically-induced acute model of maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies." *Journal of neuroscience methods* vol. 155,2 (2006): 224-30. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.01.005

Campos, A C et al. "Cannabidiol increases survival and promotes rescue of cognitive function in a murine model of cerebral malaria." *Neuroscience* vol. 289 (2015): 166-80. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.12.051

Campos, Alline Cristina, and Francisco Silveira Guimarães. "Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats." *Psychopharmacology* vol. 199,2 (2008): 223-30. doi:10.1007/s00213-008-1168-x

Campos, Alline C et al. "Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders." *Pharmacological research* vol. 112 (2016): 119-127. doi:10.1016/j.phrs.2016.01.033

Casarotto, Plinio C et al. "Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors." *Behavioural pharmacology* vol. 21,4 (2010): 353-8. doi:10.1097/fbp.0b013e32833b33c5

Castillo, A et al. "The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors." *Neurobiology of disease* vol. 37,2 (2010): 434-40.

doi:10.1016/j.nbd.2009.10.023

Chan, John Zewen, and Robin Elaine Duncan. "Regulatory Effects of Cannabidiol on Mitochondrial Functions: A Review." *Cells* vol. 10,5 1251. 19 May. 2021, doi:10.3390/cells10051251

Chao LP, Wolfgram F. Purification and some properties of choline acetyltransferase (EC 2.3.1.6) from bovine brain. *J Neurochem.* 1973 Apr;20(4):1075-81. doi: 10.1111/j.1471-4159.1973.tb00078.x. PMID: 4697870.

Chaturvedi RK, Beal MF. Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Dec;1147:395-412. doi: 10.1196/annals.1427.027. PMID: 19076459; PMCID: PMC2605644.

Chuang D.T., & Shih V.E., & Max Wynn R.R. (2019). Maple syrup urine disease (branched- chain ketoaciduria). Valle D.L., & Antonarakis S, & Ballabio A, & Beaudet A.L., & Mitchell G.A.(Eds.), *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* McGraw Hill.
<https://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2709§ionid=225084607>

DANCIS J, LEVITZ M, MILLER S, WESTALL RG. Maple syrup urine disease. *Br Med J.* 1959 Jan 10;1(5114):91-3. doi: 10.1136/bmj.1.5114.91. PMID: 13608088; PMCID: PMC1992207.

DANCIS J, LEVITZ M, WESTALL RG. Maple syrup urine disease: branched-chain keto-aciduria. *Pediatrics.* 1960 Jan;25:72-9. PMID: 13813934.

Dalmau, Jaime & Sánchez, F.A. & Sánchez-Valverde, Felix. (2010). Enfermedades de orina de jarabe arce. *Diagnóstico y Tratamiento de Las Enfermedades Metabólicas Hereditarias.* 487-498.

ELLMAN GL, COURTNEY KD, ANDRES V Jr, FEATHER-STONE RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961 Jul;7:88-95. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9. PMID: 13726518.

Frazier DM, Allgeier C, Homer C, et al. Nutrition management guideline for maple syrup urine disease: an evidence- and consensus-based approach. *Mol Genet Metab.* 2014;112(3):210-217. doi:10.1016/j.ymgme.2014.05.006

Fontella FU, Gassen E, Pulrolnik V, et al. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis.* 2002;17(1):47-54. doi:10.1023/a:1014004414733

Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009 Feb-Apr;30(1-2):1-12. doi:10.1016/j.mam.2008.08.006. Epub 2008 Aug 30. PMID: 18796312; PMCID: PMC2696075.

García-Arencibia, Moisés et al. "Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties." *Brain research* vol. 1134,1 (2007): 162-70. doi:10.1016/j.brainres.2006.11.063

Genetic Alliance; District of Columbia Department of Health. *Understanding Genetics: A District of Columbia Guide for Patients and Health Professionals.* Washington (DC): Genetic Alliance; 2010 Feb 17. PMID: 23586106.

Gibson GE, Blass JP. Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohydrate utilization by maple-syrup-urine disease metabolites. *J Neurochem.* 1976 Jun;26(6):1073-8. doi:10.1111/j.1471-4159.1976.tb06988.x. PMID: 945329.

Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain.* 2018;141(7):1917-1933. doi:10.1093/brain/awy132

Hampson, A J et al. "Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 95,14 (1998): 8268-73. doi:10.1073/pnas.95.14.8268

Hayakawa, Kazuhide et al. "Cannabidiol prevents infarction via the non-CB1 cannabinoid receptor mechanism." *Neuroreport* vol. 15,15 (2004): 2381-5. 38
doi:10.1097/00001756-200410250-00016

Hayakawa, Kazuhide et al. "Repeated treatment with cannabidiol but not Delta9-tetrahydrocannabinol has a neuroprotective effect without the development of tolerance." *Neuropharmacology* vol. 52,4 (2007): 1079-87. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.11.005

Herber S, Schwartz IV, Nalin T, et al. Maple syrup urine disease in Brazil: a panorama of the last two decades. *J Pediatr (Rio J)*. 2015;91(3):292-298. doi:10.1016/j.jped.2014.08.010

Husny, AS El; Fernandes-Caldato, MC. Erros inatos do metabolismo: revisão de literatura. *Rev. Para. Med., Belém*, v. 20, n. 2, p. 41-45, jun. 2006. Disponível em <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-59072006000200008&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 12 mar. 2024.

Iuvone, T et al. "Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells." *Journal of neurochemistry* vol. 89,1 (2004): 134-41. doi:10.1111/j.1471-4159.2003.02327.x

Kadowaki H, Knox WE. Cytosolic and mitochondrial isoenzymes of branched-chain amino acid aminotransferase during development of the rat. *Biochem J*. 1982 Mar 15;202(3):777-83. doi: 10.1042/bj2020777. PMID: 7092844; PMCID: PMC1158175.

Killian DM, Chikhale PJ. A bioreversible prodrug approach designed to shift mechanism of brain uptake for amino-acid-containing anticancer agents. *J Neurochem*. 2001 Feb;76(4):966-74. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00031.x. PMID: 11181816.

Kozela, E et al. "Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells." *The Journal of biological chemistry* vol. 285,3 (2010): 1616-26. doi:10.1074/jbc.M109.069294

Lemos, I.S., Torres, C.A., Alano, C.G. et al. Memantine Improves Memory and Neurochemical Damage in a Model of Maple Syrup Urine Disease. *Neurochem Res* 49, 758–770 (2024). <https://doi.org/10.1007/s11064-023-04072-x>

LOWRY, O H et al. “Protein measurement with the Folin phenol reagent.” *The Journal of biological chemistry* vol. 193,1 (1951): 265-75.

Mazariegos GV, Morton DH, Sindhi R, et al. Liver transplantation for classical maple syrup urine disease: long-term follow-up in 37 patients and comparative United Network for Organ Sharing experience. *J Pediatr.* 2012;160(1):116-21.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2011.06.033

McGuire P, Robson P, Cubala WJ, et al. Cannabidiol (CBD) as an Adjunctive Therapy in Schizophrenia: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *Am J Psychiatry.* 2018;175(3):225-231. doi:10.1176/appi.ajp.2017.17030325

Mecha, M et al. “Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress.” *Cell death & disease* vol. 3,6 e331. 28 Jun. 2012, doi:10.1038/cddis.2012.71

Mehrotra A, Sandhir R. Mitochondrial cofactors in experimental Huntington's disease: behavioral, biochemical and histological evaluation. *Behav Brain Res.* 2014 Mar 15;261:345-55. doi: 10.1016/j.bbr.2013.12.035. Epub 2014 Jan 3. PMID: 24393741.

de Medeiros, Bianca Z et al. “Exposure to leucine induces oxidative stress in the brain of zebrafish.” *Metabolic brain disease* vol. 37,4 (2022): 1155-1161. doi:10.1007/s11011-022-00934-5

MENKES, J H et al. “A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance.” *Pediatrics* vol. 14,5 (1954): 462-7.

Mescka, CP et al. “Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: 1-

carnitine effect.” *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* vol. 31,1 (2013): 21-4. doi:10.1016/j.ijdevneu.2012.10.109 40

Muelly ER, Moore GJ, Bunce SC, et al. Biochemical correlates of neuropsychiatric illness in maple syrup urine disease. *J Clin Invest.* 2013;123(4):1809-1820. doi:10.1172/JCI67217

Neinast M, Murashige D, Arany Z. Branched Chain Amino Acids. *Annu Rev Physiol.* 2019;81:139-164. doi:10.1146/annurev-physiol-020518-114455

Nellis MM e DJ Danner. Gene preference in maple syrup urine disease. *Am J Hum Genet.* 2001;68: (1):232-7.

Niedzielska, E et al. “Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases.” *Molecular neurobiology* vol. 53,6 (2016): 4094-4125. doi:10.1007/s12035-015-9337-5

Pazos MR, Mohammed N, Lafuente H, et al. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: role of 5HT(1A) and CB2 receptors. *Neuropharmacology.* 2013;71:282-291. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.027

Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015 Jun 5;97:55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25942353.

Quental S, Macedo-Ribeiro S, Matos R, et al. Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. *Mol Genet Metab.* 2008;94(2):148-156. doi:10.1016/j.ymgme.2008.02.008

van Rijt WJ, Koolhaas GD, Bekhof J, et al. Inborn Errors of Metabolism That Cause Sudden Infant Death: A Systematic Review with Implications for Population Neonatal Screening Programmes. *Neonatology.* 2016;109(4):297-302. doi:10.1159/000443874

Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM. Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid

receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci*. 2001;21(3):823-833. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-03-00823.2001

41

Sagredo, O et al. "Cannabidiol reduced the striatal atrophy caused 3-nitropropionic acid in vivo by mechanisms independent of the activation of cannabinoid, vanilloid TRPV1 and adenosine A2A receptors." *The European journal of neuroscience* vol. 26,4 (2007): 843-51. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05717.x

Sarter, Martin, and Vinay Parikh. "Choline transporters, cholinergic transmission and cognition." *Nature reviews. Neuroscience* vol. 6,1 (2005): 48-56. doi:10.1038/nrn1588.

Scaini G, Teodorak BP, Jeremias IC, et al. Antioxidant administration prevents memory impairment in an animal model of maple syrup urine disease. *Behav Brain Res*. 2012;231(1):92-96. doi:10.1016/j.bbr.2012.03.004

Scaini G, Tonon T, de Souza CFM, et al. Serum Markers of Neurodegeneration in Maple Syrup Urine Disease [published correction appears in *Mol Neurobiol*. 2016 Nov 4;:]. *Mol Neurobiol*. 2017;54(7):5709-5719. doi:10.1007/s12035-016-0116-8

Scuderi C, Filippis DD, Iuvone T, Blasio A, Steardo A, Esposito G. Cannabidiol in medicine: a review of its therapeutic potential in CNS disorders. *Phytother Res*. 2009 May;23(5):597-602. doi: 10.1002/ptr.2625. PMID: 18844286.

Scuderi C, Steardo L, Esposito G. Cannabidiol promotes amyloid precursor protein ubiquitination and reduction of beta amyloid expression in SHSY5YAPP+ cells through PPAR γ involvement. *Phytother Res*. 2014;28(7):1007-1013. doi:10.1002/ptr.5095

Sekeres MJ, Winocur G, Moscovitch M. The hippocampus and related neocortical structures in memory transformation. *Neurosci Lett*. 2018 Jul 27;680:39-53. doi: 10.1016/j.neulet.2018.05.006. Epub 2018 May 4. PMID: 29733974.

Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Apr;2(4):294-302. doi: 10.1038/35067589. Erratum in: *Nat Rev Neurosci* 2001

Stern CA, Gazarini L, Takahashi RN, Guimarães FS, Bertoglio LJ. On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2012 Aug;37(9):2132-42. doi: 10.1038/npp.2012.63. Epub 2012 May 2. PMID: 22549120; PMCID: PMC3398715.

Strauss KA, Carson VJ, Soltys K, et al. Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase deficiency (maple syrup urine disease): Treatment, biomarkers, and outcomes. *Mol Genet Metab*. 2020;129(3):193-206. doi:10.1016/j.ymgme.2020.01.006

Strauss KA, Morton DH. Branched-chain Ketoacyl Dehydrogenase Deficiency: Maple Syrup Disease. *Curr Treat Options Neurol*. 2003 Jul;5(4):329-341. doi: 10.1007/s11940-003-0039-3. PMID: 12791200.

Strauss KA, Wardley B, Robinson D, et al. Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design [published correction appears in *Mol Genet Metab*. 2011 Jun;103(2):202. Shelmer, Diana [corrected to Shellmer, Diana]]. *Mol Genet Metab*. 2010;99(4):333-345. doi:10.1016/j.ymgme.2009.12.007

Sun S, Hu F, Wu J, Zhang S. Cannabidiol attenuates OGD/R-induced damage by enhancing mitochondrial bioenergetics and modulating glucose metabolism via pentose-phosphate pathway in hippocampal neurons. *Redox Biol*. 2017 Apr;11:577-585. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.029. Epub 2016 Dec 31. PMID: 28110213; PMCID: PMC5247568.

Tribble D, Shapira R. Myelin proteins: degradation in rat brain initiated by metabolites causative of maple syrup urine disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983 Jul 29;114(2):440-6. doi: 10.1016/0006-291x(83)90799-4. PMID: 6411085.

Valvassori SS, Bavaresco DV, Scaini G, et al. Acute and chronic administration of cannabidiol increases mitochondrial complex and creatine kinase activity in the rat brain. *Braz J Psychiatry*. 2013;35(4):380-386. doi:10.1590/1516-4446-2012-0886

van der Zee EA, Luiten PG. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol.* 1999 Aug;58(5):409-71. doi: 10.1016/s0301-0082(98)00092-6. PMID: 10380240.

Walterfang M, Bonnot O, Mocellin R, Velakoulis D. The neuropsychiatry of inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2013 Jul;36(4):687-702. doi: 10.1007/s10545-013-9618-y. Epub 2013 May 23. PMID: 23700255.

Wessler LB, Farias HR, Ronsani JF, et al. Acute exposure to leucine modifies behavioral parameters and cholinergic activity in zebrafish. *Int J Dev Neurosci.* 2019;78:222-226. doi:10.1016/j.ijdevneu.2019.10.001

Wessler LB, Ise K, Lemos IC, et al. Melatonin ameliorates oxidative stress and DNA damage of rats subjected to a chemically induced chronic model of Maple Syrup Urine Disease. *Metab Brain Dis.* 2020;35(6):905-914. doi:10.1007/s11011-020-00572-9

Zielke, H R et al. "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* vol. 18,5-6 (1996): 420-5. doi:10.1159/000111436

Zinnanti WJ, Lazovic J, Griffin K, et al. Dual mechanism of brain injury and novel treatment strategy in maple syrup urine disease. *Brain.* 2009;132(Pt 4):903-918. doi:10.1093/brain/awp024