

ÂNDREA CRISTINA RAMOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROTÓXICOS DO ÁCIDO
OCTANOICO EM CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS A UM
MODELO EXPERIMENTAL DE DEFICIÊNCIA DA
DESIDROGENASE DE ACIL-CoA DE CADEIA MÉDIA**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde como requisito
parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^a- Dr^a- Patrícia
Fernanda Schuck

CRICIÚMA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R175a Ramos, Ândrea Cristina.

Avaliação dos efeitos neurotóxicos do ácido octanoico em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média / Ândrea Cristina Ramos. – 2017.

125 p. : il. ; 21 cm.

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

Orientação: Patrícia Fernanda Schuck.

1. Ácido octanoico. 2. Oxidação mitocondrial. 3. Deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média. 4. Estresse oxidativo. 5. Déficit cognitivo. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1




UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

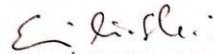
PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Ândrea Cristina Ramos** sob o título “**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROTÓXICOS DO ÁCIDO OCTANOICO EM CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DE ACIL-CoA DE CADEIA MÉDIA**”, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

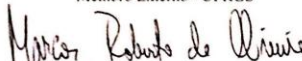
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.


Criciúma, SC, 08 de fevereiro de 2017.


Prof.^a Dra. **SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**
Membro Relator – UNESC


Prof. Dr. **EMÍLIO LUIZ STRECK**
Membro Interno – UNESC


Prof.^a Dra. **CRISTIANE MATTÉ**
Membro Externo - UFRGS


Prof. Dr. **MARCOS ROBERTO DE OLIVEIRA**
Membro Externo – UFMT


Prof. Dr. **Eduardo Pacheco Rico**
Rep. Orientadora Prof.^a Patricia Schuck


Prof.^a Dra. **Jostane Budni**
Coordenadora Adjunta do PPGCS

Folha Informativa

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo e do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense e do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular do Departamento de Biologia Celular e Molecular em Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Dedico este trabalho aos meus familiares, especialmente aos meus pais, Sônia e Jailson, que sempre me incentivaram, e ao meu marido Cássio, que esteve presente em todos os momentos me fazendo seguir em busca dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus;

Agradeço à minha família, meus pais Sônia e Jailson que sempre me mostraram o melhor caminho a seguir e meus irmãos Juliano e Irian pelos momentos de descontração;

Agradeço especialmente ao meu marido Cássio pelo incentivo pelo carinho, amor e ombro amigo nos momentos difíceis desta minha trajetória.

Agradeço a minha orientadora, Patrícia Fernanda Schuck, por não ter medido esforços em sempre me ajudar quando necessário, bem como me passar todo seu conhecimento nesse período, e pela sua orientação; é uma pessoa que tenho um carinho imenso;

Aos professores Eduardo Rico, Emilio Streck e Samira Valvassori, por toda a ajuda e os momentos de descontração no lab.

Agradeço especialmente a Gabriela, Samira e a Thaís, pela amizade, por sempre me apoiarem e me darem forças, me incentivando sempre;

Agradeço a Cinara, Isabela, Camila, Adri, Tamires e Gislaine, pela amizade e ajuda no decorrer da minha trajetória;

Agradeço a toda a equipe do LEIM, por toda ajuda necessária para chegar até aqui, especialmente ao Hugo pelas conversas e parceria durante as cirurgias e experimentos.

Às nossas ICs Malu, Débora, Camila e Priscila.

Ao Zé pelas conversas e ajuda no laboratório.

Agradeço a Jotele, pelo companherismo e os momentos de descontração, obrigada pela amizade.

Aos amigos do Neurotox, em especial a Milena, Lara, Dani, Roger, Wilson, Gustavo, Fernanda Gava pela amizade e momentos de descontração no Lab.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pelos ensinamentos.

Aos laboratórios de Neurociências (UNESC) e de Biologia Genômica e Molecular (PUCRS) pelas colaborações realizadas nesse estudo.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela formação e pela possibilidade de realizar esse trabalho de pesquisa.

Agradeço também a FAPESC eo PPGCS, pelo auxílio financeiro.

A toda a família dos Laboratórios de Bioenergética, Fisiopatologia Experimental, Neurotox e Biotério, pela grande amizade, convivência e troca de experiência.

Agradeço a todos meus amigos que me ajudaram indiretamente para que eu chegasse até aqui; Meu muito obrigada a todos!!!

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”.

Paulo Freire

RESUMO

A deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (MCADD) é o mais frequente defeito da oxidação mitocondrial de ácidos graxos de cadeia média, caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo tecidual predominante do ácido graxo octanoico (AO) e seus metabólitos secundários. Os pacientes afetados apresentam disfunção neurológica, hipoglicemia hipocetótica, rabdomiólise, hepatomegalia, hiperamonemia, letargia e convulsões, podendo rapidamente evoluir para o coma e morte. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos dos danos neurológicos apresentados pelos pacientes afetados por esse distúrbio ainda não estão bem esclarecidos. Assim, o propósito do presente estudo foi avaliar o efeito da administração intracerebroventricular (ICV) de AO sobre os testes comportamentais, sistema colinérgico, níveis de neurotrofinas e estado redox celular em cérebro de ratos. Ratos Wistar machos com 60 dias de vida foram divididos em dois grupos experimentais: grupo AO, cujos animais receberam uma administração ICV de AO (1,66 $\mu\text{mol}/2 \mu\text{L}$), e grupo controle, cujos animais receberam administração ICV de líquido cefalorraquidiano artificial (2 μL). Uma hora após a administração, os animais foram submetidos às tarefas comportamentais (esquiva inibitória simples, esquiva inibitória de treinos contínuos, habituação ao campo aberto, reconhecimento de objetos). Imediatamente após, foram submetidos a eutanásia por decapitação e o córtex cerebral, o hipocampo, o estriado foram isolados e utilizadas para avaliação da atividade das enzimas importantes para o sistema colinérgico, níveis de neurotrofinas e estado redox celular. Os resultados demonstraram que a administração aguda de AO ICV em ratos adultos induziu um déficit cognitivo. Ainda nesse contexto, observou-se uma diminuição dos níveis de neurotrofinas, onde o fator de crescimento neuronal (NGF) mostrou-se reduzidos em hipocampo e estriado após a administração aguda ICV de AO, nesse sentido os níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) mostrou-se diminuído no estriado. Por outro lado a expressão de mRNA das proteínas NGF e BDNF não apresentou nenhuma alteração. Os resultados ainda demonstraram que a exposição aguda ao AO provoca um aumento da carbonilação de proteínas em córtex cerebral, hipocampo de ratos adultos, bem como uma peroxidação lipídica aumentada, onde os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) encontram-se elevados em córtex cerebral, estriado. Investigamos ainda as atividades antioxidantes,

onde a atividade da enzima catalase (CAT) foi aumentada no córtex cerebral e no hipocampo, no entanto a atividade da superóxido dismutase (SOD) não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados. Esses resultados sugerem que o AO causa um desequilíbrio nos níveis de neurotrofinas, culminando em alterações cognitivas importantes. Além disso, sugerimos que o estresse oxidativo está diretamente ligado ao comprometimento do SNC e pode ser considerado um importante mecanismo fisiopatológico subjacente ao dano cerebral observado na deficiência de MCAD.

Palavras-chave: ácido octanoico, deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média, déficit cognitivo, estresse oxidativo, neurotrofinas, sistema colinérgico.

ABSTRACT

Deficiency of medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCADD) is the most frequent defect of the mitochondrial oxidation of medium chain fatty acids, characterized biochemically by the predominant fatty acid octanoic acid accumulation, OA and its secondary metabolites. The affected patients present neurological dysfunction, hypoglycemia, hyperammonemia, lethargy and convulsions, being able to quickly evolve to coma and death. However, the pathophysiological mechanism of the neurological damage presented by the patients affected by this disorder aren't very clear yet. Thus, the study purpose was to evaluate the intracerebroventricular (ICV) administration effect of OA on the behavioral tests, cholinergic system, neurotrophins levels and cellular redox status in rat brain. Wistar male rats with 60 days of life were divided in two experimental groups: OA group, whose animals received ICV administration of artificial cerebrospinal fluid (2 μ L). An hour after the administration, the animals were submitted to behavioral tasks (simple inhibitory avoidance, inhibitory avoidance of continuous training, habituation to the open field, object recognition and forced swimming). Then, the animals were submitted euthanized by decapitation and the cerebral cortex, hippocampus and striatum were isolated, cleansed and used to the evaluation of the activity of the important enzymes to the cholinergic system, neurotrophins levels and cellular redox state. The results showed that the ICV acute administration of OA in adult rats induced a cognitive deficit. Still in this context, a decrease in the levels of neurotrophins was observed, where the neuronal growth factor (NGF) was shown to be reduced in the hippocampus and striatum after the ICV acute administration of OA, in this sense the neurotrophic derived from the encephalon factor levels (BDNF) was shown to be decreased in the striatum. On the other hand the mRNA expression of the NGF and BDNF proteins didn't present any alterations. The results still show that the acute exposition to AO causes an increased carbonylation of proteins in cerebral cortex and hippocampus of adult rats, as well as an increased lipid peroxidation, where the levels of reactive substances to thiobarbituric acid (TBA-RS) found themselves increased in the cerebral cortex and striatum. We also investigated the antioxidants activities, where the catalase (CAT) enzyme activity was increased in the cerebral cortex and in the hippocampus, however, the superoxide dismutase (SOD) didn't present significant difference between the studied groups. These results suggest that the AO causes an imbalance in the neurotrophin levels,

culminating in important cognitive changes. Besides, we suggest that the oxidative stress is directly linked to the SNC commitment and can be considered as an important pathophysiological mechanism subjacent to the cerebral damage observed in the MCADD deficiency.

Key words: Cholinergic system; Cognitive deficit; MCADD; Neurotrophins; Octanoic acid; Redox Cellular.

Lista de Figuras

Figura 1- Esquema de uma volta da espiral de beta-oxidação de ácidos graxos.....	44
Figura 2- Esquema representativo das neurotrofinas e de seus receptores	51
Figura 3- Esquema representativo, do sistema colinérgico.....	54
Figura 4- Fontes endógenas de espécies reativas e sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.....	58
Figura 5- Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a memória de habituação ao campo aberto em ratos com 60 dias de vida.....	65
Figura 6- Efeito da administração aguda intracerebroventricular do ácido octanoico (AO) sobre a memória de longo prazo nas sessões de treino e teste (24 h após o treino) na tarefa de esQUIVA inibitória em ratos com 60 dias de vida.....	73
Figura 7- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a aquisição (A) e retenção (B) de memória durante o teste de esQUIVA inibitória de múltiplos treinos.	74
Figura 8- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a memória não aversiva na tarefa de reconhecimento de objetos em ratos com 60 dias de vida.....	75

Figura 9- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre os níveis do fator de crescimento neural (NGF) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida.....76

Figura 10- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre os níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida..... 77

Figura 11- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a expressão do genes codificadores das proteínas do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) figura (A) e do fator de crescimento neural (NGF) figura (B) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida.....78

Figura 12- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida.....79

Figura 13- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima colina acetiltransferase (ChAT) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida.....80

Figura 14- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre o conteúdo de grupos carbonila em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida.....81

Figura 15- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida.....82

Figura 16- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre os níveis de nitratos e nitritos em córtex

cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida.....83

Figura 17- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína reduzida (DCFH) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida84

Figura 18- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida.....85

Figura 19- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida.....86

Figura 20- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida.....87

Figura 21- Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima glutatona redutase (GR) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida.....88

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequência dos <i>primers</i> para a avaliação de RNAm por RT-P.....	65
---	----

Lista de Abreviaturas

4-PDS- 4'4 ditiopiridona

4-TP- 4-tiopiridona

8OHdG 8-hidroxi-2-deoxiguanosina

AcD – Ácido *cis*-4-decenoico

Acetil-CoA – Acetil-Coenzima A

ACh – Acetilcolina (do inglês *acetylcholine*)

AChE – Acetilcolinesterase (do inglês *acetylcholinesterase*)

AcSCh – Iodeto de acetilcolina (do inglês *acetylthiocholine iodide*)

aCSF – Líquido cérebrospinal artificial (do inglês *Artificial cerebral spinal fluid*)

AD – Ácido decanoico

Akt - Proteína cinase B (do inglês *protein kinase B*)

AMPC- Monofosfato de adenosina cíclico (do inglês *cyclic adenosine monophosphate*)

AO – Ácido octanoico

ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)

BDNF – Fator de crescimento derivado do encéfalo (do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*)

cdNA- Ácido desoxirribonucléico complementar

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CG- Cromatografia gasosa

ChE – Colinesterase (do inglês *cholinesterase*)

CoA – Coenzima A

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPTI – Carnitina palmitoiltransferase I

CREB- Proteína de ligação dos elementos responsivos ao cAMP (do

CTPII - Carnitinapalmitoil transferase II

DCF-DA- Diacetato de 2,7-diclorofluoresceína

DCFH- Diacetato de 2,7-diclorofluoresceína reduzido

DNA- Ácido desoxirribonucleico (do inglês *desoxyribonucleic acid*)

DTNB – Ácido ditionitrobenzoico

EC- Comissão de enzimas (do inglês enzyme comission)

EDTA - Ácido etilendiaminotetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*)

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês enzyme linked immuno sorbent assay)

ERK- Proteína quinase regulada por sinais extracelulares (do inglês extracellular signal-regulated kinase)

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FAD – Dinucleotídeo de flavina e adenina, forma oxidada (do inglês *flavin adenine dinucleotide, oxidized form*)

FADH₂ - Dinucleotídeo de flavina e adenina, forma reduzida (do inglês *flavin adenine dinucleotide, reduced form*)

GPx – Glutationa peroxidase

GSH – Glutationa reduzida

ICV – Intracerebroventricular
(do inglês *cAMP responsive element binding protein*)

LCAD – Desidrogenase de acil-coenzima A de cadeia longa (do inglês *long-chain acyl-CoA dehydrogenase*)

LCHAD – Desidrogenase de 3-hidroxi-acil-CoA de cadeia longa

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LTP – Potencial de longa duração (do inglês *Long-term potentiation*)

MAO - Monoamina oxidase

MCAD – Desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (do inglês *Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*)

MCADD – Deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (do inglês *Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*)

NAD⁺ - Dinucleotídeo de nicotinamida de adenina, forma oxidada (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form*)

NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida de adenina, forma reduzida (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form*)

NADPH- Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NAK – Na⁺,K⁺-ATPase

NGF – Fator de crescimento neural (do inglês *Nerve growth factor*)

NO - Óxido Nítrico (do inglês *Nitric oxide*)

NOS – Óxido nítrico sintase (do inglês *Nitric oxide sintase*)

NT - Neurotrofinas

NT3 – Neurotrofina 3 (do inglês *neurotrophin-3*)

NT4 – Neurotrofina 4 (do inglês *neurotrophin-4*)

OC – Octanoilcarnitina

p75^{NTR} – Receptor de neurotrofina p75 (do inglês *p75 neurotrophin receptor*)

PBS – Tampão fosfato-salina (do inglês *phosphate buffered saline*)

pH - Potencial hidrogeniônico

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês *messenger ribonucleic acid*)

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase e transcriptase reversa (do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*)

SCAD – Desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (do inglês *Short-chain acyl-CoA dehydrogenase*)

SCADD – Deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (do inglês *short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*)

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

TBA-RS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric acid-reactive substances*)

TCA - Ácido tricloroacético

Trk – Receptor tirosina quinase (do inglês *tyrosine kinase receptor*)

TrkA – Receptor de tropomiosina cinase A (do inglês *tropomyosin-related kinase A*) **TrkB** - Receptor de tropomiosina cinase B (do inglês *tropomyosin-related kinase B*)

TrkC – Receptor de tropomiosina cinase C (do inglês *tropomyosin-related kinase C*) **VLCAD** – Desidrogenases de acil-coA de cadeia muito longa (do inglês *Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase*)

XO- Xantina Oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	43
1.1 DEFEITOS DE OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS.....	43
1.2 DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DE ACIL-COA DE CADEIA MÉDIA.....	44
1.1.1 Sinais e Sintomas e Achados Bioquímicos.....	45
1.1.3 Epidemiologia.....	46
1.1.4 Diagnóstico.....	46
1.1.5 Tratamento.....	47
1.1.6 Fisiopatologia da MCADD.....	47
1.2 NEUROTROFINAS.....	50
1.3 SISTEMA COLINÉRGICO.....	53
1.4 SISTEMA <i>REDOX</i> CELULAR.....	56
1.5 JUSTIFICATIVA.....	59
2 OBJETIVOS.....	60
2.1 OBJETIVO GERAL.....	60
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
3 METODOLOGIA.....	61
3.1 ANIMAIS.....	61
3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	61
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	62
3.4 TAREFAS COMPORTAMENTAIS.....	62
3.4.1 Habituação ao Campo Aberto (Memória de Habituação).....	62
3.4.2 Esquiva Inibitória.....	63
3.4.3 Esquiva Inibitória de Treinos Contínuos.....	63
3.4.4 Reconhecimento de objetos.....	64
3.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE BDNF E NGF.....	64
3.6 EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT- QPCR).....	64
3.7 ATIVIDADE DA AChE.....	66
3.8 ATIVIDADE DA ChAT.....	66
3.9 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	67
3.9.1 Níveis de Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA- RS).....	67
3.9.2 Conteúdo de Grupos Carbonilas.....	67
3.9.3 Níveis de nitratos e nitritos.....	68
3.9.4 Oxidação de DCFH.....	68

3.9.5 Atividade da CAT.....	68
3.9.6 Atividade da SOD.....	69
3.9.7 Atividade da GPx.....	69
3.9.8 Atividade da GR.....	69
3.9.9 Dosagem de Proteínas.....	70
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
5 RESULTADOS.....	72
6 DISCUSSÃO.....	89
7 CONCLUSÃO.....	96
REFERÊNCIAS.....	97
ANEXOS.....	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFEITOS DE OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

A beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos é a principal via metabólica envolvida na síntese de trifosfato de adenosina (ATP), especialmente durante períodos de jejum e exercício intenso (Lunt e Vander Heiden, 2011; Nelson e Cox, 2014). Além disso, a energia obtida pela oxidação de ácidos graxos também auxilia na manutenção da glicemia através da síntese de corpos cetônicos, que podem ser utilizados como substrato energético alternativo para o cérebro. Assim, há uma diminuição da dependência das reservas de glicogênio (Jameson e Walter, 2015).

A rota de oxidação dos ácidos graxos é complexa e inclui captação celular de ácidos graxos, ativação desses ésteres acil-Coenzima A (acil-CoA), *trans*-esterificação a acilcarnitinas, translocação através da membrana mitocondrial, reesterificação a acil-CoA e a espiral da beta-oxidação intramitocondrial propriamente dita, que fornece elétrons para flavoproteínas transferidoras de elétrons e acetil-CoA. Cada etapa da espiral de oxidação é catalisada por enzimas específicas para o comprimento da cadeia carbônica do ácido graxo (Figura 1) (Smith et al., 2005; Lunt e Vander Heiden, 2011).

Defeitos da beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos são doenças genéticas causadas pela deficiência de uma das enzimas presentes nas diferentes fases da degradação destes compostos, bem como no transporte e na ativação desses ácidos orgânicos, levando ao acúmulo de seus metabólitos. (Moczulski et al., 2009). Atualmente, são descritas ao menos 25 diferentes enzimas deficientes dentro desse grupo de doenças, incluindo defeitos no transporte de carnitina pela membrana plasmática, carnitina palmitoiltransferase I (CPTI; EC 2.3.1.21) e carnitina/acilcarnitina translocase II (CPTII; 2.3.1.21), além das deficiências das desidrogenases de acil-CoA de cadeia muito longa (VLCAD; 1.3.99.3), de acil-CoA de cadeia longa (LCAD; EC 1.3.8.8), de acil-CoA de cadeia média (MCAD; 1.3.8.7) e de acil-CoA de cadeia curta (SCAD; EC 1.3.8.1) que fazem parte da espiral de beta-oxidação (Roe e Ding, 2001; Bastin, 2014). Esses distúrbios de beta-oxidação abrangem um aspecto heterogêneo de manifestações clínicas que afetam principalmente os tecidos que dependem de ácidos graxos como substrato energético direta ou indiretamente (Rinaldo et al., 2002; Bastin et al., 2014).

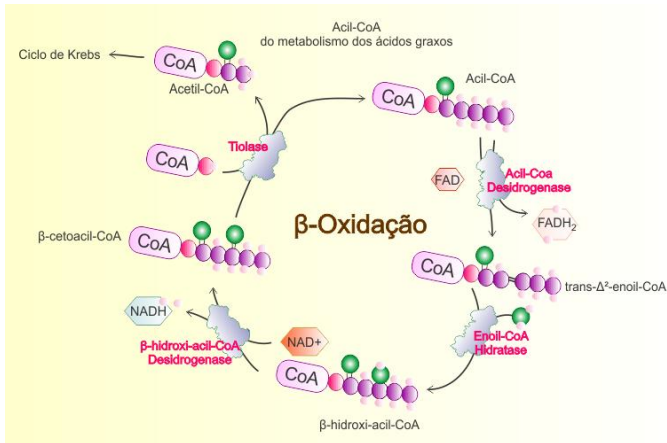


Figura 1: Esquema de uma volta da espiral de β -oxidação de ácidos graxos. Cada volta da espiral é composta por quatro reações: oxidação, hidratação, nova oxidação e clivagem. Os produtos finais da via são acil-CoA, acetil-CoA, NADH e $FADH_2$. CoA: Coenzima A; FAD: dinucleotídeo de flavina e adenina, forma oxidada; $FADH_2$: dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido; n: número indefinido; NAD^+ : dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidado; NADH: de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido. Elaborado pela Autora.

1.2 DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DE ACIL-COA DE CADEIA MÉDIA

A MCAD é a enzima mitocondrial responsável pela catálise do primeiro passo da oxidação de acil-CoA de cadeia média (4-12 carbonos) (Matsubara et al., 1992). A deficiência da MCAD (MCADD; OMIM 201450) é o mais frequente distúrbio da oxidação de ácidos graxos (Roe e Ding, 2001; Lunt e Vander Heiden, 2011; Wiles et al., 2014), apresentando padrão de herança mendeliana autossômico recessivo. É causada por mutações no gene *ACADM*, gene composto por 12 éxons que está localizado na região 31.1 do braço curto do cromossomo 1 (Zang et al., 1992). Este defeito enzimático conduz ao acúmulo dos ácidos octanoico (AO), decanoico (AD) e *cis*-4-decenoico (AcD), bem como seus conjugados de glicina e carnitina em tecidos e fluidos corporais de pacientes (Onkenhout et al., 1995; Rinaldo et al., 2002).

Crises metabólicas devidas ao aumento da demanda energética em situações de catabolismo exacerbado tais como jejum e infecções bacterianas e virais, são responsáveis por desencadear

sintomas de intoxicação nos pacientes, como: vômitos, tonturas, letargia, podendo evoluir a coma e morte. Dentre os pacientes acometidos pela MCADD, 25 % não sobrevivem à primeira crise metabólica e 16 % dos pacientes sobreviventes apresentam sequelas neurológicas graves (Oerton et al., 2011). Adicionalmente, esta doença está relacionada à síndrome da morte súbita do lactente (Dessein et al., 2010; Willemijn et al., 2016).

Os primeiros sinais clínicos-laboratoriais da MCADD geralmente aparecem nos primeiros meses de vida, embora possam se manifestar até a fase adulta (Ruitenbeek et al., 1995; Lang, 2009; Leydiker et al., 2011). Koster (2014) relata que, para avaliar a gravidade clínica, é importante estudar o fenótipo do paciente. Nesse sentido, Leal (2014) sugere que existe uma variabilidade de fenótipos, levando as variações e diferentes gravidades clínicas. Por outro lado, estudos indicam não haver correlação entre genótipo e fenótipo, sugerindo que não se pode prever o fenótipo bioquímico (Gramer et al., 2015).

1.1.1 Sinais e Sintomas e Achados Bioquímicos

A crise metabólica pode ocorrer em qualquer idade, mas geralmente se inicia entre o 3º e 24º mês de vida (Derks et al., 2006; Grünert et al., 2015). A sintomatologia de pacientes acometidos pela MCADD, além dos sintomas de intoxicação causados pelo acúmulo dos ácidos graxos de cadeia média, incluem em longo prazo atraso no desenvolvimento psicomotor, paralisia cerebral, atraso no crescimento, deficiência intelectual, alterações comportamentais, déficit de atenção e transtornos psiquiátricos (Roe e Ding, 2001; Grosse et al., 2006; Sturm et al., 2012).

Outro achado relevante durante as crises é a hipoglicemia, muitas vezes tida como a responsável pelo dano cerebral encontrado nos pacientes (Lovera et al., 2012). No entanto, alguns autores observam que pacientes acometidos pela MCADD podem não apresentar hipoglicemia, e que sintomas como atraso no desenvolvimento psicomotor e comportamental e prejuízos de memória se deveriam ao acúmulo de ácidos graxos livres e seus ésteres de acilcarnitinas (Mayell et al. 2006; Saudubray et al., 2012; Leach et al., 2014; Wiles et al., 2014). Nesse sentido, alterações neurológicas como edema cerebral e anomalias no lobo frontal têm sido atribuídas à toxicidade do AO e seus metabólitos secundários (Egidio et al., 1989; Heubi et al., 1987; Maegawa et al., 2008; Wilcken et al., 2010; Leach et al., 2014).

O AO se destaca dentre os ácidos graxos acumulados, pois apresenta-se em concentrações maiores do que os demais. Durante as crises metabólicas, as concentrações plasmáticas desse ácido podem atingir 22 – 672 μM em pacientes (indivíduos normais: 0-15 μM). Adicionalmente, a MCADD é caracterizada por hipoglicemia hipocetótica, hiperamonemia, desequilíbrio hidroeletrólítico, acidose metabólica e acidemia láctica (Costa, 2000; Sturm et al., 2012; Gramer et al., 2015).

1.1.3 Epidemiologia

A MCADD é o defeito da oxidação mitocondrial de ácidos graxos mais comum possuindo uma prevalência de 1:10.000 a 1:20.000 nascidos vivos, variando de acordo com a população (Roe e Ding, 2001; Leao et al., 2008). Nesse contexto, na Alemanha, a incidência é de 1: 9773 no Reino Unido, entre 1: 20.000 e 1:9091. No Canadá, cerca de 20 novos casos de MCADD são diagnosticados por ano indicando incidência estimada de 1:16.000 (Tran, 2007).

Após a introdução de MCADD no programa de rastreio de recém-nascidos em 2002 na Alemanha, observou-se que a prevalência da MCADD era maior do que se pensava anteriormente (Andresen et al., 2001; Maier et al. 2005; Maier et al. 2009). A incidência de MCADD detectada pelo rastreio de recém-nascidos na Dinamarca é de 1 em 8.954. Por outro lado, a incidência de MCADD na Dinamarca durante os últimos 10 anos, antes do programa de triagem, foi de apenas 1 em 39.691 (Andresen et al., 2012).

Em todo o mundo, a maior incidência de MCADD parece estar no norte da Alemanha (cerca de 1: 5000) (Hoffmann et al., 2004) e a menor no extremo oriente do Japão e Taiwan (Shigematsu et al., 2002; Niu et al., 2010)

Cartazi (2013) demonstrou que após a triagem de 324.000 recém-nascidos, na Itália, foram diagnosticados 14 casos de MCADD. Esses resultados revelam uma taxa aumentada de diagnóstico de 1: 23.000, de acordo com dados publicados.

1.1.4 Diagnóstico

Para identificar pacientes com distúrbios na oxidação de ácidos graxos, testes de triagem neonatal são realizados. Nesse sentido, o diagnóstico da MCADD pode ser realizado pela quantificação de metabólitos acumulados no plasma (octanoilcarnitina) ou na urina (conjugados com glicina de hexanoato e fenilpropinato) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) (Wilcken et al., 2003; Maier et al., 2009; Andresen et al., 2012). O

diagnóstico é confirmado pela medida da atividade da enzima deficiente em fibroblastos cultivados (Nelson, 2009) e por análise molecular, identificando mutações conhecidas da MCADD (Van Hove et al., 1993; Roe e Ding, 2001; McKinney et al., 2004; Mattern e Rinaldo, 2015). Das (2012) sugere que o acompanhamento de pacientes com MCADD deve ser contínuo, para se evitarem as crises metabólicas devastadoras.

1.1.5 Tratamento

O tratamento da MCADD tem como objetivo a prevenção do desenvolvimento da deficiência intelectual e a morte súbita precoce (Kompare e Rizzo, 2008). A terapia atual enfatiza a prevenção do jejum, uma dieta com altos teores de carboidratos e baixos teores de lípidos, cuidados especiais durante episódios de infecções, rápida correção da hipoglicemia e hidratação durante as crises agudas (Roe e Ding, 2001; Nennstiel- Ratzel et al., 2005; Wilcken et al., 2007; Dessein et al., 2010; Lindner et al., 2011; Andresen et al., 2012).

Em longo prazo, a L-carnitina tem sido administrada em pacientes com doenças metabólicas com acúmulo de ácidos orgânicos, tais como acidemia metilmalônica, acidemia propiônica, acidemia isovalérica, acidemia glutárica tipo II e também por pacientes afetados por MCADD (Lee et al., 2005). Esse tripeptídeo é utilizado como terapia coadjuvante, ligando-se aos ácidos orgânicos, permitindo assim a sua excreção na forma de acilcarnitinas ou ainda corrigindo os níveis de deficiência secundária de carnitina. Neste cenário, na MCADD ocorre a conversão de AO a octanoilcarnitina, metabólito de menor toxicidade e de excreção mais fácil do que o ácido graxo correspondente (Lee et al., 2005; Ribas et al., 2012). Couce (2013) sugere que a difença de genótipo de *ACADM* pode resultar em uma deficiência maior ou menor dos níveis de carnitina, indicando que a dose de L-carnitina seria administrada de forma diferente para cada paciente, embora ainda seja controversa (Spiekerkoetter et al., 2010). Ressalta-se que estas medidas atenuam, mas não podem prevenir totalmente as crises e os sintomas neurológicos nos pacientes (Wilcken et al., 2007). Nesse sentido, novos estudos e estratégias terapêuticas são necessários para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

1.1.6 Fisiopatologia da MCADD

Uma das principais consequências da MCADD é a falta de substratos energéticos durante estados catabólicos, incluindo a diminuição da cetogênese para suprir as demandas energéticas. Tal fato ocasiona uma exaustão da síntese de glicose, levando a um quadro

hipoglicêmico, uma situação que pode ter consequências graves sobre o metabolismo energético cerebral, podendo ser parcialmente responsável pelo desenvolvimento da encefalopatia (Roe e Ding, 2001; Rinaldo et al., 2002; Bennett et al., 2000). Outra consequência da não utilização de ácidos graxos de cadeia média é o acúmulo de acil-CoA de cadeia média dentro das mitocôndrias, ocasionando uma elevação na razão acil-CoA: CoA. Tal acúmulo leva à inibição das enzimas piruvato desidrogenase e α -cetogluturato desidrogenase, que utilizam CoA como substrato (Rinaldo et al., 2002).

Com a diminuição da síntese de acetil-CoA, há diminuição da síntese de citrato. Este último, por sua vez, é precursor do malato, metabólito necessário para a síntese de glicose via gliconeogênese, e precursor de malonil-CoA, o principal regulador inibitório da CPT I, enzima responsável pela entrada de ácidos graxos de cadeia longa na matriz mitocondrial (Grosse et al., 2006; Lunt e Vander Heiden, 2011). Portanto, a diminuição dos níveis de citrato ocasionada pelo acúmulo do AO e outros ácidos graxos na MCADD provoca também uma inibição da gliconeogênese e uma diminuição da entrada de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria, agravando a hipoglicemia e induzindo o acúmulo de derivados de acil-CoA nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes (Roe e Ding, 2001) e o dano cerebral (Wajner e Amaral, 2015).

Para melhor compreender os mecanismos de toxicidade dos ácidos graxos de cadeia média, foram desenvolvidos modelos animais de MCADD. O primeiro modelo animal foi desenvolvido em coelhos através da infusão de AO, e foram observadas alterações cerebrais nesses animais (Trauner e Huttenlocher, 1978; Trauner, 1982). Em 2008, Derks e colaboradores desenvolveram um modelo experimental de MCADD em camundongos induzidos pela administração aguda de ácido 2 tetra-deciliglicídico, um inibidor da oxidação mitocondrial de ácidos graxos, utilizado para verificar alterações no metabolismo da glicose (Derks et al., 2008).

A hiperamonemia também é observada em pacientes com MCADD (Ruitenbeek et al., 1995). Segundo Fenton e Rosenberg (1995), ésteres de CoA inibem diretamente a enzima carbamilsfotato sintetase I, responsável pelo primeiro passo do ciclo da ureia. Um bloqueio na síntese de ureia resulta no acúmulo de amônia. Adicionalmente, com a intensa proteólise para a utilização de aminoácidos como substratos energéticos para compensar a deficiência da beta-oxidação, há uma maior liberação de amônia (Smith et al.,

2005), que apresenta alta toxicidade para os tecidos em geral, especialmente para o sistema nervoso central (SNC) (Felipo e Butterworth, 2002).

Outros autores sugerem que o quadro de letargia pode evoluir a coma e morte devido, particularmente, ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia média e seus derivados de acilcarnitinas (Gregersen et al., 2008). Os mesmos ácidos graxos também alteram parâmetros de respiração celular e a homeostase mitocondrial do cálcio, atuam como desacopladores e alteram o estado *redox* mitocondrial (Reis de Assis 2004; Schuck et al., 2010; Tonin et al., 2012; Amaral et al., 2016). De acordo com Olson e colaboradores (1989), atribui-se ao AO, quando testado *in vitro*, a inibição do controle do volume astrocitário com a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em cultura de células gliais. Corroborando tais resultados Reis e colaboradores (2004) mostraram que o AO inibiu moderadamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos jovens. Neste sentido, foi demonstrado que ácidos graxos de cadeia média inibem o metabolismo mitocondrial, estimulando o transporte de lactato e corpos cetônicos entre astrócitos e neurônios (Thevenet et al., 2016).

Além disso, Schuck et al. (2007) observaram que o AcD provoca alterações em parâmetros de dano oxidativo e reduz defesas antioxidantes em córtex cerebral de ratos. Da mesma forma, foi demonstrado que os ácidos graxos AO e AD *in vitro* induzem estresse oxidativo em cérebro de ratos (Schuck et al., 2009a). Neste cenário, Derks e colaboradores (2014) demonstraram alterações de parâmetros de dano oxidativo e defesas antioxidantes em plasma de pacientes acometidos pela MCADD. Adicionalmente, foram observados em pacientes níveis aumentados de fosfatidilcolinas oxidadas em amostras de sangue de pacientes, corroborando o envolvimento do estresse oxidativo nos mecanismos fisiopatológicos da MCADD (Najdekr et al., 2015). Apesar desses achados, a fisiopatologia do dano cerebral encontrado em pacientes acometidos pela MCADD ainda é pouco compreendida. Nesse sentido, fazem-se necessários estudos que investiguem aspectos neuroquímicos envolvidos no déficit cognitivo apresentado pelos pacientes.

1.2 NEUROTROFINAS

Os fatores neurotróficos ou neurotrofinas (NT) são polipeptídeos com estrutura e função relacionadas à sobrevivência e diferenciação de populações de neurônios, tanto no SNC como no sistema nervoso periférico (SNP) (Lewin e Barde, 1996; Sterne et al., 1997; Mariga et al., 2016). Além disso, estão envolvidas em processos de sinaptogênese e plasticidade neuronal (Lim et al., 2003), bem como em processos cognitivos (Rybakowski et al., 2006). Seu conjunto de ações inclui também a inibição do processo de morte celular por apoptose (Felderhoff-Mueser et al., 2002; Shaltiel et al., 2007). Conseqüentemente, a viabilidade neuronal pode ser afetada pela redução persistente dos níveis dessas NT no SNC (Du et al., 2003; Chão et al., 2003; Longo et al., 2007).

As NT são sintetizadas e secretadas por diferentes tipos celulares, que as regulam em tecidos embrionários e em adultos (Moris e Vega, 2003; Mariga et al., 2016). Essas proteínas incluem o fator de crescimento neural (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), NT-3 e NT-4/5 (Wozniak, 1993; Barbacid, 1995). Para mediar suas ações, existem receptores de tropomiosina quinase (Trk), uma família de receptores tirosina quinase. São 3 receptores, sendo que o NGF liga-se ao Trk-A, o BDNF e a NT-4 ligam-se ao receptor Trk-B e a NT-3 liga-se ao receptor Trk-C (Figura 2) (Kalb, 2005; Bothwell, 2016).

Já as pró-neurotrofinas apresentam alta afinidade ao receptor $p75^{NTR}$, ativando cascatas apoptóticas e à morte (Nykjaer et al., 2004). Além disso, o receptor $p75^{NTR}$ também pode ser visto como modulador, podendo alterar a especificidade da ligação dos receptores Trk (Benedetti et al., 1993; Lu et al., 2005). Nesse sentido, Kraemer e colaboradores (2014) sugerem que processos mediados por $p75^{NTR}$ contribuem de diferentes maneiras para o desenvolvimento, maturação e manutenção do SNC.

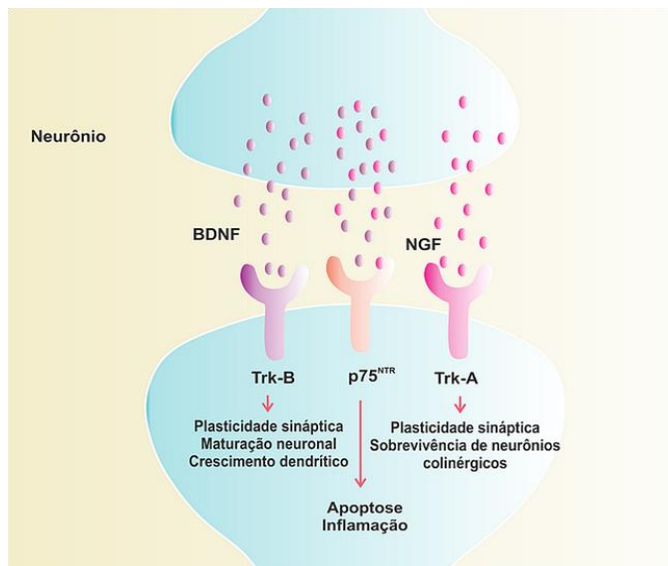


Figura 2: Esquema representativo dos fatores neurotróficos e seus receptores específicos. As neurotrofinas ligam-se seletivamente a receptores específicos de Trk, promovendo a sua dimerização e ativação de várias vias de transdução de sinal. O NGF liga-se com alta afinidade ao Trk-A o BDNF liga-se ao Trk-B, ao passo que todas as pró-neurotrofinas se ligam ao receptor p75^{NTR} ativando cascatas de morte celular. BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; NGF = Fator de crescimento neural; Trk = receptor tropomiosina cinase. Elaborado pelo Autor.

O NGF foi o primeiro fator de crescimento a ser identificado (Calza et al., 2001; Calissiano et al., 2010), sendo originalmente identificado em glândulas salivares de ratos que contêm grandes quantidades dessa proteína (Yin et al., 1998). De acordo com Darling e colaboradores (1983), o pré-pró-NGF é sintetizado e modificado para pró-NGF no retículo endoplasmático, onde passará por alterações nos terminais amino e carboxílico, resultando na forma biologicamente madura e ativa do NGF (Lim et al., 2003). É produzido pelos órgãos-alvos, como córtex cerebral, hipocampo, hipófise e medula espinhal, de onde é enviado para os corpos celulares por transporte axonal retrógrado após conexão a receptores específicos (Lewin e Barde, 1996; Terenghi, 1999; Shoval e Weizman, 2005).

O pró-NGF interage através do seu pró-domínio p75^{NTR}, considerando que as interações com TrkA são provavelmente mediados

pelo domínio maduro. No entanto, a ligação de ambos os receptores ao pró-NGF na superfície das células é necessária para gerar locais de afinidade elevada e mediar à cascata de apoptose (Nykjaer et al., 2004). Estudos recentes demonstram que o pró-NGF ativa eventos celulares dependentes de $p75^{\text{NTR}}$, incluindo apoptose e quimiotaxia, e que pode desempenhar um papel na morte neuronal e oligodendroglial no cérebro e na medula espinhal (Beattie et al., 2002; Shonukan et al., 2003; Nykjaer et al., 2014).

Segundo Landreth (2006), o NGF possui efeitos sobre as respostas fisiológicas de neurônios maduros. Estudos indicam um papel do NGF na proteção contra a neurodegeneração em doenças como esclerose múltipla e doenças de Alzheimer e Parkinson (Hellweg et al., 1998; Shoval e Weizman, 2005; Valenzuela et al., 2007; Ziegenhorn et al., 2007). Neste cenário, o aumento dos níveis das NT tem a função prioritária de proteger os neurônios da excitotoxicidade (Lessmann et al., 2003).

A molécula de BDNF é sintetizada primeiramente na forma de pré-pró-BDNF e seu RNA mensageiro (mRNA) direciona a síntese da proteína nascente para o retículo endoplasmático, onde seguirá para a via secretora (Lessmann et al., 2003). A proteína nascente é clivada no retículo endoplasmático, dando origem ao pró-BDNF, que será envolto pelo complexo de Golgi e empacotado em vesículas secretoras para liberação espontânea ou por estímulo (Chen et al., 2006; Leal et al., 2014). O pró-BDNF secretado por neurônios (substância negra, amígdala, hipotálamo, cerebelo e córtex cerebral) e células de Schwann é posteriormente convertido a BDNF maduro por proteases extracelulares (Pang et al., 2004). Esse fator neurotrófico é produzido principalmente pela glia e pelo núcleo dos neurônios e possui grande expressão em hipocampo, neocórtex, amígdala e cerebelo (Shimizu et al., 2003).

O BDNF promove a sobrevivência de neurônios colinérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos hipocámpais e corticais (Alderson et al., 1990; Hyman et al., 1991; Gosh et al., 1994; Rumajoge et al., 2004; Mariga et al., 2016), podendo seus efeitos variar conforme a fase do desenvolvimento. No início da fase fetal, o BDNF é importante para a formação e maturação dos neurônios em geral. Na fase adulta, tem papel fundamental no processo de consolidação da memória episódica (Chao et al., 2003; Huang et al., 2003). Contudo, as ações distintas do BDNF mediada pela ativação do receptor $p75^{\text{NTR}}$ incluem a promoção de mielinização (Chan et al., 2002), migração neuronal (Carter et al.,

2003), apoptose neuronal (Bamji et al., 1998; Boyd e Gordon, 2002; Troy et al., 2002) e depressão em longo prazo (Balkowiec et al., 2000; Chen et al., 2010).

O BDNF está envolvido na formação de diferentes tipos de memórias e é fundamental para a manutenção e armazenamento de longa duração de informação no hipocampo (Minichiello, 2009; Bekinschtein et al., 2014). Uma diminuição da produção de BDNF ou de seus receptores de alta afinidade prejudica diretamente os processos de memória e aprendizagem (Tyler et al., 2002; Vaynman et al., 2004; Liu et al., 2008; Mariga et al., 2016). Neste contexto, tarefas que exigem aprendizagem estão associadas a um aumento dos níveis cerebrais do mRNA de BDNF em ratos (Yamada e Nabeshima, 2003; Karpova et al., 2014).

Alterações na expressão ou no funcionamento do BDNF estão relacionadas a doenças neurodegenerativas, tais doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson, além de transtornos psiquiátricos (Howells et al., 2000; Binder et al., 2001; Ge e Lahiri, 2002; Cunha et al., 2006; Strand, et al., 2007; Pillai, 2008; de Oliveira et al., 2009; Quach et al., 2016). Estudos em modelos animais de alguns erros inatos do metabolismo também revelaram alterações nos níveis de fatores neurotróficos (Scaini et al., 2013b; Ferreira et al., 2014; Scaini et al., 2015).

Além de efeitos diretos desencadeados por BDNF e NGF sobre processos de memória e aprendizado, essas NT interagem intimamente com o sistema colinérgico. Nesse sentido, Park (2013) demonstrou que a expressão da enzima colina acetiltransferase (ChAT), responsável pela síntese do neurotransmissor acetilcolina (ACh), melhora a função cognitiva e a atividade física de ratos senescentes, além de restaurar a integridade neuronal colinérgica, efeitos esses mediados por NGF e BDNF. Adicionalmente, Sofroniew e colaboradores (2001) sugerem que a diminuição da expressão do NGF contribui para uma perda progressiva de neurônios colinérgicos, considerado um mecanismo importante na neurodegeneração.

1.3 SISTEMA COLINÉRGICO

O sistema colinérgico desempenha um papel essencial no desenvolvimento das estruturas cerebrais (Zirger et al., 2003), e alterações na neurotransmissão colinérgica durante o desenvolvimento desencadeiam danos estruturais com efeitos sobre comportamento, incluindo aprendizagem e memória (Bachman et al., 1994; Conner et al.,

2003; Hohmann et al., 2003; Barker et al., 2009; Antyborzec et al., 2016). A formação de memória e sua consolidação são resultados da ativação de mecanismos celulares colinérgicos em diferentes estruturas cerebrais (Giovannini et al., 2015). Além disso, a sinalização colinérgica mediada pelo neurotransmissor ACh é fundamental para o funcionamento do SNC (Gotti e Clementi, 2004), assim como da musculatura voluntária e involuntária (Soreq e Seidman, 2001). Nesse sentido, uma sinalização colinérgica equilibrada depende da expressão de múltiplos receptores, enzimas e transportadores (Ofek e Soreq, 2013).

A ACh é sintetizada no neurônio pré-sináptico pela ChAT (EC 2.3.1.6), armazenada em vesículas e liberada para a fenda sináptica para se ligar aos receptores colinérgicos presentes no neurônio pós-sináptico. Sua ação sobre os receptores é terminada pela ação da enzima acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) (Figura 3) (Zimmerman e Soreq, 2006).

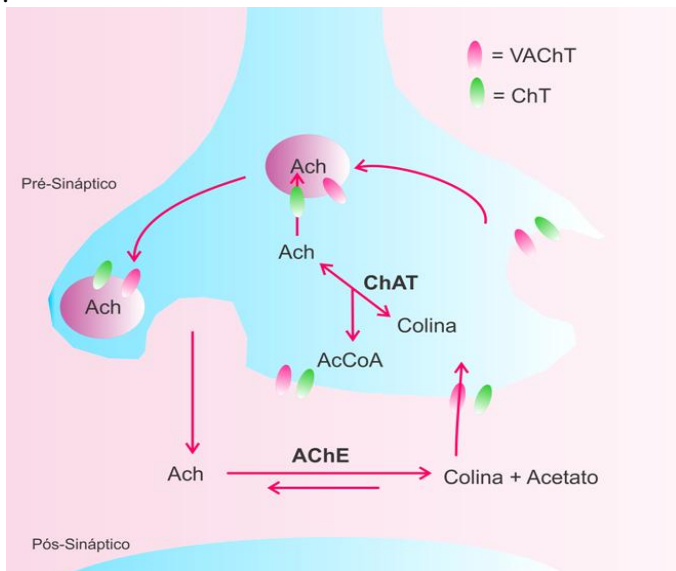


Figura 3: A acetilcolina (ACh), neurotransmissor colinérgico, é sintetizada no neurônio pré-sináptico pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) a partir de acetil-coenzima A, proveniente da oxidação do piruvato, e colina. A acetilcolina recém-sintetizada é armazenada em vesículas e liberada para a fenda sináptica por exocitose para atuar sobre os receptores colinérgicos presentes na membrana plasmática do neurônio pós-sináptico. A ação deste neurotransmissor é terminada pela enzima acetilcolinesterase, que hidrolisa a acetilcolina a

acetato e colina, os quais voltam para o neurônio pré-sináptico para a ressíntese de ACh. Fonte: Elaborado pelo Autor.

A hidrólise pela AChE ocorre tão logo o neurotransmissor tenha cumprido seu papel, ou seja, ligar-se ao receptor da membrana pós-sináptica, permitindo a abertura de canais de íons Na^+ e a consequente despolarização da membrana. Tal efeito proporcionará um potencial de ação, propagando o impulso (Stenesh, 1998). Este processo evita a propagação contínua do impulso nervoso, o que poderia acarretar efeitos comportamentais como hiperatividade, asfixia e morte (Roex, 2003). Devido à sua função regulatória nas sinapses colinérgicas, a AChE se torna extremamente importante para o equilíbrio do SNC (Hammond e Brimijoin, 1988; Rinne et al., 2003). Relacionados a um prejuízo na função da enzima AChE estão propagação neuromuscular, desenvolvimento cerebral, aprendizagem, memória e danos neuronais (Sketelj et al., 1998; Ballard et al., 2005; Zimmerman e Soreq, 2006). Além disso, a AChE está envolvida na modulação da ativação glial e fluxo sanguíneo cerebral, bem como no desenvolvimento e manutenção sináptica, podendo ainda contribuir para a formação do apoptossomo durante os processos de apoptose (Park et al., 2004; Ballard et al., 2005; Silman e Sussman, 2005).

A expressão da AChE pode variar gradualmente durante a proliferação e diferenciação neuronal, a apoptose e a gênese de doenças neurodegenerativas, tais como doenças de Alzheimer e Parkinson e demência, bem como em transtornos psiquiátricos como mania, depressão e esquizofrenia (Rakonczay, 1988; Soreq e Seidman, 2001; Dori et al., 2005). Assim, neurônios colinérgicos que expressam AChE são consideravelmente mais vulneráveis à apoptose (Soreq e Toiber, 2005). Adicionalmente, estudos da fisiopatologia de doenças metabólicas demonstraram uma associação entre o acúmulo de substratos ou metabólitos no SNC e alterações da atividade da enzima AchE, sugerindo uma interferência na neurotransmissão colinérgica na fisiopatologia de alguns erros inatos do metabolismo (Stefanello et al, 2003; Wyse et al., 2004; Zugno et al, 2008; Pederzoli et al., 2010; Scaini et al., 2012; Rodrigues et al., 2016).

A ChAT e a AChE são proteínas utilizadas como marcadores específicos do estado funcional dos neurônios colinérgicos, pois ambas desempenham papéis fundamentais na manutenção dos níveis de ACh nesses neurônios (Gaybiel e Sofroniew, 1983; Dobransky e Rylett,

2005; Contestabile et al., 2008; Jamal et al., 2009; Gokcek-Sarac et al., 2013; Kumar et al., 2016). Neste cenário, estudos demonstraram que a ChAT desempenha papel essencial no processo de aprendizagem e formação da memória (Davies et al., 1976; Kwon et al., 2015). Além disso, Bartus (2000) sugere que uma inibição da atividade da ChAT esteja diretamente relacionada ao dano cognitivo em pacientes com doenças neurodegenerativas. Ainda, Bozzali (2012) sugere que, em pacientes com a doença de Alzheimer, a disfunção do sistema colinérgico é a principal causa de déficit cognitivo, ocorrendo pela diminuição da atividade da ChAT. Outros estudos sugerem que a diferença na expressão, conversão e ativação da ChAT pode contribuir para uma diferença individual de aprendizagem e memória em ratos jovens (Gokcek-Sarac et al., 2013).

Por outro lado, estudos pré-clínicos mostraram que a atividade da ChAT não foi alterada na doença de Alzheimer, possivelmente por um mecanismo compensatório de plasticidade colinérgica (DeKosky et al., 2002; Bobkova et al., 2016). No entanto, outro estudo demonstrou que um aumento da expressão da ChAT melhora a função cognitiva, não só por ação da ACh, mas também pela reparação do sistema colinérgico mediada por BDNF e NGF (Park et al., 2013).

A degeneração do sistema nervoso colinérgico por estresse oxidativo está ligada a déficits cognitivos, associado na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (Tsakiris et al., 2001; Melo et al., 2003; Ballard et al., 2005). O tecido cerebral é particularmente sensível ao ataque de espécies reativas (ER) devido a fatores como alta demanda de oxigênio, alta concentração de íons ferro, níveis diminuídos de defesas antioxidantes em comparação a outros tecidos e o metabolismo da dopamina, que libera ER (Halliwell e Gutteridge, 2015). Nesse sentido, Derks colaboradores (2014) demonstraram alterações de parâmetros de danos oxidativos e defesas antioxidantes em plasma de pacientes acometidos pela MCADD.

1.4 SISTEMA *REDOX* CELULAR

As espécies reativas de oxigênio (ERO), em baixas concentrações, desempenham papéis fisiológicos importantes, incluindo a regulação da sinalização celular, apoptose e defesa do organismo contra agentes infecciosos (Finkel e Holbrook, 2000). No entanto, o desequilíbrio entre a geração dessas espécies e a sua remoção leva a uma condição conhecida como estresse oxidativo (Halliwell e

Gutteridge, 2007). Tal desequilíbrio apresenta consequências deletérias para a célula, tais como a peroxidação lipídica, a oxidação e consequente inativação de proteínas e lesões oxidativas ao DNA, podendo levar à perda de função e morte celular (Dröge, 2002; Halliwell e Gutteridge, 2007; Pala e Gürkan, 2008; Halliwell e Gutteridge, 2015).

As principais fontes de ERO na célula incluem a cadeia respiratória (principal sítio de geração de ERO), as reações das enzimas dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) oxidases, monoamina oxidase (MAO) e xantina oxidase (XO), todas essas reações produzindo ânions superóxido que, através da reação de Fenton, forma radicais hidroxila. A essas fontes acrescenta-se a óxido nítrico sintase (NOS), enzima que sintetiza o óxido nítrico (NO) e, a partir dele, pode ser formado o radical peroxinitrito (Halliwell e Gutteridge, 2015). Além disso, essas moléculas podem ser formadas por fatores exógenos, como a radiação ionizante e a exposição a solventes orgânicos (Halliwell e Gutteridge, 2007). Nesse cenário, as membranas celulares e organelas são particularmente sensíveis ao dano oxidativo devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas fosfolipídicas, acarretando alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, com consequente perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo das organelas e formação de produtos citotóxicos, tais como aldeídos, peróxidos, alcoóis e cetonas (Weiss et al., 1986; Uttara et al., 2009; Prakash e Kumar, 2013).

Ainda, a oxidação de proteínas resulta na perda de função, inativação de enzimas, perda da homeostase iônica, podendo levar à morte celular (Daniel et al., 2001; Thorpe e Baynes, 2003; Ullah et al., 2015). Adicionalmente, os danos oxidativos ao DNA provocam deleção e quebras de cadeias, podendo induzir novas mutações e alterando a expressão gênica, colaborando para o desenvolvimento de doenças crônicas (Lee et al., 2004).

Como proteção contra os efeitos deletérios das ERO, a célula possui uma série de defesas antioxidantes que agem sobre essas moléculas. Antioxidante é uma substância que quando presente em baixas concentrações em relação a substrato oxidável retarda ou previne a oxidação deste substrato, que pode incluir todo o tipo de molécula encontrada *in vivo* (Halliwell e Gutteridge, 2007). Esse sistema de proteção antioxidante pode ser enzimático ou não enzimático, e ambos trabalham em conjunto para minimizar os efeitos das ERO nos tecidos.

Dentre as defesas antioxidantes enzimáticas, destacam-se a superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) que é responsável pela dismutação de ânions superóxido, a forma mais abundante de ERO, a

catalase (CAT; EC 1.11.1.6), que neutraliza o peróxido de hidrogênio liberado nessa ação, glutaciona peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9), glutaciona redutase (GR; EC 1.8.1.7), glutaciona-S-transferase (GST; EC 2.5.1.18), γ -glutamilsteína ligase (GCL; EC 6.3.2.2) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD; EC 1.1.1.49) (Halliwell et al., 2001; Halliwell e Gutteridge, 2015). Sob condições fisiológicas, há um equilíbrio entre a formação de moléculas pró-oxidantes e sua remoção por antioxidantes (Valko et al. 2007), mantendo a homeostasia celular (Figura 4).

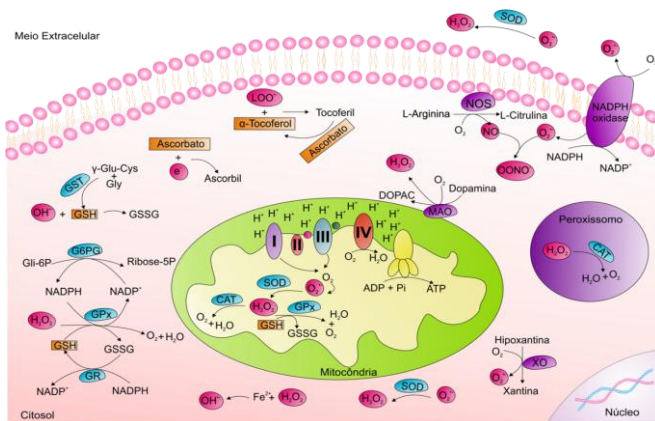


Figura 4: Fontes endógenas de espécies reativas e sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; CAT: catalase; DOPAC: Ácido 3,4- di-hidroxifenilacético; Gli: glicina; Gli-6P: glicose-6-fosfato; GPx: glutaciona peroxidase; GR: glutaciona redutase; GSH: glutaciona reduzida; GSSG: glutaciona oxidada; GST: glutaciona S-transferase; G6PD: glicose-6-fosfato desidrogenase; MAO: monoamina oxidase; NADP⁺: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada; NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida; NOS: óxido nítrico sintase; Pi: fosfato inorgânico; Ribose-5P: ribose-5-fosfato; SOD: superóxido dismutase; γ -glu-cys: γ -L-glutamilsteína. Fonte: Ferreira, 2016.

O cérebro apresenta uma baixa capacidade de reagir contra ERO devido a suas limitadas defesas antioxidantes, ao alto consumo de oxigênio e ao alto teor de ácidos graxos insaturados, em comparação aos demais tecidos (Karelson et al., 2001; Li et al., 2014; Halliwell e Gutteridge, 2015), tornando este órgão mais vulnerável ao aumento de espécies reativas. Nesse sentido, o estresse oxidativo tem sido implicado na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas tais como as doenças de Parkinson e Alzheimer (Smith e Davis, 1993; Ruitenbeek et al.,

1995; Mayatepek et al., 2002; Karelson et al., 2001; Long et al., 2007), esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla (Perez-Severiano et al., 2000; Bogdanov et al., 2001; Behl e Moosmann, 2002; Mancuso et al., 2006). Também participa dos mecanismos fisiopatológicos de alguns erros inatos do metabolismo, incluindo as acidemias orgânicas, as doenças peroxissomais, os defeitos de oxidação mitocondrial de ácidos graxos (destacando-se a MCADD) e as aminoacidopatias (Vargas et al., 2004; Wajner et al., 2004; Barschak et al., 2006; Schuck et al., 2009a; Sgaravatti et al., 2009; Ribas et al., 2010; Tonin et al., 2010; Derks et al., 2014; Schuck et al., 2015).

Alguns estudos sugeriram que o estresse oxidativo pode levar à redução dos níveis de BDNF (Wu et al., 2004; Kapczinski et al., 2008). Zou e Crews (2006) mostraram que o estresse oxidativo e a neurotoxicidade induzida pelo glutamato reduzem a expressão do mRNA do BDNF. Além disso, Pugazhenthii et al. (2006) relataram que os produtos de peroxidação lipídica diminuem a atividade promotora de BDNF dependente da proteína ligante ao elemento de resposta do monofosfato de adenosina (AMP) cíclico (CREB) em neurônios do hipocampo, afetando os processos cognitivos.

1.5 JUSTIFICATIVA

Considerando-se que pacientes acometidos pela MCADD podem apresentar grave dano cerebral e grave deficiência intelectual e que os mecanismos que levam a esses achados não estão bem estabelecidos, torna-se importante o estabelecimento de um modelo experimental adequado para essa doença. Tal modelo permitiria uma investigação mais detalhada da fisiopatologia dessa doença, especialmente de importantes mecanismos neuroquímicos associados ao dano cognitivo, tais como NT, sistema colinérgico e estresse oxidativo. Os resultados obtidos neste trabalho podem ser úteis para o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas para se evitar o dano cerebral apresentado pelos pacientes afetados pela MCADD.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração intracerebroventricular (ICV) de AO sobre parâmetros neuroquímicos e comportamentais em diferentes estruturas cerebrais de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da administração aguda ICV de AO sobre as tarefas comportamentais esquiiva inibitória simples, esquiiva inibitória de treinos contínuos, habituação ao campo aberto, reconhecimento de objetos em ratos com 60 dias de vida;
- Avaliar os efeitos da administração aguda ICV de AO sobre a atividade das enzimas AChE e ChAT em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos com 60 dias de vida;
- Avaliar os efeitos da administração aguda ICV de AO sobre os níveis de BDNF e NGF em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos com 60 dias de vida;
- Avaliar o efeito da administração aguda ICV de AO sobre os níveis de mRNA dos genes *ngf* e *bdnf* em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos com 60 dias de vida;
- Avaliar os efeitos da administração aguda ICV de AO sobre os parâmetros de estado *redox* celular níveis (TBA-RS), conteúdo de carbonilas, oxidação de (DCFH), níveis de nitratos e nitritos e atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase, glutatona redutase e glutatona peroxidase em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos com 60 dias de vida.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Para a realização deste estudo, foram utilizados 240 ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar com 60 dias de vida fornecidos pelo Biotério da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram mantidos em ciclos de claro-escuro de 12 horas a uma temperatura de 24 ± 1 °C com exaustão. Os animais tiveram livre acesso à água e ao alimento. A utilização dos animais seguiu um protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob o protocolo número 090/2013-2 (ANEXO A), seguindo a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (CONCEA, 2013) e as Diretrizes para a Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013).

3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Para a administração ICV do AO, foi realizada uma neurocirurgia por estereotaxia para implantação de uma cânula no ventrículo lateral direito por trepanação. Durante o processo cirúrgico, os animais tiveram uma fonte de aquecimento para que a temperatura se mantivesse adequada para estes (aproximadamente 21 °C). Inicialmente, os animais foram anestesiados pela administração intramuscular de uma associação de cloridrato de cetamina (75 mg/kg de peso corporal) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg de peso corporal). Até a completa anestesia, permaneceram em suas respectivas gaiolas (todos os animais foram anestesiados em sequência). Após a anestesia, os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico (Insight[®], Brasil) sobre um pano limpo, para evitar o contato direto com o material metálico frio do equipamento, e presos nas barras auriculares de forma a permitir a leitura adequada das coordenadas. A seguir, realizou-se uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo, expondo a calota craniana. Foram utilizadas gotas de peróxido de hidrogênio comercial a fim de se retirar a camada restante do tecido subcutâneo e permitir a melhor visualização das suturas; o excesso foi retirado com auxílio de uma tesoura cirúrgica. A torre do aparelho estereotáxico foi colocada em posição vertical (ângulo zero), com o intuito de se verificar as

coordenadas para a correta implantação da cânula no ventrículo direito. A localização obtida pela leitura das coordenadas, levando-se em consideração as coordenadas anteroposterior 0,9 mm e mesolateral 1,5 mm (Paxinos e Watson, 1980), indicou o exato local de implantação da cânula. Para tanto, foi realizado um pequeno orifício no local determinado utilizando-se uma caneta de alta rotação de um aparelho de brocar (Marathon®) e uma cânula de 9 mm foi introduzida com o auxílio do aparelho estereotáxico seguindo a coordenada dorsoventral - 2,6 mm (Paxinos e Watson, 1980). Esta cânula foi fixada na calota craniana com acrílico odontológico, formando um “capacete”. Os animais foram, então, devolvidos às suas gaiolas e mantidos no biotério desta instituição por 72 h para recuperação da intervenção cirúrgica (Paxinos e Watson, 1980). Não foram utilizados antimicrobianos ou analgésicos para se evitar um possível efeito sinérgico entre esses fármacos e o AO.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Após as 72 h de recuperação, os animais foram divididos randomicamente em 2 grupos experimentais: grupo controle e grupo AO. Os animais do grupo controle receberam uma administração ICV de líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF: NaCl 140 mM, KCl₃ mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, Na₂HPO₄ 1,2 mM e NaH₂PO₄ 0,27 mM, pH 7,4) (2 µL), enquanto os animais do grupo AO receberam uma administração ICV de AO (1,66 µmol em 2 µL). O AO foi dissolvido em líquido aCFSF para uma solução de 333 mM, cujo pH foi ajustado para 7,4.

Uma hora após as administrações ICV, os animais foram submetidos as tarefas comportamentais e, imediatamente após as tarefas comportamentais, os animais foram eutanasiados por decapitação com guilhotina e sem anestesia. A caixa craniana foi aberta e, por dissecação, as estruturas cerebrais córtex, estriado e hipocampo foram limpas e isoladas. As estruturas foram imediatamente congeladas em freezer -80 °C até o momento da realização das análises neuroquímicas.

3.4 TAREFAS COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Habituação ao Campo Aberto (Memória de Habituação)

Foi realizado em uma caixa de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto consiste em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram

cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repete o procedimento do treino. Os números de cruzamentos através das linhas pretas e o número de levantamentos sobre as patas traseiras foram avaliados em ambas as sessões. Os cruzamentos representam a atividade motora e os levantamentos sobre as patas traseiras representam atividade exploratória (Vianna et al., 2000). A diminuição do número de cruzamentos e levantamentos entre o treino e o teste, foi tomada como uma medida de retenção de memória de habituação.

3.4.2 Esquiva Inibitória

A esquiva inibitória consiste em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal (1 mm de diâmetro), com espaços entre as barras de 1 cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento é colocada junto à parede esquerda do aparelho (Quevedo et al., 1997; 1999; Roesler et al., 2004). Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e se mediu o tempo que o animal levou para descer com as quatro patas da plataforma. Esse tempo é denominado latência. Imediatamente após descer da plataforma com as 4 patas, o animal recebe um choque de 0,4 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e medida a latência, porém não foi administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Os intervalos entre o treino e o teste foram 1,5 horas para medir memória de curta duração (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003) e 24 horas para memória de longa duração (Quevedo et al., 1997; 1999; Izquierdo et al., 1998; Roesler et al., 2004).

3.4.3 Esquiva Inibitória de Treinos Contínuos

Nesse teste usou-se também o aparato de esquiva inibitória, cujas características foram descritas anteriormente. Na sessão de treinamento, o animal é colocado na plataforma e imediatamente após pisar nas barras de metal, recebe um choque 0,3 mA, durante 2 segundos. Este procedimento continua até que o animal permaneça na plataforma por 50 segundos. O animal foi devolvido então à sua caixa moradia (Barichello et al., 2005). No mesmo dia, 1 hora e 30 minutos após o treino, o animal foi recolocado na plataforma e contou-se o tempo de permanência do animal sobre a plataforma (tempo limite sobre a plataforma foi de 180 segundos). Em situações em que o animal

desceu antes dos 180 segundos, não foi administrado choque. O mesmo procedimento foi repetido 24 horas após.

3.4.4 Reconhecimento de objetos

Para a realização deste teste, utilizou-se o mesmo equipamento utilizado para a tarefa de habituação ao campo aberto. No primeiro dia, realizou-se a sessão treino (habituação animal), em que o animal foi colocado cuidadosamente no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho e este explorou o ambiente por 5 minutos. No dia seguinte, o animal foi recolocado no aparelho, no qual estavam dois objetos iguais (objeto A e B, de diferentes formas, cores e tamanhos). Contou-se o tempo em que o animal explorou cada objeto (A e B). No mesmo dia, 1 hora e 30 minutos após (memória de curta duração), o animal explorou novamente o ambiente na presença do primeiro objeto familiar (objeto A) e um novo objeto (objeto C). Da mesma forma, contou-se novamente o tempo total em que o animal levou para explorar cada objeto (Lima et al., 2005). Vinte e quatro horas após (memória de longa duração), o mesmo procedimento foi realizado, apenas trocando-se o objeto C pelo objeto D (diferente do objeto A), e contou-se o tempo de exploração de cada objeto.

3.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE BDNF E NGF

Para determinação dos níveis dos fatores neurotróficos BDNF e NGF, em córtex cerebral, hipocampo e estriado foram homogeneizadas em solução tampão fosfato com um coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O homogeneizado resultante foi centrifugado a 2300 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para as determinações. Os níveis destas NT nos tecidos cerebrais foram então determinados utilizando-se kits comerciais de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) específicos para BDNF e NGF (Millipore, EUA e Canadá). Os níveis dessas NT foram determinados medindo-se a absorvância a 450 nm e os resultados foram expressos como pmol . mg de proteína⁻¹.

3.6 EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT- QPCR)

O RNA total de córtex cerebral, hipocampo e estriado foram isolados com o reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia,

USA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria e o ácido desoxirribonucleico (DNA) complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando-se o kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega, Califórnia, USA) a partir de 1 µg de RNA total, seguindo as instruções do fabricante. A análise da reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (RT-QPCR) foi realizada usando *SYBR® Green I* (Invitrogen Carlsbad, Califórnia, USA). As reações foram feitas em um volume final de 25 µL usando 12,5 µL de cDNA diluído (1:50 para *Gapd*, *Rlp13a* e *BDNF*), contendo uma concentração final de 5 M de betaína (Sigma-Aldrich Louis, MO, EUA), 0,2 x *SYBR® Green I* (Invitrogen Carlsbad, Califórnia, USA), 100 µM de dNTP, 1 x Tampão PCR, 3 mM de MgCl₂, 0,25 U de *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen Carlsbad, Califórnia, USA) e 200 nM de cada *primer forward* e *reverse* (Tabela 1). As condições da ciclagem da PCR incluíram uma etapa inicial de ativação da polimerase por 5 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para desnaturação, 35 segundos a 60 °C para anelamento e 15 segundos a 72 °C para elongação. Ao final dos ciclos, uma curva de dissociação foi incluída e a medida da fluorescência resultante foi feita de 60 a 99 °C. Os níveis da expressão relativa foram determinados com *7500 Fast Real-Time System Sequence Detection Software v.2.0.5* (Applied Biosystems Califórnia, USA). A eficiência por amostra foi calculada usando o programa *LinRegPCR 11.0* (<http://LinRegPCR.nl>) e a estabilidade dos genes de referência, *Gapd* e *Rlp13a* (*M-value*) e o número ótimo de genes de referência de acordo com a variação de pares (*V*) foi analisada pelo *Software GeNorm 3.5* (<http://medgen.ugent.be/genorm/>). Os níveis da expressão relativa de RNA foram determinados usando o método 2-ΔΔCT.

Tabela1: Sequências dos iniciadores para as experiências de RT-qPCR incluídos no estudo

Gene	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>
<i>Gapd</i> <i>a</i>	5'- GCTAAGCAGTTGGTGGTG CA-3'	5'- TCACCACCATGGAGAAG GC-3'
<i>Hprt</i> <i>1^a</i>	5'- GCAGACTTTGCTTTCCTTG G-3'	5'- GCAGACTTTGCTTTCCTT GG-3'

<i>Rlp1</i> <i>3α^a</i>	5'- ACAAGAAAAAGCGGATG GTG-3'	5'- TTCCGGTAATGGATCTTT GC-3'
<i>BDN</i> <i>F^b</i>	5'- CAGTCCTGGAGAAAGTCC CGGTATC-3'	5'- GCTATCCATAGTAAGGG CCCGAAC-3'
<i>NGF^c</i>	5'- CAAGGACGCAGCTTTCTA TCCTG-3'	5'- CTTCAGGGACAGAGTCT CCCTCT-3'

Fonte: ^aBonefeld et al. (2008); ^bFerreira et al. (2014); ^cChoi e Friedman (2014).

3.7 ATIVIDADE DA ACHE

A atividade desta enzima foi realizada em córtex cerebral, hipocampo e estriado de acordo com o método descrito por Ellman e colaboradores (1961). A mistura de reação (volume final 2 mL) continha tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 1 mM, posteriormente a enzima (40-50 µg de proteína) foi pré-incubada durante 3 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 0,8 mM de iodeto de acetilcolina (AcSCh). Todas as amostras foram testadas em duplicata ou triplicata, e a atividade enzimática foi expressa em micromoles AcSCh por hora por miligrama de proteína. A proteína total foi avaliada pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina de sorobovino como padrão.

3.8 ATIVIDADE DA CHAT

A atividade da enzima ChAT em córtex cerebral, hipocampo e estriado foi determinada conforme Chao e Wolfgram (1973). O meio de reação continha (PBS (cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio bifásico, fosfato de potássio monobásico, água milli-Q qsp, pH 7,2) 6,2 mM de acetil-CoA, 1 M de cloreto de colina, 0,76 mM de sulfato de neostigmina 0,76 mM, 3 M de cloreto de sódio e 1,1 mM de ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA). A essa mistura foi adicionado 1 mM de 4,4'-ditiopiridina e a absorvância foi acompanhada a 324 nm por 20 minutos em um leitor de microplaca SpectraMax® (Molecular Devices® Califórnia,USA). Atividade foi medida pela formação do conjugado de CoA com o 1 mM de 4,4'-ditiopiridina (4-PDS) 4'4 ditiopiridona. Os resultados foram

calculados utilizando-se o coeficiente de extinção molar (4-TP) 4-tiopiridona $1,98 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

3.9 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.9.1 Níveis de Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

Para determinação dos níveis de TBA-RS, em córtex cerebral, hipocampo e estriado foram homogeneizados em tampão PBS gelado (pH 7,4). Logo após o homogeneizado foi precipitado por meio de uma reação ácida com ácido tricloroacético (TCA, Vetec®) a 10 % com sulfato de sódio adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich® St. Louis, MO, EUA) 0,67 % na proporção de 1:1(v/v). A mistura foi levada a um banho fervente durante 25 min e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3- tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBA-RS. mg de proteína⁻¹ (Esterbauer e Cheeseman, 1990).

3.9.2 Conteúdo de Grupos Carbonilas

A medida de formação de carbonilas em córtex cerebral, hipocampo e estriado foi realizada espectrofotometricamente de acordo com o método descrito por Reznick e Packer (1994). Uma alíquota de amostra previamente homogeneizada foi tratada com uma solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNFH) 10 mM preparada em ácido clorídrico 2,5 N ou com ácido clorídrico 2,5 N (brancos) e deixada por 1 hora no escuro à temperatura ambiente. As amostras foram então precipitadas com TCA 20 % e centrifugadas durante 5 min a 9000 x g. Após a centrifugação, o sedimento obtido foi lavado 2 vezes com uma mistura de etanol:acetato de etila (1:1, v/v) e ressuspenso em guanidina 6 M. A diferença entre as absorvâncias a 365 nm das amostras tratadas com DNFH e os brancos foi utilizada para calcular o conteúdo de carbonilas da amostra a 365 nm. Os resultados foram calculados como nmol carbonilas/ mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção de $22.000 \times 10^6 \text{ nmol/mL}$ para hidrazonas alifáticas.

3.10.3 Níveis de nitratos e nitritos

As concentrações de nitratos e nitritos em córtex cerebral, hipocampo e estriado foram determinados de acordo com Miranda et al. (2001), utilizando o reagente de Griess, pela adição de 100 µL do reagente de Griess (0,1% dihidrocloridronaftiletildiamida em água e 1% de sulfanilamida concentrada em 5% de ácido fosfórico (H₃PO₄), volume de 1:1, para 100 µL de amostra). A absorbância foi mensurada a 550 nm por meio de ELISA. Uma curva de calibração foi feita utilizando nitrato de sódio, e cada ponto da foram calculadas nmol por miligrama de proteína.

3.9.4 Oxidação de DCFH

A produção de espécies reativas em córtex cerebral, hipocampo e estriado foi determinada de acordo com o método de LeBel et al. (1992), utilizando-se o diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCF-DA). Às alíquotas de amostras previamente homogeneizadas, adicionou-se a forma diacetato do DCF, a qual é permeável à membrana celular, e essas alíquotas foram incubadas durante 30 min a 37 °C. No meio intracelular, esterases clivam o grupamento acetato do DCF-DA, gerando a forma reduzida DCFH. As espécies reativas presentes no meio oxidam o DCFH, produzindo o produto fluorescente 2',7'-diclofluoresceína (DCF). A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de 480 (excitação) e 535 nm (emissão). A curva de calibração foi realizada utilizando-se DCF padrão (0-10 µM) e os resultados estão expressos como pmol de DCF formado/mg de proteína.

3.9.5 Atividade da CAT

Esta atividade enzimática em córtex cerebral, hipocampo e estriado foi determinada através do método de Aebi (1984). À amostra previamente homogeneizada, foi adicionado Triton 0,1 % seguido de agitação. Esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. Ao tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, foi adicionado H₂O₂ 30% (v/v). Este meio foi colocado em cubeta de quartzo e o aparelho estabilizado contra um branco corrido separadamente de tampão fosfato. Após adição da amostra, foi realizada a leitura da queda da absorbância do H₂O₂ em um leitor de microplaca SpectraMax® (Molecular Devices® Califórnia,USA) a 240 nm, à temperatura ambiente, durante 100 segundos. Para o cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção do

H_2O_2 de $43,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os resultados da atividade enzimática estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

3.9.6 Atividade da SOD

A atividade da SOD em córtex cerebral, hipocampo e estriado foi determinada de acordo com Bannister e Calabrese (1987). Primeiramente, foram realizadas leituras da auto oxidação da adrenalina. Após, foram adicionados à amostra CAT 10 mM, tampão glicina 50 mM e adrenalina 60 mM, e ao branco foi adicionada adrenalina 60 mM. A atividade enzimática foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente em 480 nm à temperatura ambiente. A atividade da enzima foi expressa em U/mg de proteína (unidade de atividade da SOD por mg de proteína).

3.9.7 Atividade da GPx

A atividade da GPx em córtex cerebral, hipocampo e estriado foi determinada pelo método de Wendel (1981) usando hidroperóxido de tert-butila como substrato. Em uma cubeta de quartzo foram adicionados tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, azida sódica 40 mM, glutatona reduzida 100 mM, GR 10 U/mL, NADPH 10 mM e amostra (0,1 – 0,3 μg de proteína). Esta mistura foi incubada a 25 °C durante 1 minuto, a fim de estabilizar o meio. Após a incubação, foi adicionado hidroperóxido de tert-butila 10 mM para iniciar a reação. Os brancos foram preparados substituindo-se a amostra pelo tampão fosfato supracitado. A queda da absorvância a 340 nm foi acompanhada durante 240 segundos em um leitor de placas SpectraMax® (Molecular Devices® Califórnia, USA) e a atividade da GPx foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção do dinucleotídeo de fosfato de nicotinamida e adenina (NADPH) a 340 nm de $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade da GPx está expressa como U/mg de proteína.

3.9.8 Atividade da GR

A atividade da enzima GR em córtex cerebral, hipocampo e estriado foi avaliada segundo o método descrito por Calberg e Mannervik (1985). Essa atividade enzimática foi medida através da observação do decréscimo da absorvância do NADPH a 340 nm em um leitor de placas SpectraMax® (Molecular Devices® Califórnia, USA). O meio de reação constituiu-se de tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,5, EDTA 6,3 mM, glutatona oxidada 1 mM e NADPH 0,1 mM, além

de aproximadamente 3 μg de proteína. Os resultados estão expressos em U/mg de proteína.

3.9.9 Dosagem de Proteínas

A quantificação de proteínas totais nas amostras foi realizada através do método de Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Para a comparação entre as médias dos dois grupos experimentais, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) com variâncias iguais entre as amostras (teste de igualdade de variâncias, $p > 0,05$).

Quando as variáveis não seguiram uma distribuição normal e sua variância não preencheu o pressuposto da homocedasticidade, os dados foram expressos como mediana e intervalos interquartil e foram analisados por um teste não paramétrico (Mann–Whitney U), seguido pelo teste de Wilcoxon e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa IBM SPSS Statistics (IBM, Armonk, Estados Unidos). Foram consideradas diferenças significativas quando valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Através de tarefas comportamentais inicialmente, foram avaliados os processos de memória e aprendizagem em um modelo experimental de MCADD induzido quimicamente pela administração ICV de AO. Na tarefa de habituação ao campo aberto, não houve diferença estatisticamente significativa no número de cruzamentos e levantamentos entre os grupos durante o treino ($p > 0,05$), indicando que não houve diferença na atividade motora e exploratória entre os grupos controle e AO. No entanto quando os animais que receberam administração de AO não apresentaram diferença estatística entre no número de cruzamentos e levantamentos entre as sessões treino e teste, sugerindo que esses animais apresentam danos a memória de habituação. Por outro lado, os animais do grupo controle apresentaram um número reduzido de cruzamentos ($p < 0,05$) e levantamentos ($p < 0,05$) 24 horas após a primeira exposição, indicando que os ratos pertencentes a esse grupo experimental habituaram-se ao ambiente (Figura 5).

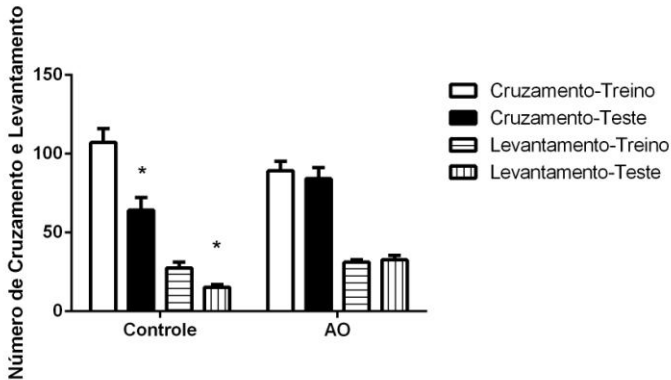


Figura 5: Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a memória de habituação ao campo aberto em ratos com 60 dias de vida. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média de 12 animais por grupo experimental e estão expressos em unidades arbitrárias. * $p < 0,05$ comparado com a sessão treino (teste de Wilcoxon).

O próximo passo foi investigar o efeito da administração aguda ICV de AO sobre a retenção de memória através do teste de esQUIVA inibitória. A figura 6 demonstra que, durante a sessão treino,

não houve diferença significativa entre os grupos. Entretanto, na sessão teste, observou-se uma redução significativa do tempo de latência do grupo AO, quando comparado com o grupo controle.

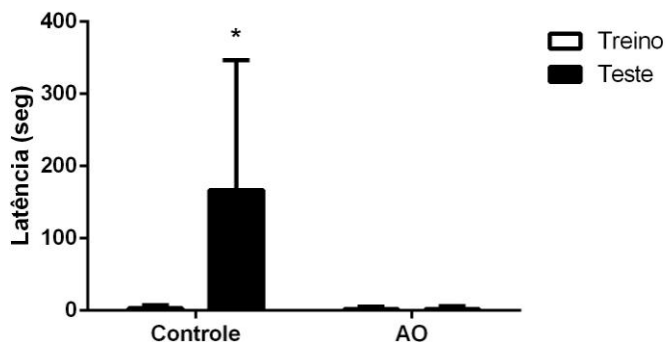


Figura 6: Efeito da administração aguda intracerebroventricular do ácido octanoico (AO) sobre a memória de longo prazo nas sessões de treino e teste (24 h após o treino) na tarefa de esQUIVA inibitória em ratos com 60 dias de vida. Os dados representam mediana \pm intervalo interquartil de 12 animais por grupo experimental e estão expressos em segundos. * $p < 0,05$ em comparação à sessão treino.

Adicionalmente, os animais submetidos à administração ICV de AO apresentaram um aumento significativo no número de treinos ($p=0.005$) requeridos para atingir o critério de aquisição de memória (50 segundos sobre a plataforma), quando comparado ao grupo controle (Figura 7A). Os resultados desta tarefa sugerem que o grupo AO necessita de aproximadamente duas vezes mais estímulos para atingir o critério de aquisição de memória em comparação com o grupo controle, indicando dificuldade de aprendizagem. No teste de retenção de memória, não houve diferença entre os grupos, o que indica que a memória em longo prazo não foi alterada (Figura 7B).

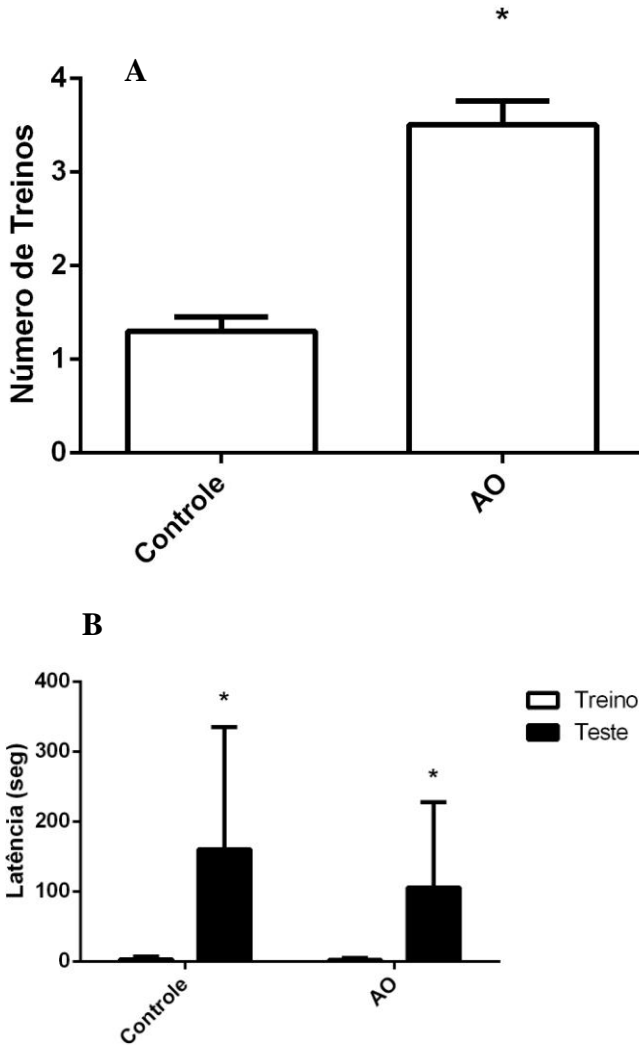


Figura 7: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a aquisição (A) e retenção (B) de memória durante o teste de esquila inibitória de múltiplos treinos. Os dados da figura (A) representam média \pm desvio padrão de 12 animais por grupo experimental e estão expressos em unidades arbitrárias. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (teste *t* de Student). Os dados da figura (B) são apresentados como mediana \pm intervalo

interquartil de 12 animais por grupo experimental e estão expressos em segundos. $*p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (teste de Wilcoxon).

Para se avaliar alterações cognitivas, foi realizada a tarefa comportamental de reconhecimento do novo objeto, que utiliza a preferência natural dos ratos por novos objetos exibidos como parâmetro de cognição. Não foi observada diferença estatisticamente significativa, entre os grupos controle e AO no tempo total de exploração de ambos objetos durante o teste de aquisição. Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos no desempenho durante o teste de retenção de memória. Esses resultados indicam que a administração de com AO não afetou a memória de reconhecimento (Figura 8).

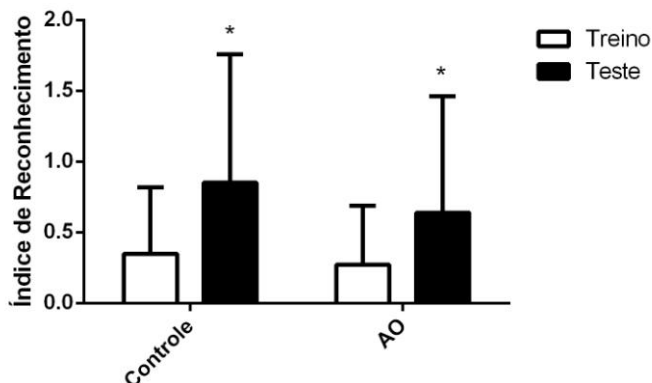


Figura 8: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a memória não aversiva na tarefa de reconhecimento de objetos em ratos com 60 dias de vida. Os dados representam mediana \pm intervalo interquartil de 12 animais por grupo experimental. $*p < 0,05$ quando comparado com teste (teste de Wilcoxon).

Na tentativa de se estabelecer os mecanismos pelos quais a administração ICV de AO induz prejuízos cognitivos, foram avaliados parâmetros neuroquímicos relacionados à memória e à aprendizagem. Primeiramente, foram avaliados os níveis de NGF e de BDNF em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais tanto do grupo controle

quanto do grupo AO. Pode-se observar na figura 9 que a administração desse ácido graxo diminuiu os níveis de NGF em hipocampo e estriado, sem causar alteração desses níveis em córtex cerebral.

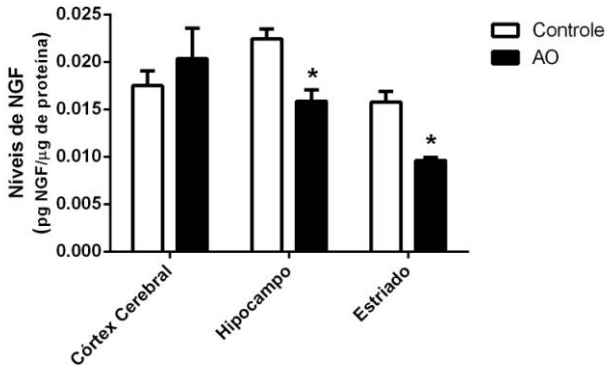


Figura 9: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre os níveis do fator de crescimento neural (NGF) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo e estão expressos em μg de proteína. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

Além disso, foi investigado o efeito da administração aguda ICV de AO sobre os níveis proteicos do BDNF em córtex cerebral, hipocampo e estriado (Figura 10). Observou-se uma diminuição dos níveis no estriado dos animais do grupo AO em comparação ao controle. Nas demais estruturas cerebrais, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

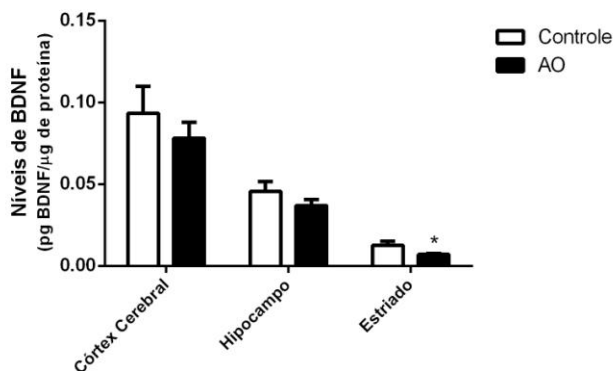


Figura 10: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo e estão expressos em μg de proteína. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

A seguir, foram quantificados os níveis de mRNA dos genes *ngf* e *bdnf* em córtex cerebral, hipocampo e estriado após a administração aguda ICV de AO, na tentativa de identificar a causa da diminuição dos níveis proteicos dessas neurotrofinas (Figura 11). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e AO em nenhuma das estruturas cerebrais investigadas, eliminando-se a hipótese de que a diminuição desses níveis proteicos seria causada pela diminuição da expressão de seus respectivos genes.

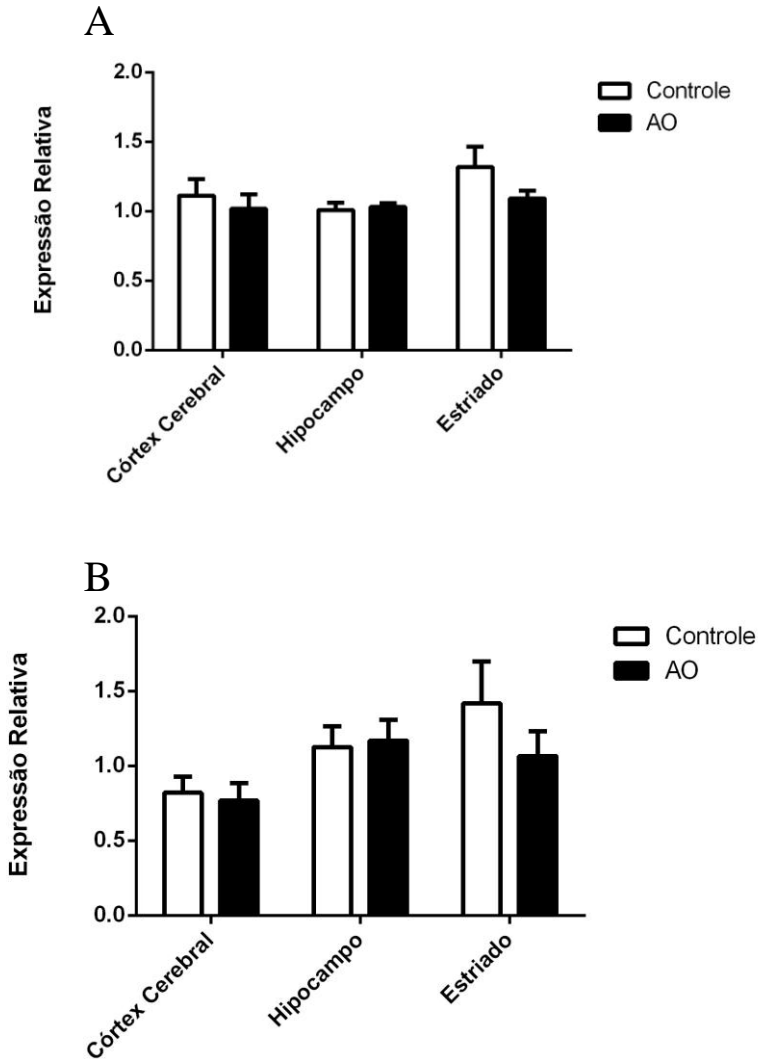


Figura 11: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a expressão dos genes codificadores das proteínas do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) figura (A) e do fator de crescimento neural (NGF) figura (B) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em unidades arbitrárias. Não houve diferença significativa entre os grupos (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Considerando-se que alterações nos níveis e na sinalização de NGF e BDNF podem afetar o sistema colinérgico, avaliou-se o efeito da administração aguda ICV do AO marcadores desse sistema neurotransmissores. Nesse sentido, foi avaliada a atividade da enzima AChE em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com 60 dias de idade (Figura 12). Não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos AO e controle em nenhuma das estruturas cerebrais estudadas.

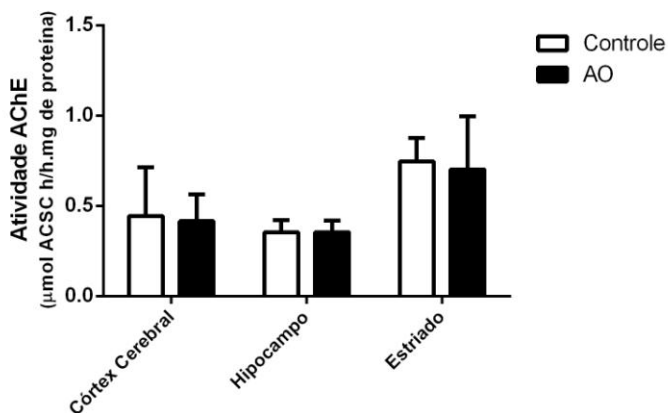


Figura 12: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em $\mu\text{mol ACSC mg de proteína}$. Não houve diferença significativa entre os grupos (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Adicionalmente, foi avaliada a atividade da ChAT, outro importante marcador do sistema colinérgico em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida submetidos à administração ICV de líquido cefalorraquidiano artificial (grupo controle) ou de AO (grupo AO). A figura 13 mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à atividade dessa enzima.

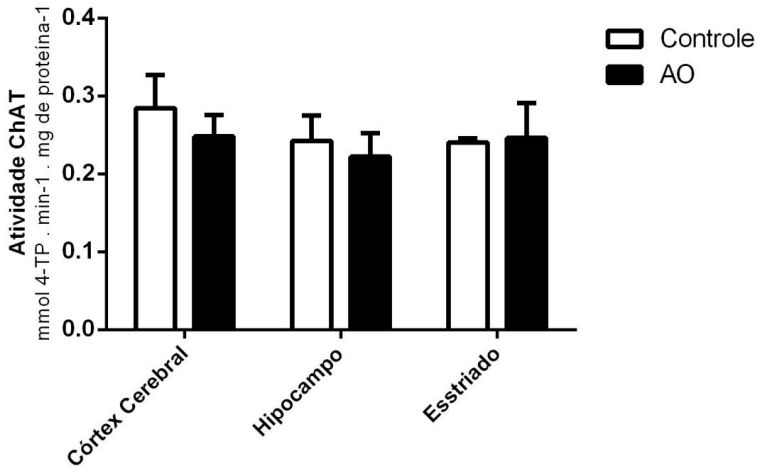


Figura 13: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima colina acetiltransferase (ChAT) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em nmol/mg de proteína. Não houve diferença significativa entre os grupos (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Finalmente, investigou-se o envolvimento do estresse oxidativo sobre o prejuízo à memória e à aprendizagem causada pela administração aguda ICV de AO. Nesse sentido, o conteúdo de carbonilas foi avaliado em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com 60 dias submetidos a esse modelo experimental de MCADD (Figura 14). Foi observado um aumento desse marcador de dano oxidativo a proteínas em córtex cerebral e hipocampo dos animais que foram submetidos à administração de AO quando comparados aos animais do grupo controle.

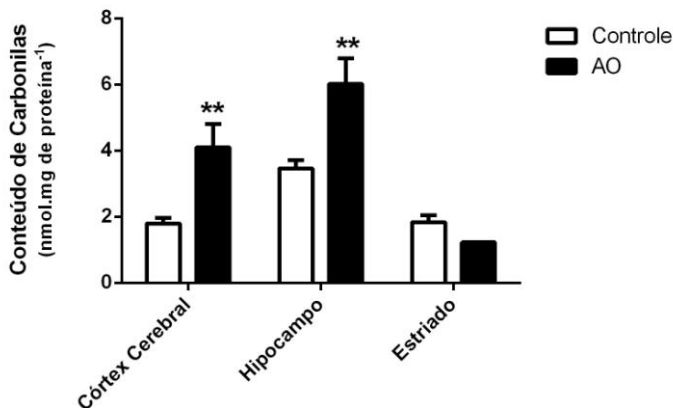


Figura 14: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre o conteúdo de grupos carbonila em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

A seguir, avaliou-se o efeito da administração ICV de AO sobre os níveis de TBA-RS, um marcador de peroxidação lipídica, em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com 60 dias de vida. A figura 15 mostra um aumento dos níveis de TBA-RS em córtex cerebral e estriado de animais submetidos à administração de AO. A mesma figura mostra uma tendência a aumento desses níveis em hipocampo, embora não estatisticamente significativo ($p < 0,50$).

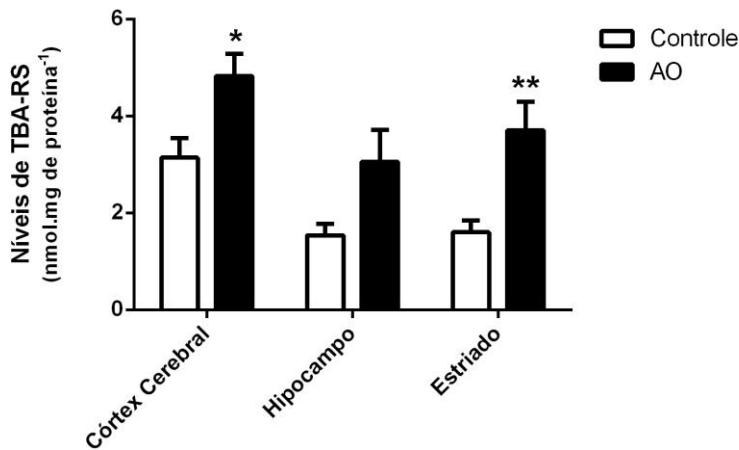


Figura 15: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em nmol . mg de proteína⁻¹. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle (Teste *t* de Student para amostras independentes).

O próximo passo foi investigar o efeito da administração ICV de AO sobre a produção de espécies reativas em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com 60 dias de vida, na tentativa de se identificar a causa do dano oxidativo a macromoléculas observado. Para se avaliar a produção de espécies reativas de nitrogênio, foram quantificados os níveis de nitratos e nitritos (Figura 17). Não foi identificada diferença entre os grupos controle e AO nesse parâmetro.

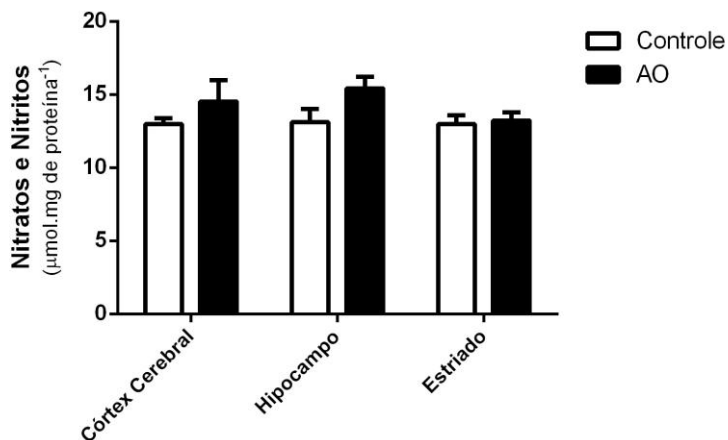


Figura 16: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre os níveis de nitratos e nitritos em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Adicionalmente, foi investigada a oxidação de DCFH, outro parâmetro indicativo de produção de espécies reativas, em córtex cerebral, hipocampo e estriado dos animais de ambos grupos experimentais (Figura 17). Da mesma forma que os níveis de nitratos e nitritos, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo AO em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas.

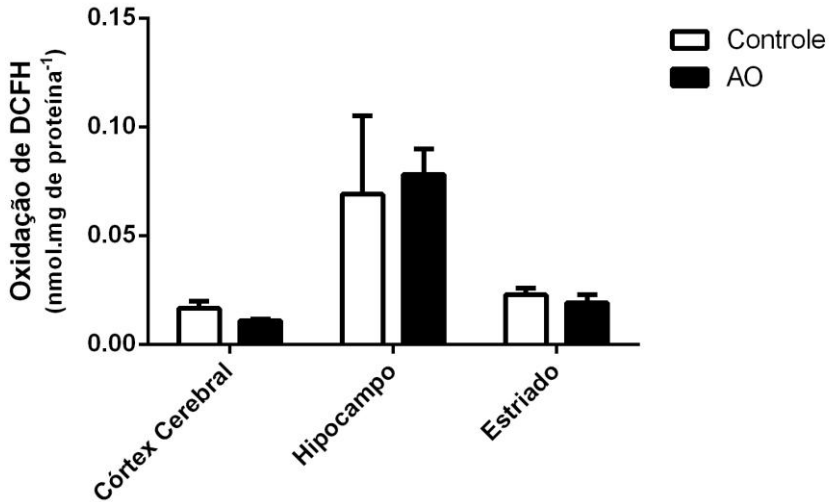


Figura 17. Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína reduzida (DCFH) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Por fim, foram avaliadas as defesas antioxidantes enzimáticas em estruturas cerebrais de animais do grupo controle e do grupo AO. Primeiramente, avaliou-se a atividade da enzima CAT em córtex cerebral, hipocampo e estriado desses animais (Figura 18). Foi observado um aumento estatisticamente significativo da atividade dessa enzima em córtex cerebral e hipocampo dos animais submetidos à administração de AO.

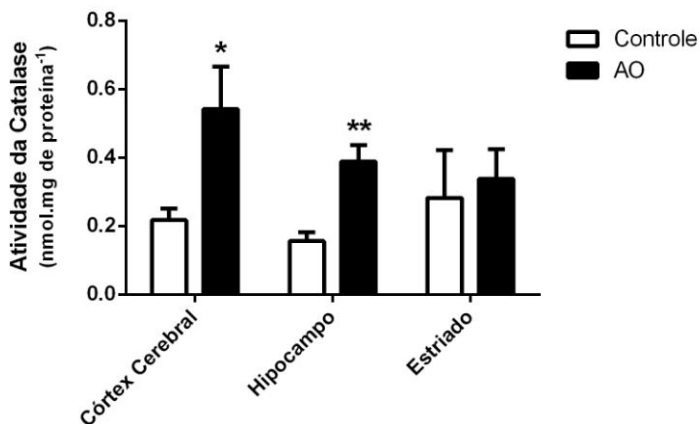


Figura 18: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

A seguir, foi avaliada a atividade enzimática da SOD em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos que receberam administração aguda ICV de AO (Figura 19). Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, embora haja uma tendência de aumento dessa atividade em córtex cerebral ($p = 102$).

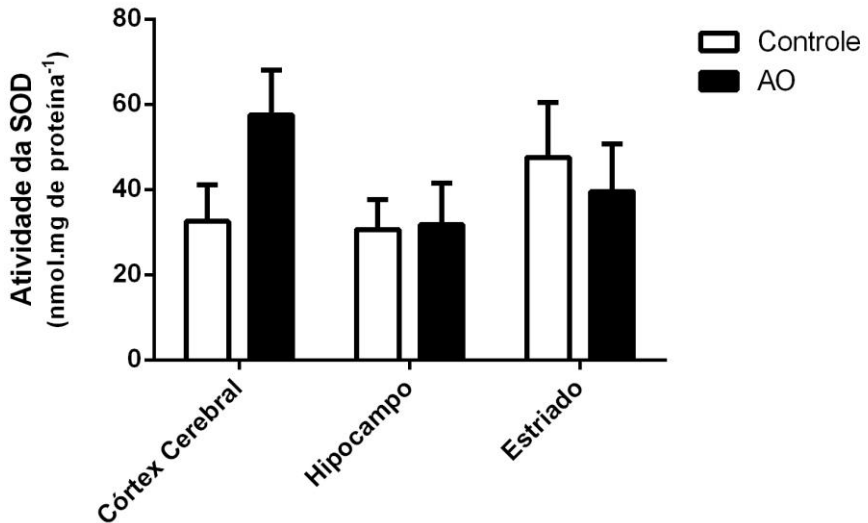


Figura 19: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Também foi avaliada a atividade da enzima GPx em estruturas cerebrais de ratos submetidos a um modelo experimental de MCADD. Não foram observadas alterações nessa atividade enzimática em nenhuma das estruturas avaliadas, em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos de 60 dias (Figura 20).

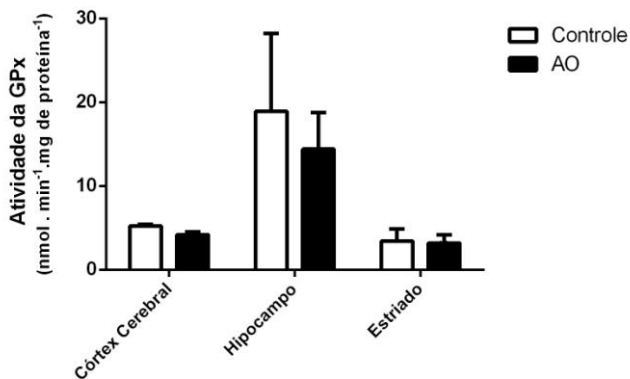


Figura 20: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. Não houve diferença significativa entre os grupos (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Da mesma forma, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo AO quando foi investigada a atividade da enzima GR em córtex cerebral, hipocampo e estriado desses animais (Figura 21).

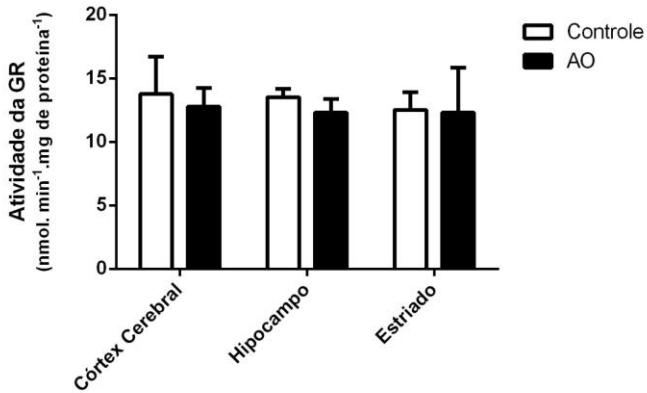


Figura 21: Efeito da administração aguda intracerebroventricular de ácido octanoico (AO) sobre a atividade da enzima glutathione redutase (GR) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de animais com 60 dias de vida. Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo experimental e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. Não houve diferença significativa entre os grupos (Teste *t* de Student para amostras independentes).

6 DISCUSSÃO

Pacientes acometidos pela MCADD apresentam alterações neurológicas, tais como paralisia e edema cerebral, anomalias no lobo frontal (Egidio et al., 1989; Heubi et al., 1987; Maegawa et al., 2008), atraso no desenvolvimento cognitivo e aprendizado (Roe e Ding, 2001; Derks et al., 2006). Apesar das sequelas neurológicas serem comuns em pacientes com MCADD, os mecanismos do dano cerebral nesta doença ainda não estão estabelecidos. Estes danos têm sido atribuídos aos efeitos tóxicos dos ácidos graxos acumulados na doença (Rinaldo et al., 2002), bem como de suas acilcarnitinas (Onkenhout et al., 1995).

Neste sentido, o presente estudo investigou o efeito da administração aguda ICV de AO sobre tarefas comportamentais, bem como sobre níveis de NT, sistema colinérgico e homeostasia *redox* celular em estruturas cerebrais de ratos com 60 dias de vida. Esse modelo experimental foi desenvolvido e utilizado tendo em vista que poucos modelos animais *in vivo* de MCADD foram descritos na literatura e que a administração apenas de AO, o principal ácido graxo acumulado na doença, auxilia na identificação do efeito isolado de cada metabólito envolvido. A idade dos animais (60 dias) foi escolhida por corresponder a um adulto jovem em seres humanos (Semple et al., 2013) período de intenso metabolismo, considerando-se que a MCADD pode se manifestar em qualquer período da vida, desde a infância até a idade adulta (Randall et al., 2015).

Inicialmente, investigou-se o efeito da administração aguda ICV de AO sobre tarefas comportamentais que avaliam processos de memória e aprendizado. Na tarefa de habituação ao campo aberto observou-se que os animais que receberam administração de AO e foram expostos ao teste de memória de habituação, sendo que estes animais não se habituaram ao aparato de habituação ao campo aberto, sugerindo déficit cognitivo. Na tarefa de esquiva inibitória simples, observou-se que o grupo AO teve prejuízo na memória aversiva. Tal achado sugere que a administração desse ácido graxo provoca déficit de memória aversiva. Da mesma forma, a administração de AO ocasionou déficit de aprendizagem, sem alterar a memória de retenção, conforme observado no teste de esquiva inibitória de múltiplos treinos. Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados na tarefa de reconhecimento de objeto. Tomados em conjuntos, esses achados sugerem que os animais do grupo AO

apresentaram déficit na memória de habituação. Na memória aversiva e no aprendizado, mas não na memória de reconhecimento.

A memória é um processo dinâmico, que consiste em três fases: aquisição, consolidação e recuperação (Izquierdo, 2002), este mecanismo celular nos levaria a evocação da memória e aprendizagem (Lu et al., 2008). Todos esses eventos são dependentes do hipocampo, estrutura cerebral que armazena as experiências por um curto período de tempo, antes que a informação seja transferida para o córtex cerebral para um armazenamento definitivo (Wiltgen et al., 2000; Frankland et al., 2005; Jaeger et al., 2013). Nesse cenário, Barry e colaboradores (2016) sugeriram que o hipocampo também é necessário para a recuperação da memória. Adicionalmente, estudos demonstraram que as estruturas do hipocampo e do estriado podem interagir competitivamente durante o processo de aprendizagem (Poldrack e Packard, 2003; Poldrack e Rodriguez, 2004). Tal interação entre estes sistemas de memória foi ainda apoiada por um recente estudo comportamental que mostra interferência entre memórias declarativas e processuais, sugerindo a existência de redes neuronais compartilhadas entre hipocampo e estriado (Brown e Robertson, 2007; Keisler e Shadmehr, 2010; Cohen e Robertson, 2011; Calabresi et al., 2016). Na mesma linha, estudos de neuroimagem mostraram que tarefas declarativas consideradas dependentes do hipocampo, como a navegação espacial, recrutam o estriado (Peigneux et al, 2006; Doeller et al., 2008).

Os processos de memória e aprendizagem são dependentes de diversos mecanismos celulares, incluindo as NT (Rybakowski et al., 2006; Yoshii, 2010). Nesse contexto, estudos têm demonstrado que o NGF é um fator fundamental na aprendizagem e memória (Landreth, 2006). Além disso, estudos demonstraram um importante papel do BDNF na retenção e na aquisição da memória (Bekinschtein et al., 2007; Bekinschtein et al., 2008; Slipczuk et al., 2009), bem como o seu possível efeito terapêutico no tratamento destas doenças, vem sendo investigado (Zuccato e Cattaneo, 2009; Allen et al., 2013). No presente trabalho, foram observadas diminuições dos níveis dessas NT em hipocampo e estriado, importantes áreas relacionadas à memória e à aprendizagem, dos animais que receberam administração ICV de AO. Estes achados sugerem que a diminuição dos níveis de BDNF e NGF e, consequentemente, da sua sinalização possa estar relacionada ao prejuízo de memória observada em animais que receberam AO.

Nesse sentido, recentemente foi sugerido que o BDNF desempenha um papel rápido e essencial na regulação da plasticidade sináptica, proporcionando outro mecanismo através do qual o BDNF modula a aprendizagem e a memória após um evento estressante (Gray et al., 2013). Tal fato o faz ter um importante papel durante o desenvolvimento, na idade adulta e no envelhecimento (Nykjaer et al., 2004). Assim, uma diminuição dos níveis de BDNF e NGF estão relacionados a danos neurológicos e alterações de processos cognitivos (Lessmann et al., 2003; Rybakowski et al., 2006), considerando-se que essas NT exercem efeitos neurotróficos e neuroprotetores (Murer et al., 2001) e são mediadores importantes da plasticidade neuronal (Thoenen, 1995). Nesse contexto, uma diminuição dos níveis de BDNF no cérebro é encontrada em doenças neurodegenerativas (Mariga et al., 2015) e em alguns erros inatos do metabolismo, tais como tirosinemia (Ferreira et al., 20013), doença do xarope do bordo (Scaini et al., 2014) e fenilcetonúria (Zhang et al., 2007). Nesse sentido Zhang e colaboradores (2007) observaram que neurônios corticais foram levados a apoptose com altas concentrações de fenilalanina. Esse efeito foi revertido pelo pré-tratamento destes neurônios com BDNF (Zhang et al., 2010), demonstrando um potencial efeito neuroprotetor desta neurotrofina, em modelos animais de erros inatos do metabolismo.

Um estudo realizado por Matté e colaboradores (2009) também apresentou evidências de que a administração aguda de homocisteína em ratos provocou uma deficiência na consolidação da memória de curto e longo prazo na tarefa esquiiva inibitória, possivelmente devido aos níveis reduzidos de BDNF no hipocampo desses animais, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo. Estes resultados corroboram os achados deste trabalho, indicando que a diminuição dos níveis de BDNF pode contribuir para o dano neurológico encontrado em pacientes com MCADD.

Alteração na expressão ou função do BDNF, considerando uma das principais neurotrofinas do cérebro, pode levar não somente a disfunção no desenvolvimento neural, mas também nos déficits da migração, conexões, e uma alteração na plasticidade cerebral e anormalidade estrutural (Murakami et al., 2005). Tarefas de aprendizado estão associadas com um aumento dos níveis de mRNA de BDNF em ratos (Yamada e Nabeshima, 2003) e há indícios que o BDNF tem um papel importante na LTP (Minichiello, 2009). Na tentativa de se identificar a causa da diminuição dos níveis das NT, foram investigados os níveis de mRNA

dos genes *bdnf* e *ngf*, os quais codificam as proteínas BDNF e NGF, respectivamente. Entretanto, não foi observada nenhuma alteração na expressão de tais genes, sugerindo que a redução dos níveis dessas proteínas não se dá pela menor expressão gênica dessas proteínas. Achados semelhantes foram observados nos estudos de Scaini et al. (2012) e Ferreira et al. (2013), em que uma diminuição dos níveis de BDNF e NGF, respectivamente, não foi acompanhada por alterações na transcrição dos seus respectivos genes. Alternativas para se explicar a diminuição desses níveis proteicos ocasionada pela administração de AO incluem alterações pós-traducionais, tais como um prejuízo nos processos de transformação das pró-neurotrofinas a NT maduras (Chao et al., 2006; Krishna et al., 2006).

Considerando-se que o sistema colinérgico também está envolvido na formação, manutenção e evocação de processos de memória e aprendizagem (Ballard et al., 2005; Saeed et al., 2005; Zimmerman e Soreq, 2006) e que alterações dos níveis de BDNF e NGF podem afetar esse sistema neurotransmissor (Takei et al., 1989; Penha Berzaghi et al., 1993), o próximo passo deste estudo foi avaliar dois importantes marcadores de atividade colinérgica. Primeiramente, foi investigada a atividade da AChE, enzima responsável pela hidrólise da ACh a AChE, inativa e regula a concentração de ACh na fenda sináptica (Soreq e Seidman, 2001). Em seguida, foi avaliada a atividade da enzima ChAT, responsável pela síntese de ACh no neurônio pré-sináptico (Eckenstein e Sofroniew, 1983; Dobransky e Rylett, 2005; Kumar et al., 2016). Nenhuma dessas atividades enzimáticas foi alterada pela administração ICV de AO, sugerindo que este ácido graxo, apesar de alterar a homeostase das NT, não afeta a atividade do sistema colinérgico.

Adicionalmente à sinalização das NT e à atividade do sistema colinérgico, alterações do estado *redox* celular podem influenciar os processos de memória e aprendizagem (He et al., 2016). Além disso, esses três mecanismos estão interrelacionados. Ballard e colaboradores (2005) demonstraram que o estresse oxidativo induz alterações colinérgicas em doenças neurodegenerativas. Também foi demonstrado que o desequilíbrio do estado *redox* intracelular ocorre em situações em que os níveis de BDNF estão diminuídos em pacientes com depressão e demência (Wang et al., 2012). Na literatura, há evidências de que alterações em vias de sinalização do BDNF e do NGF associadas ao estresse oxidativo podem ser fatores chaves ligados à morte celular observada em tecido cerebral de pacientes com doença de Parkinson, doença de Alzheimer e doenças psiquiátricas como a esquizofrenia

(Sampaio et al., 2016; Xie et al., 2016; Jordan et al., 2016). Somado a esses fatores, foi demonstrando que o estresse oxidativo participa da fisiopatologia da MCADD tanto em pacientes (Derks et al., 2014; Najdekr et al., 2015) e em modelos animais (Schuck et al., 2007; Schuck et al., 2009; Tonin et al., 2010; Tonin et al., 2012). Entretanto, tais estudos foram realizados *in vitro* e os efeitos cerebrais *in vivo* dos metabólitos acumulados nessa deficiência ainda são desconhecidos.

O presente estudo investigou a participação de alterações do estado *redox* celular no dano cognitivo apresentada pelos animais submetidos à administração ICV de AO. Primeiramente, foram avaliados danos oxidativos a lipídeos e proteínas através da determinação dos níveis de TBA-RS e carbonilação de proteínas, respectivamente. No modelo experimental utilizado no presente estudo, observou-se que os níveis de TBA-RS encontrados significativamente aumentados em córtex cerebral e estriado em comparação ao grupo controle. Também observou-se um aumento desses níveis em hipocampo, embora não estatisticamente significativo. A peroxidação lipídica é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares e de organelas durante sua renovação, além de ser importante na síntese de prostaglandinas e leucotrienos. No entanto, quando este processo é exacerbado, seja por uma aumentada geração de espécies reativas ou por insuficiência das defesas antioxidantes, podem ocorrer alterações na permeabilidade e fluidez das membranas, causando perda da seletividade, alterações na troca iônica, liberação do conteúdo das organelas e formação de aldeídos citotóxicos (Ferreira e Matsubara, 1997).

Esses produtos da peroxidação lipídica incluem malondialdeído, 4-hidroxinonal e acroleína e podem ocasionar alterações mitocondriais, induzir genotoxicidade, desencadear morte celular e interferir na sinalização do fator de transcrição CREB (Esterbauer, 1993; Luo et al., 2005; Pugazhenthii et al., 2006; Long et al., 2009). É importante salientar que a sinalização adequada da proteína CREB está intimamente relacionada aos processos de memória e aprendizagem (Yamamoto et al., 2009). Além disso, o malondialdeído e o 4-hidroxinonal, em altas concentrações, podem provocar oxidação de proteínas (Requena et al., 1996).

Adicionalmente, proteínas podem ser modificadas em suas ligações peptídicas ou na cadeia lateral dos aminoácidos por ação direta de espécies reativas. A oxidação proteica pode resultar na perda da função catalítica ou estrutural de proteínas, podendo ser evidenciada pela formação dos grupamentos carbonilas nas cadeias laterais de alguns

aminocidos e diminuição dos grupos tióis (Halliwell, 2001). O presente estudo demonstrou que houve um aumento do conteúdo de grupos carbonila em córtex cerebral e hipocampo, indicando que a administração ICV de AO induz um aumento da oxidação de proteínas. Esses dados são corroborados por um estudo de Derks e colaboradores (2014), que observou um aumento da oxidação de proteínas em plasma de pacientes acometidos pela MCADD.

Na tentativa de justificar o aumento do dano oxidativo a proteínas e lipídeos encontrado neste estudo, foi avaliada a geração de ERO e espécies reativas de nitrogênio utilizando-se, avaliadas pela determinação dos níveis de nitratos e nitritos e pela oxidação do DCFH. Contraditoriamente, não houve aumento dos níveis de ER nas estruturas cerebrais dos animais que receberam AO, sugerindo que o dano oxidativo a macro moléculas observado no modelo animal em questão ocorre por um mecanismo diferente.

Neste cenário, foram avaliadas as atividades de importantes enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx e GR. Observou-se que houve um aumento da atividade da CAT no córtex cerebral e no hipocampo dos animais que receberam administração de AO. Entretanto, o aumento dessa atividade enzimática não foi acompanhado por um aumento da atividade da SOD. Primeiramente, um aumento da atividade da CAT pode ser um mecanismo de defesa celular, visto que essa enzima transforma o peróxido de hidrogênio em água e, assim, diminui a disponibilidade dessa espécie reativa para a reação de Fenton, evitando a formação de radicais hidroxila, a mais potente ERO (Halliwell e Gutteridge, 2015). Entretanto, tem sido demonstrado que o desequilíbrio entre as atividades da SOD e da CAT aumenta o dano celular desencadeado pelas ERO, participando dos mecanismos de neurodegeneração (McCord, 1998).

Existem evidências consideráveis de que o dano oxidativo ocorre *in vivo* em várias doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica. Consequentemente, um número considerável de parâmetros de estresse oxidativo foram identificados nos cérebros desses pacientes, Níveis de MDA e HNE, os produtos de oxidação de proteínas carbonila e 3-nitrotirosina, produto final da oxidação, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, bem como concentrações reduzidas dos antioxidantes não-enzimáticos GSH, ácido ascórbico e diminuição das atividades das enzimas antioxidantes CAT e GPx (Jenner e Olanow 1996; Liu et al 1999; Perry et al., 2003)

Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que, durante as crises de descompensação metabólica características da MCADD, quando as concentrações de AO aumentam dramaticamente (característica abordada no modelo experimental utilizado no presente estudo), há um prejuízo à memória e à aprendizagem. Tal prejuízo pode ser ocasionado por diminuição dos níveis de NT e alteração da homeostase *redox* celular, especialmente no hipocampo, estrutura mais afetada pela administração de AO.

7 CONCLUSÃO

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

- A administração aguda ICV de AO causa deficiência de memória e aprendizado;
- A administração aguda ICV de AO diminuiu os níveis proteicos de NFG em estriado e hipocampo de ratos;
- A administração aguda ICV de AO diminuiu os níveis proteicos de BDNF no hipocampo de ratos;
- A administração aguda ICV de AO aumentou a peroxidação lipídica em córtex cerebral e estriado de ratos;
- A administração aguda ICV de AO aumentou a carbonilação de proteínas em córtex cerebral e hipocampo de ratos;
- A administração aguda ICV de AO aumentou a atividade da CAT em córtex cerebral e hipocampo de ratos.

REFERÊNCIAS

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-126.
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001; 302:141-145.
- Alderson RF, Alterman AL, Barde YA, Lindsay RM. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron.* 1990; 297-306.
- Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther.* 2013;138 (2):155-75.
- Amaral AU, Cecatto C, da Silva JC, Wajner A, Godoy Kdos S, Ribeiro RT, Wajner M. cis-4-Decenoic and decanoic acids impair mitochondrial energy, redox and Ca(2+) homeostasis and induce mitochondrial permeability transition pore opening in rat brain and liver: Possible implications for the pathogenesis of MCAD deficiency. *Biochim Biophys Acta.* 2016 ;1857 (9):1363-72.
- Antyborzec I, Valerie B, O'Leary, James O, Dolly S, V. Ovsepien. Low-Affinity Neurotrophin Receptor p75 Promotes the Transduction of Targeted Lentiviral Vectors to Cholinergic Neurons of Rat Basal Forebrain. *Neurotherapeutics.* 2016.
- Bachman ES, Berger-Sweeney J, Coyle JT, Hohmann CF. Developmental regulation of adult cortical morphology and behavior: an animal model for mental retardation. *Int J Dev Neurosci.* 1994; 12 (4):239-53.
- Balkowiec, A, Kunze, DL, Katz, DM. Brain-derived neurotrophic factor acutely inhibits AMPA-mediated currents in developing sensory relay neurons. *J. Neurosci.* 2000: 1904-1911.
- Ballard CG, Greig NH, Guillozet-Bongaarts AL, Enz A, Darvesh S. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr Alzheimer Res.* 2005; 2:307–318.

Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, Causing. and function. *Annu Rev Neurosci.* 1998; 24:677-736.

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

Barbacid, M. The Trk family of neurotrophin receptors. *Journal of Neurobiology.* 1994; 1386-1403.

Barboza IG. Estudos da concentração plasmática de fatores neurotróficos (BDNF, NGF e GDNF) em pacientes com transtorno bipolar do humor. 2009. 89f. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori SS, Moreira JC, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive Impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Critical Care Medicine.* 2005; 221-223.

Barker GR, Warburton EC. Critical role of the cholinergic system for object-in-place associative recognition memory, *Learn Mem.* 2009; 8-11.

Barry DN, Coogan AN, Commins S. The time course of systems consolidation of spatial memory from recent to remote retention: A comparison of the Immediate Early Genes Zif268, c-Fos and Arc. *Neurobiol Learn Mem.* 2016; 128:46-55.

Barschak AG, Sitta A, Deon M, de Oliveira Marques MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis;* 2006; 21-27.

Bartus RT. On Neurodegenerative Diseases, Models, and Treatment Strategies: Lessons Learned and Lessons Forgotten a Generation Following the Cholinergic Hypothesis. *Experimental Neurology.* 2000; 163:495-529.

Bastin J. Regulation of mitochondrial fatty acid b-oxidation in human: What can we learn from inborn fatty acid b-oxidation deficiencies? *Biochimie.* 2014; 113-120.

Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM, Bresnahan JC, Hempstead BL, Yoon SO. ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron*. 2002; 36:375-386.

Behl C, Moosmann B. Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biol Chem*. 2002; 383:521-536.

Bekinschtein P, Cammarota M, Medina JH. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology*. 2014; 677-683.

Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*. 2007; 53(2):61-77.

Bekinschtein, P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo, I, Medina JH. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2008; 105: 2711-2716.

Benedetti M, Levi A, Chao MV. Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:7859-7863.

Bennett MJ, Rinado P, Staruss AW. Inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2000; 37(1):1-44.

Bernabei R, Landi F, Bonini S, Onder G, Lambiase A, Pola R, Aloe L. Effect of topical application of nerve growth-factor on pressure ulcers. *Lancet*. 199; 354:307.

Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *European Journal of Neuroscience*. 2003; 897-902.

Binder D, Croll S, Gall C. BDNF and epilepsy: too much of a good thing?. *Trends in Neuroscience*. 2001; 24:47-53.

Bobkova N, Vorobyov V, Medvinskaya N, Nesterova I, Tatarnikova O, Nekrasov P, Volpina O. Immunization Against Specific Fragments of Neurotrophin p75 Receptor Protects Forebrain Cholinergic Neurons in the Olfactory Bulbectomized Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016; 1:289-301.

Bogdanov AI, Yarushkina NI. Effect of ACTH on pain sensitivity in rats. *Bull Exp Biol Med*. 2001; 131:216-8.

Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G. Reference Genes for Normalization: A Study of Rat Brain Tissue. *Synapse*. 2008; 62:302-309.

Bothwell, M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *Research*. 2016.

Boyd JG, Gordon T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci*. 2002; 15:613-626.

Bozzali M, Parker GJ, Spanò B, Serra L, Giulietti G, Perri R, Magnani G, Marra C, G Vita M, Caltagirone C, Cercignani M. Brain tissue modifications induced by cholinergic therapy in Alzheimer's disease. *Hum Brain Mapp*. 2013; 34(12):3158-67.

Brown RM, Robertson EM. Off-line processing: reciprocal interactions between declarative and procedural memories. *J Neurosci*. 2007; 27(39):68-75.

Calissanno P, Amadoro G, Matrone C, Ciafre S, Marolda R, Corsetti V, Ciotti M T, Provezano C, Canu N. Does the term “trophic” actually mean anti-amyloidogenic? The case of NGF. *Cell Death Differentiation*. 2010; (7):1126-1133.

Calzà L, Giardino L, Giuliani A, Aloe L, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; (7):4160–4165.

Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V. Interaction between basal ganglia and limbic circuits in learning and memory processes. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016; 1:S65-8.

Carter AR, Chen C, Schwartz PM, Segal RA. Brain-derived neurotrophic factor modulates cerebellar plasticity and synaptic ultrastructure. *J Neurosci*. 2002; 22 (4):1316-27.

Catarzi S, Caciotti A, Thusberg J, Tonin R, Malvagia S, la Marca G, Morrone A. Medium-Chain Acyl-CoA Deficiency: Outlines from Newborn Screening, In Silico Predictions, and Molecular Studies. *The Scientific World Journal*. 2013.

Chan JR, Cosgaya JM, Wu YJ, Shooter EM. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 25:14661-14668.

Chao LP, Wolfgram F. Purification and some properties of choline acetyltransferase. *J Neurochem*. 1973; 20:1975-81.

Chao MV. Neurotrophins and Their Receptors: a Convergence Point for Many Signaling Pathways. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4:299-309.

Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, Herrera DG, Toth M, Yang C, McEwen BS, Hempstead BL, LEE FS. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science*. 2006; 140-143.

Choi S, Friedman WJ. Interleukin-1 β enhances neuronal vulnerability to proNGF-mediated apoptosis by increasing surface expression of p75^{NTR} and sortillin. *Neuroscience*. 2014; 257:11-19.

Conner JM, Culberson A, Packowski C, Chiba AA, Tuszynski MH, Lesions of the Basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning, *Neuron*. 2003; 819-829.

Conner, A. Culberson, C. Packowski, A.A. Chiba, M.H. Tuszynski, Lesions of the Basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning, *Neuron*. 2003; 819-829.

Cohen DA, Robertson EM. Preventing interference between different memory tasks. *Nature Neuroscience*. 2011; 14(8), 953-955.

Costa CG; Guérand WS; Struys EA; Holwerda U; TEN Brink HJ; Tavares DE Almeida I; Duran M; Jakobs C. Quantitative analysis of

urinary acylglycines for the diagnosis of beta-oxidation defects using GC-NCI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000; 21:1215-122.

Couce ML, Sánchez-Pintos P, Diogo L, Leão-Teles E, Martins E, Santos H, Bueno MA, Delgado-Pecellín C, Castiñeiras DE, Cocho JA, García-Villoria J, Ribes A, Fraga JM, Rocha H. Newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: regional experience and high incidence of carnitine deficiency. *Orphanet J Rare Dis*. 2013; 10:8-102.

Cunha AB, Frey BN, Andrezza AC, Goi JD. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neuroscience Letters*. 2006; 398: 215-219.

Daniel S, Arvelo M, Ferran C. Overexpression of A20 in endothelial cells of vascularized grafts creates a protective barrier against TNF- and FAS- mediated apoptosis. *Transplant Proc*. 2001; 225-229.

Darling TLJ, Petrides PE, Beguin P, Frey P, Shooter EM, Selby M, Rutter WJ. The biosynthesis and processing of proteins in the mouse 7S nerve growth factor complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1983; 48 (1):427-434.

Das AM, Drache S, Janzen N, Franke A. Macro-AST: misleading finding in an adolescent with MCAD-deficiency. *BMC Gastroenterology*. 2012; (12):119-121.

Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976; (25):03-14.

De Oliveira GS, Ceresér KM, Fernandes BS, Kaurer-Sant'anna M, Fries GR, Stertz L, Aguiar B, Pfaffenselle RB, Kapczinski F. Decreased brain-derived neurotrophic factor in medicated and drug-free bipolar patients. *Journal of Psychiatric Research*. 2009; 43: 1171-1174.

DeKosky ST, Ikonomic MD, Styren SD, Beckett L, Wisniewski S, Bennett DA, Cochran EJ, Kordower JH, Mufson EJ. Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol*. 2002; 51:145-155.

Derks TG, Reijngoud DJ, Waterham HR, Gerver WJ, van den Berg MP, Sauer PJ, Smit GP. The natural history of medium-chain acyl CoA dehydrogenase deficiency in

the Netherlands: clinical presentation and outcome. *J Pediatr.* 2006; 148 (5):665-670.

Derks TG, van Dijk TH, Grefhorst A, Rake JP, Smit GP, Kuipers F, Reijngoud DJ. Inhibition of mitochondrial fatty acid oxidation in vivo only slightly suppresses gluconeogenesis but enhances clearance of glucose in mice. *Hepatology.* 2008; 47 (3):1032-42.

Dessein A-F, Fontaine M, Andresen BS, et al. A novel mutation of the ACADM gene (c.145C>G) associated with the common c.985A>G mutation on the other ACADM allele causes mild MCAD deficiency: a case report. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2010; 5-26.

Dobransky T, Rylett RJ. A model for dynamic regulation of choline acetyltransferase by phosphorylation. *Journal of Neurochemistry.* 2005; (95): 305–313.

Dröge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol.* 2002; (12):1333-45.

Doeller, C. F., King, J. A., & Burgess, N. Parallel striatal and hippocampal systems for landmarks and boundaries in spatial memory. *Proceedings of the National Academy of USA.* 2008; 105(15): 5915-5920.

Du J, Gould TD, Manji HK. Neurotrophic signaling in mood disorders. In: Gutkind JS, editor. *Signal transduction and human disease.* John Wiley & Sons. 2003; 411-446.

Egidio RJ, Francis GL, Coates PM, Hale DE, Roesel AA. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *American Family Physician.* 1989; 221-226.

Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr.* 1993; 779S-785S.

Ferreira GK. An evaluation of the effects of acute and chronic L-tyrosine administration on BDNF levels and BDNF mRNA expression in the rat brain. *Mol Neurobiol.* 2014; 49:734-40.

Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Pesditschek S, Kuckuck H, Moysich A, Bittigau P, Ikonomidou C. Pathways leading to apoptotic

neurodegeneration following trauma to the developing rat brain. *Neurobiol Dis.* 2002; 2:231-45.

Fenton WA, Rosenberg LE. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism, in: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 1995; (1):1423-1449.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 1997; 43(1):61-8.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000; 408:239-47.

Frankland PW, Bontempi B. The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience* 2005; 6:119-30.

Giovannini MG, Daniele L, Giancarlo P. The integrated role of ACh, ERK and mTOR in the mechanisms of hippocampal inhibitory avoidance memory. *Neurobiology Of Learning And Memory.* 2015; 18-33.

Gökçek-Saraç Ç, Adal O, Jakubowska-Doğru E. Hippocampal levels of ChAT, PKA, phospho-PKA and phospho-CaMKII α but not CaMKII α positively correlate with spatial learning skills in rats. *Neurosci Lett.* 2013.

Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog. Neurobiol.* 2004; 74(6):363-96.

Gramer G, Haege G, Fang-Hoffmann J, Hoffmann GF, Bartram CR, Hinderhofer K, Lindner M. Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Evaluation of Genotype-Phenotype Correlation in Patients Detected by Newborn Screening. 2015; 23: 101-112.

Gray JD, Milner TA, McEwen BS. Dynamic Plasticity: The Role of Glucocorticoids, Brain-derived Neurotrophic Factor and other trophic factors. *Neuroscience.* 2013; 239: 214-227.

Graybiel AM, Baughman RW, Eckenstein F. Cholinergic neuropil of the striatum observes striosomal boundaries. *Nature.* 1986; 16:22-32.

Gregersen N, Brage S, Andresen, Christina B, Pedersen, Rikke K.J, Olsen Thomas J, Corydon, Peter Bross. Mitochondrial fatty acid

oxidation. Defects-remaining challenges. *J Inherit Metab Dis.* 2008; 31:643-657

Grosse SD. The epidemiology of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: An update. *Genetics in Medicine.* 2006; 205-212.

Grünert SC, Wehrle A, Villavicencio-Lorini P, Lausch E, Vetter B, Schwab K, Spiekerkoetter U. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency associated with a novel splice mutation in the ACADM gene missed by newborn screening. *BMC Medical Genetics.* 2015; 16-56.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, Oxford. 2007; 614-677.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press, 5^a ed. Oxford.2015

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci.* 1996; 8:22-26.

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

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 2001; (18):685-716.

Hammond P e Brimijoin S. Acetylcholinesterase in Huntington's and Alzheimer's diseases: simultaneous enzyme assay and immunoassay of multiple brain regions. *J Neurochem.* 1988; 50(4):1111-6

He Y, Chen R, Wang J, Pan W, Sun Y, Han F, Wang Q, Liu C. Neurocognitive impairment is correlated with oxidative stress in patients with moderate-to-severe obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *Respir Med.* 2016; 120:25-30.

Hellweg R, Von Richthofen S, Anders D, Baethge C, Röpke S, Hartung HD, Gericke CA. The time course of nerve growth factor content in different neuropsychiatric diseases: a unifying hypothesis. *Journal of Neural Transmission.*1998; 871-903.

Heubi JE, Partin JC, Partin JS, Schubert WK. Reye's syndrome: Current concepts. *Hepatology.* 1987; 155-164.Hoffmann GF, Kries R, Klose. "Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of

mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany,” *European Journal of Pediatrics*. 2004; 163:76-80.

Howells D, Porritt M, Wong J. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Experimental Neurology*. 2000; 127-135.

Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 2003; 72:609-42.

Hutson, J.M.; Niall, M.; Evans, D.; Fowler, R. Effect of salivary glands on wound contraction in mice. *Nature*. 1979; 793-795.

Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*. 1991; 230-232.

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 1998; 635-636.

Jaeger X, Cammarota M, Prado MA, Izquierdo I, Prado VF, Pereira GS.

Decreased acetylcholine release delays the consolidation of object recognition memory. *Behav Brain Res*. 2013; 1:238:62-8.

Jameson E, Walter JH. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Paediatr Child Health (Oxford)*. 2015; 3:145-148.

Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*. 1996; 47:161-170.

Jordan W, Dobrowolny H, Bahn S, Bernstein HG, Brigadski T, Frodl T, Isermann B, Lessmann V, Pilz J, Rodenbeck A, Schiltz K, Schwedhelm E, Tumani H, Wiltfang J, Guest PC, Steiner J. Oxidative stress in drug-naïve first episode patients with schizophrenia and major depression: effects of disease acuity and potential confounders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2016.

Kapczinski F, Frey BN, Andreatza AC, Kauer-Sant'Anna M, Cunha AB, Post RM. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. *Rev Bras Psiquiatr*. 2008; (30):243-5.

Karelson E, Bogdanovic N, Garlind A, Winblad B, Zilmer K, Kullisaar T, Vihalemm T, Kairane C, Zilmer M. The cerebrocortical areas in normal brain aging and in Alzheimer's disease: noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem Res.* 2001; 26 (4):353-61.

Karpova NN. Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity. *Neuropharmacology.* 2014; 709-718.

Keisler A, Shadmehr R. A shared resource between declarative memory and motor memory. *The Journal of Neuroscience.* 2010; 44:14817-14823.

Kompare M, Rizzo WB. Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Semin Pediatr Neurol.* 2008; 3:140-9.

Koster, Kira-Lee, Sturm M, Herebian D, Smits SHJ. Ute Spiekerkoetter . Functional studies of 18 heterologously expressed medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) variants. *J Inherit Metab Dis.* 2014; 37:917-928.

Krishna S, Andersson AM, Semsey S, Sneppen K. Structure and function of negative feedback loops at the interface of genetic and metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34:2455-62.

Kumar A, Dogra S, Prakash A. Protective effect of naringin, a citrus flavonoid, against colchicine-induced cognitive dysfunction and oxidative damage in rats. *J Med Food.* 2010; 13(4):976-84.

Kumar R, Långström B, Darreh-Shori T. Novel ligands of Choline Acetyltransferase designed by in silico molecular docking, hologram QSAR and lead optimization. *Scientific Reports.* 2016; 6:312-47.

Kraemer BR, Yoon SO, Carter BD. The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor. *Handb Exp Pharmacol.* 2014; 220:121-64.

Kwon YK, Choi SJ, Kim CR, Kim JK, Kim HK, Choi JH, Song SW, Kim CJ, Park GG, Park CS, Shin DH. Effect of *Chaenomeles sinensis* Extract on Choline Acetyltransferase Activity and Trimethyltin-Induced Learning and Memory Impairment in Mice. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2015; 12:1076-80.

Landreth EG. Growth Factors. In: Siegel, G. J. (Org.). *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular, and medical aspects.* 2006; 471-484.

Lang TF. Adult presentations of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD). *J Inherit Metab Dis.* 2009; 32:675-683.

Leach EL, Shevell M, Bowden K, Stockler-Ipsiroglu S, van Karnebeek CD. Treatable inborn errors of metabolism presenting as cerebral palsy mimics: systematic literature review. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2014; 9:9-7.

Leao, Letícia Lima; Aguiar, Marcos José Burle de. Triagem neonatal: o que os pediatras deveriam saber. *J. Pediatr. (Rio J.)*, Porto Alegre. 2008; 84:80-90.

Lee PJ, Harrison EL, Jones MG, Jones S, Leonard JV, Chalmers, RA. l-Carnitine and exercise tolerance in medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD) deficiency: A pilot study. *J. Inherit. Metab.Dis.* 2005; 28:141-152.

Lessmann V, Gottmann K, Malsangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology.* 2003; 341-374.

Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annual Review Neuroscience.* 1996; 289-317.

Leydiker JA, Neidich FL, Barr MR, Puckett ML, Lobo RM, Abdenur JE. Maternal medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency identified by newborn screening. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2011; 92-95.

Lim KC, Lim ST, Federoff HJ. Neurotrophin secretory pathways and synaptic plasticity. *Neurobiology of Aging.* 2003; 1135-1145.

Lima M, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schröder N. Pre or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK 821 impairs object recognition memory in rats. *Behavioral Brain Research.* 2005; 139-143.

Liu D, Wen J, Liu J, Li L. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *FASEB J.* 1999; 13(15):2318-28.

- Liu YF, Chen HI, Yu L, Kuo YM, Wu FS, Chuang JI, Liao PC, Jen CJ. Upregulation of hippocampal TrkB and synaptotagmin is involved in treadmill exercise-enhanced aversive memory in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2008; 90:81-89.
- Longo FM, Yang T, Knowles JK, Xie Y, Moore LA, Massa SM. Small molecule neurotrophin receptor ligands: novel strategies for targeting Alzheimer's disease mechanisms. *Curr Alzheimer Res.* 2007; (4):503-506.
- Lovera C, Porta F, Caciotti A, Catarzi S, Cassanello M, Caruso U, Gallina MR, Morrone A, Spada M. Sudden unexpected infant death (SUDI) in a newborn due to medium chain acyl CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency with an unusual severe genotype. *Ital J Pediatr.* 2012; (38):5-9.
- Lowry OH, Rosebroughv NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.
- Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6:603-614.
- Luo Y, Shi HH, Wang XR, Ji LL. Free radical generation and lipid peroxidation induced by 2,4-dichlorophenol in liver of *Carassius auratus*. *Huan Jing Ke Xue.* 2005; 26(3):29-32.
- Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2011; 1:441-464.
- Maegawa GH, Poplawski NK, Andresen BS, Olpin SE, NIE G, Clarke JT, Teshima I. Interstitial deletion of 1p22.2p31.1 and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in a patient with global developmental delay. *American Journal of Medical Genetics.* 2008; 146:1581-1586.
- Maier EM, Gersting SW, Kemter, KF, Jank JM, Reindl M, Messing D, Muntau AC. Protein misfolding is the molecular mechanism underlying MCADD identified in newborn screening. *Human Molecular Genetics.* 2009; 18 (9):1612-1623.
- Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis.* 2006; 10:59-73.

Mariga A, Mitre M, Chao MV. Consequences of brain-derived neurotrophic factor withdrawal in CNS neurons and implications in disease. *Neurobiol Dis.* 2016; 73-79.

Matsubara Y; Narisawa K; Tada K. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: molecular aspects. *European Journal of Pediatric.* 1992; 151:154-159.

Mayatepek E, Kölker S. Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. *J Biol Chem.* 2002; 277:14674-80.

Mayell SJL, Edwards FE, Reynolds AB, Chakrapani. Late presentation of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2007; 30:104

Mccord JM. The importance of oxidant-antioxidant balance. In: Montagneir L, Olivier R, Pasquier C (eds) *Oxidative Stress in Cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases.* New York. Dekker.1998; 1-8.

McKinneyTJ, Long NSH, Hahn D, Matern P, Rinaldo AW, Strauss SF, Dobrowolskia. Rapid, comprehensive screening of the human medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2004; 112-120.

Melo JB, Agostinho P, Oliveira CR. Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neuroscience Research.* 2003; 45:117-127.

Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10:850-860.

Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry.* 2001; 62-71.

Moczulski D, Majak I, Mamczur D. An overview of beta-oxidation disorders. *Postepy Hig Med Dosw.* 2009; 8 63:266-77.

Moris G, Vega J. Neurotrophic factors: basis for their clinical application. *Neurologia.* 2003; 18-28.

Murakami S, Imbe H, Morikawa Y, Kubo C, Senba E. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neurosci Res.* 2005; 53:129-39.

Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozar I R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. 2001; 71-124.

Najdekr L, Gardlo A, Mádrová L, Friedecký D, Janečková H, Correa ES, Goodacre R, Adam T. Oxidized phosphatidylcholines suggest oxidative stress in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Talanta*. 2015; 139:62-66.

Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6a ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Nennstiel-Ratzel U, Arenz S, Maier EM, Knerr I, Baumkötter J, Röschinger W, Liebl B, Hadorn HB, Roscher AA, von Kries R. Reduced incidence of severe metabolic crisis or death in children with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency homozygous for c.985A>G identified by neonatal screening. *Mol Genet Metab*. 2005; 2:157-9.

Niu DM, Chien HY, Chiang CC. "Nationwide survey of extended newborn screening by tandem mass spectrometry in Taiwan," *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2010; 33:S295-S305.

Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. 2004; 427:843-848.

Oerton J, Khalid JM, Besley, Dalton G, Downing M, Green A, Dezateux C. Newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in England: prevalence, predictive value and test validity based on 1.5 million screened babies. *Journal of Medical Screening*. 2001; 18(4): 173–181.

Ofek K, Soreq H. Cholinergic involvement and manipulation approaches in multiple system disorders. *Chemico-Biological Interactions*. 2013; 113-119.

Olson JE, Holtzman D, Sankar R, Lawson C, Rosenberg R. Octanoic acid inhibits astrocyte volume control: implications for cerebral edema in Reye's syndrome. *Journal of Neurochemistry*. 1989; 1197-1202.

Onkenhout W, Venizelos V, Van der poel PFH, Van der heuvel MPM, Poorthuis BJHM. Identification and quantification of intermediates of

unsaturated fatty acid metabolism in plasma of patients with fatty acid oxidation disorders. *Clinical Chemistry*. 1995; 1467-1474.

Pala FS, Gürkan H. The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Advances in Molecular Biology*. 2008; 1-9.

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*. 2004; 487-491.

Park D, Yang YH, Bae DK, Lee SH, Yang G, Kyung J, Kim D, Choi EK, Lee SW, Kim GH, Hong JT, Choi KC, Lee HJ, Kim SU, Kim YB. Improvement of cognitive function and physical activity of aging mice by human neural stem cells over-expressing choline acetyltransferase. *Neurobiol Aging*. 2013; 34(11):2639-46.

Park SE, Kim ND, Yoo YH. Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Res*. 2004; 64:2652-2655.

Paxinos G, Watson CR, Emson PC. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods*. 1980; 2:129-49.

Pederzoli CD, Mescka CP, Zandoná BR, Coelho DM, Sgaravatti AM, Sgarbi MB, Wyse ATS, Wannmacher CMD, Wajner M, Vargas CR, Dutra-Filho CS. Acute administration of 5-oxoproline induces oxidative damage to lipids and proteins and impairs antioxidant defenses in cerebral cortex and cerebellum of young rats. *Metab Brain Dis*. 2010; 25:145-154.

Peigneux P, Orban P, Baeteau E, Degueldre C, Luxen A, Laureys S, Maquet P. Offline Persistence of Memory-Related Cerebral Activity during Active Wakefulness. *PLoS Biology*. 2006; 4(4): 100.

Perez-Severiano F, Rios C, Segovia J. Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Res*. 2000; 862:234-237.

Perry G, Taddeo MA, Petersen RB. Oxidative damage in Alzheimer disease. *Biometals*. 2003; 16:77-81.

Pillai A. Brain-Derived Neurotrophic Factor/TrkB Signaling in the Pathogenesis and Novel Pharmacotherapy of Schizophrenia, *Neurosignals*. 2008; 183-193.

- Poldrack RA, Packard MG. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia*. 2003; 41(3):245-51.
- Pugazhenth S, Phansalkar K, Audesirk G, West A, Cabell L. Differential regulation of c-jun and CREB by acrolein and 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40 (1):21-34.
- Quach TT, Lerch JK, Honnorat J, Khanna R, Duchemin AM. Neuronal networks in mental diseases and neuropathic pain: Beyond brain derived neurotrophic factor and collapsin response mediator proteins. *World Journal of Psychiatry*. 2016; 6 (1):18-30.
- Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, de-Paris F, Izquierdo I, Rose SP. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learning & Memory*. 1999; 600-607.
- Quevedo J, Vianna M, Zanatta MS, Roesler R, Izquierdo I, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA. Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory. *Behavioral Pharmacology*, 1997; 713-717.
- Rakonczay Z. Cholinesterase and its molecular forms in pathological states. *Progress in Neurobiology*. 1988; (31):311-330.
- Randall M, Rolf C, Gibson SM, Hall PL, Rinaldo P, Davis GJ. Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Adulthood: A Potential Diagnosis in a Patient with Mental Status Changes Suspected of Drug Toxicity. *J Forensic Sci*. 2015; 60 (4):1101-3.
- Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Thorpe SR. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant*. 1996; 5:48-53.
- Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*. 1994; 233:357-363.
- Ribas GS, Biancini GB, Mescka C, Wayhs CY, Sitta A, Wajner M, Vargas CR. Oxidative stress parameters in urine from patients with

disorders of propionate metabolism: a beneficial effect of L: -carnitine supplementation. *Cell Mol Neurobiol.* 2012; 77-82.

Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ. Fatty acid oxidation disorders. *Annual Review of Physiology.* 2002; 477-502.

Rinaldo, P., Raymond, K., Al-Odaib, A., Bennett, M., 1998. Clinical and biochemical features of fatty acid oxidation disorders. *Curr. Opin. Pediatr.* 1998; 615-621.

Rodgers RJ, Cole JC, Harrison-Phillips DJ. "Cohort removal" induces hyperthermia but fails to influence plus-maze behaviour in male mice. *Physiol Behav.* 1994; 55(1):189-92.

Rodrigues AF, Biasibetti H, Zanotto BS, Sanches EF, Pierozan P, Schmitz F, Parisi MM, Tuana FB, Netto A, Wyse ATS. Intracerebroventricular d-galactose administration impairs memory and alters activity and expression of acetylcholinesterase in the rat. *Int. J. Devl Neuroscience.* 2016; 1-6.

Roe CR, Ding J. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* New York: McGraw-Hill. 2001; 1909-1963.

Roesler RL, Venturella DR, Vianna MR, Luft T, Henriques JA, Izquierdo I, Schwartsmann G. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *European Journal of Neuroscience.* 2004; 1041-1045.

Roex EWM, Keijzers R, Van G, Cam. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicology.* 2003; 64:451-460.

Ruitenbeek W, Poels PJ, Turnbull DM, Garavaglia B, Chalmers RA, Taylor RW, Gabreels FJ. Rhabdomyolysis and acute encephalopathy in late onset medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry.* 1995; 209-214.

Rumajoge P, Vergé D, Haunon N, Brisorgueil MJ, Hen R, Lesch KP, Hamon M, Miquel MC. Adaption of the serotonergic neuronal phenotype in the absence of 5-HT auto receptors or the 5-HT transporter: involvement of BDNF and cAMP. *European Journal Neuroscience.* 2004; 937-944.

Rybakowski JK, Borkowska A, Skibinska M. Prefrontal cognition in schizophrenia and bipolar illness in relation to val66met polymorphism

of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2006; 70-76.

Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry, B, Balakhaneh D, Huston, J, Metz CN. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005; 7:1113-1123.

Sampaio TB, Pinton S, da Rocha JT, Gai BM, Nogueira CW. Involvement of BDNF/TrkB signaling in the effect of diphenyl diselenide on motor function in a Parkinson's disease rat model. *Eur J Pharmacol*. 2016; 795:28-35

Saudubray JM, Martin D, de Lonlay P, Touati G, Poggi TF, Bonnet D, Jouvet P, Boutron M, Slama A, Vianey SC, Bonnefont JP, Rabier D, Kamoun P, Brivet M. *J Inherit Metab Dis*. 1999; 22 (4):488-502.

Scaini G, Mello-Santos LM, Furlanetto CB, Jeremias IC, Mina F, Schuck PF, Ferreira GC, Kist LW, Pereira TC, Bogo MR, Streck EL. Acute and Chronic Administration of the Branched-Chain Amino Acids Decreases Nerve Growth Factor in Rat Hippocampus. *Mol Neurobiol*. 2013; 48 (3):581-9.

Scaini G, Morais MO, Furlanetto CB, Kist LW, Pereira TC, Schuck PF, Ferreira GC, Pasquali MA, Gelain DP, Moreira JC, Bogo MR, Streck EL. Acute Administration of Branched-Chain Amino Acids Increases the Pro-BDNF/Total-BDNF Ratio in the Rat Brain. *Neurochem Res*. 2015; 40 (5):885-93.

Scaini G, Simon KR, Tonin M, Busanello ENB, Moura AP, Ferreira GC, Wajner M, Streck EL, Schuck PF. Toxicity of octanoate and decanoate in rat peripheral tissues: evidences of bioenergetics dysfunction and oxidative damage induction in liver and skeletal muscle. *Molecular and Cell Biochemistry*. 2012; 329-335.

Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ.

Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*. 2013; 106-107:1-16.

Schatz, R. Ensenauer, The clinical manifestation of MCAD deficiency: challenges towards adulthood in the screened population, *Journal of Inherited. Metabolic Disease*. 2010; 513-520.

Schuck PF, De Assis DR, Viegas CM, Brandão Pereira TC, Machado JL, Furlanetto CB, Bogo MR, Streck EL, Ferreira GC. Ethylmalonic acid modulates Na^+ , K^+ -ATPase activity and mRNA levels in rat cerebral cortex. *Synapse*. 2013; 111-117.

Schuck PF, Ferreira GC, Tonin AM, Viegas CM, Busanello E NB, Moura AP, Zanatta A, Klamt F, Wajner M. Evidence that the major metabolites accumulating in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency disturb mitochondrial energy homeostasis in rat brain. *Brain Research*. 2009a; 117-126.

Schuck PF, Ferreira Gda C, Viegas CM, Tonin AM, Busanello EN, Pettenuzzo LF, Netto CA, Wajner M. Chronic early postnatal administration of ethylmalonic acid to rats causes behavioral deficit. *Behav Brain Res*. 2009b; 364-370.

Schuck PF, Leipnitz G; Ribeiro CA; Dalcin KB; Assis DR; Barschak AG; Pulrolnik V; Wannmacher CM; Wyse AT; Wajer M. Inhibition of creatine kinase activity in vitro by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. *Neurochem Res*. 2002; 1633-1639.

Schuck PF, Busanello EN, Moura AP, Tonin AM, Grings M, Ritter L, Vargas CR, Ferreira GC, Wajner M. Promotion of lipid and protein oxidative damage in rat brain by ethylmalonic acid. *Neurochem Res*. 2010; 35:298-305.

Schuck PF, Ceolato PC, Ferreira GC, Tonin A, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Latini A, Wajner M. Oxidative stress induction by cis-4-decenoic acid: relevance for MCAD deficiency. *Free Radic Res*. 2007; 1261-72.

Sgaravatti AM, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Pederzolli CD, Prestes CG, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS. g-Hydroxybutyric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Neurochem. Int*. 2007; 50:564-570.

Shaltiel G, Chen G, Manji HK. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Curr Opin Pharmacol*. 2007; 1:22-6.

Shigematsu Y, Hirano S, Hata I. "Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan," *Journal of Chromatography*. 2002; 776:39-48.

Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M. Alterations

of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*. 2003; 54:70-5.

Shonukan O, Bagayogo I, McCrea P, Chao M, Hempstead B (2003) Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin. *Oncogene*. 2002; 3616-3623.

Shoval G, Weizman A. The possible role of neurotrophins in pathogenesis and therapy of schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*. 2005; 319-329.

Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology* 2005; 5:293-302.

Sketelj J, Crne-Finderle N, Strukelj B, Trontelj JV, Pette D, Acetylcholinesterase mRNA level and synaptic activity in rat muscles depend on nerve-induced pattern of muscle activation, *J. Neurosci*. 1998; 19:144-1952.

Slipczuk L, Bekinschtein P, Katche C, Cammarota M, Izquierdo I, Medina J.H. BDNF Activates mTOR to Regulate GluR1 Expression Required for Memory Formation. *PLoS One*. 2009; 6-7.

Smith CM; Marks AD; Lieberman MA. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. 2^a ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 2005.

Sofroniew MV, Howe LC, Mobley WC. Nerve Growth Factor Signaling, Neuroprotection, And Neural Repair. *Annu. Rev. Neurosci*. 2001.

Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001; 2:294-302.

Stefanello FM, Zugno AI, Wannamacher CMD, Wajner M, Wyse ATS. Homocysteine inhibits butyrylcholinesterase activity in rat serum. *Metabolic Brain Disease*. 2003; (18): 187-194.

Stenesh J. Biochemistry. New York: Plenum .In: Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR). 1998.

Sterne GD, Coulton GR, Brown RA, Green CJ, Terenghi G. Neurotrophin-3 enhanced nerve regeneration selectively improves recovery of muscle fibers expressing myosin heavy chains. *Journal of Cell Biology*. 1997; 709-715.

Strand AD, Baquet ZC, Aragaki AK, Holmans P, Yang L, Cleren C, Beal MF, Jones L, Kooperberg C, Olson JM, Jones KR. Expression profiling of Huntington's disease models suggests that brain-derived neurotrophic factor depletion plays a major role in striatal degeneration. *J Neurosci*. 2007; 27 (43):11758-68.

Sturm D, Herebian M, Mueller MD, Laryea, and U. Spiekerkoetter, "Functional effects of different medium-chain acyl-CoA dehydrogenase genotypes and identification of asymptomatic variants," *PLoS ONE*. 2012.

Tapia-Arancibia L, F Rage, et al. "Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function." *Front Neuroendocrinol*. 2004; 2:77-107.

Thevenet J, De Marchi U, Domingo JS, Christinat N, Bultot L, Lefebvre G, Sakamoto K, Descombes P, Masoodi M, Wiederkehr A. Medium-chain fatty acids inhibit mitochondrial metabolism in astrocytes promoting astrocyte-neuron lactate and ketone body shuttle systems. *FASEB J*. 2016; 30 (5):13-26.

Tonin AM, Grings M, Busanello EN, Moura AP, Ferreira GC, Viegas Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR, Goulart L, Chiochetta M, Coelho DM, Latini A, Llesuy S, Bello-Klein A, Giugliani R, Deon M, Mello CF. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004; 26-32.

Tonin AM, Grings M, Knebel LA, Zanatta Â, Moura AP, Ribeiro CA, Leipnitz G, Wajner M. Disruption of redox homeostasis in cerebral cortex of developing rats by acylcarnitines accumulating in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Int J Dev Neurosci*. 2012; 30 (5):383-90.

Trauner DA, Huttenlocher PR. Short chain fatty acid-induced central hyperventilation in rabbits. *Neurology*. 1978; 28:940-4.

Trauner DA. Pathologic changes in a rabbit model of Reye's syndrome. *Pediatr Res*. 1982; 16:950-3.

- Troy CM, Friedman JE, Friedman WJ (2002) Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons. Role of caspases. *J Biol Chem.* 2002; 277:34295–34302.
- Tsakiris Stylianos, Deliconstantino SG. Influence of phosphatidylserine on (Na⁺ + K⁺)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes. *Biochemical Journal.* 1984; 301-307.
- Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-miller LD. From acquisition to consolidation on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learning and Memory.* 2002; 224-237.
- Ullah F, Ali T, Ullah N, Kim MO. Caffeine prevents D-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. *Neurochem Int pii:* 2015.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 2009; 7:65-74.
- Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* 1995; 1:1423-1449.
- Valenzuela MJ, Breakspear M, Sachdev P. Complex mental activity and the aging brain: molecular, cellular and cortical network mechanisms. *Brain Research Review.* 2007; 198-213.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Mark TD, Cronin MM, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007; 39:44-84.
- Van Hove JL, Zhang W, Kahler SG, Roe CR, Chen YT, Terada N, Millington DS. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: diagnosis by acylcarnitine analysis in blood. *American Journal of Human Genetics.* 1993; 52 (5): 958-966.
- Vargas CR, Wajner M, Sitta A. Oxidative stress in phenylketonuric patients, *Mol Genet Metabl.* 2011; 104:97-99.
- Vaynman S, Ying Z Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 20:2580-2590.

Vianna MR . Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learning & Memory*. 2000; 333-340.

Wajner M, Amaral AU. Mitochondrial dysfunction in fatty acid oxidation disorders: insights from human and animal studies. *Biosci Rep*. 2015; (1):10-18.

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

Wang MF, Chan YC, Lee HT, Hong LZ. "Regulation of the intracerebroventricular administration of brain-derived neurotrophic factor on baroreflex function and insulin sensitivity in rats". *Chin J Physiol*. 2012; 3:184-91.

Weiss N. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 842-857.

Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1981; 77:325-332.

Wilcken B, Haas M, Joy P, Wiley V, Chaplin M, Black C, Fletcher J, McGill J, Boneh A. Outcome of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: a cohort study. 2007; 37-42.

Wiles JR, Leslie N, Knilans TK, Akinbi H. Prolonged QTc interval in association with medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Pediatrics*. 2014; 133 (6): 1781-6.

Wilhelm GW. Sudden death in a young woman from medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD) deficiency. *J Emerg Med.* 2006; 30 (3):291-4.

Willemijn JVJ, Geneviève D, Koolhaas J, Bekhof M, . Fokkema RH, de Koning TJ Visser G, Peter CJI, Schielen e Francjan J, Spronsen T, G.J. Derks A. Systematic Review with Implications for Population Neonatal Screening Programmes. *Neonatology* 2016; 109:297-302.

Wiltgen BJ, Brown RA, Talton LE, Silva AJ. New circuits for old memories: the with spatial learning performance in freely moving rats, *Neuroreport.* 2000; 11:2265-2269.

Wozniak A, Betts WH, Murphy GA, Rokicinski M. Interleukin-8 primes human neutrophils for enhanced superoxide anion production. *Immunology.* 1993; 79 (4):608-15.

Wu K, Xu JL, Suen PC, Levine E, Huang YY, Mount HT, Lin SY, Black IB. Functional TrkB neurotrophin receptors are intrinsic components of the adult brain postsynaptic density. *Mol Brain Res.* 1996; 43:286-90.

Xie B, Xu Y, Liu Z, Liu W, Jiang L, Zhang R, Cui D, Zhang Q, Xu S. Elevation of Peripheral BDNF Promoter Methylation Predicts Conversion from Amnesic Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease: A 5-Year Longitudinal Study. *J Alzheimers Dis.* 2016.

Yamamoto Y, Shioda N, Han F, Moriguchi S, Nakajima A, Yokosuka A, Mimaki Y, Sashida Y, Yamakuni T, Ohizumi Y, Fukunaga K. Nobiletin improves brain ischemia-induced learning and memory deficits through stimulation of CaMKII and CREB phosphorylation. *Brain Res.* 2009; 27:1295:218-29.

Yamada K, Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci.* 2003; 91:267-270.

Yin Q, Kemp GJ, Frostick SP. Neurotrophins, neurons and peripheral nerve regeneration. *Journal of Hand Surgery: British.* 1988; 433-437.

Yoshii A, Constantine-Paton M. Post-synaptic BDNF-TrkB Signaling in Synapse Maturation, Plasticity and Disease. *Developmental Neurobiology.* 2010; 5:304-322.

Zhang Y, Gu X, Yuan X. Phenylalanine activates the mitochondria-mediated apoptosis through the RhoA/Rho-associated kinase pathway in cortical neurons. *Eur J Neurosci.* 2007; 25 (5):1341-8.

Zhang Y, Zhao J, Wang J, Jiao X. Brain-derived neurotrophic factor inhibits phenylalanine-induced neuronal apoptosis by preventing RhoA pathway activation. *Neurochem Res.* 2010; 35 (3):480-6.

Zhang, D. P. Kelly, J. J. Kim et al., "Structural organization and regulatory regions of the human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene," *Biochemistry.* 1992; 31:81-89.

Ziegenhorn AA, SchultE-Herbrüggen O, Danker-Hopfe H, Malbranc M, Hartung HD, Anders D, Lang UE, Steinhagenthiessen E, Schaub RT, Hellweg R. Serum Neurotrophins: a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiology of Aging.* 2007; 143614-143645.

Zirger JM, Beattie CE, McKay DB, Boyd RT. (2003). Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Gene Expr Patterns.* 2003; 6:747-54.

Zou J, Crews F. CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell Mol Neurobiol.* 2006; 26:385-405.

Zuccato C, Cattaneo E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol.* 2009; 6:311-22.

Zugno AI, Pereira LO, Mattos C, Scherer EBS, Netto CA, Wyse ATS. Guanadinoacetato administration increases acetylcholinesterase activity in striatum of rats and impairs retention of an inhibitory avoidance task. *Metabolic Brain Disease.* 2008; 189-198.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



Resolução



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

Protocolo: 090/2013-2

Professor Responsável: Patrícia Fernanda Schuck.

Equipe: Emílio Luiz Streck, Gustavo da Costa Ferreira, Alexandra Ioppi Zugno, Bruna Klippel Ferreira, Hugo Galvane Zapelini, Marina Lummerz Magenis, Clarissa Martinelli Cornin, Diogo Dominguiini, Felipe Dal Pizzol, Fabricia Cardoso Petronilho, João Quevedo, Maurício Reis Bogo, Luiza Wlges Kist, Giselli Scaini e Andrea Cristina Ramos.

Título: "Efeito da administração intracerebroventricular de ácido octadécico sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos: possível papel protetor do ômega 3".

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização de 240 Ratos Wistar 60 dias 220 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net

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

Protocol number: 090/2013-2

Principal Investigator: Patrícia Fernanda Schuck.

Researchers: Emílio Luiz Streck, Gustavo da Costa Ferreira, Alexandra Ioppi Zugno, Bruna Klippel Ferreira, Hugo Galvane Zapelini, Marina Lummerz Magenis, Clarissa Martinelli Cornin, Diogo Dominguiini, Felipe Dal Pizzol, Fabricia Cardoso Petronilho, João Quevedo, Maurício Reis Bogo, Luiza Wlges Kist, Giselli Scaini e Andrea Cristina Ramos.

Project title: "Effects of intracerebroventricular administration of octanoic acid on biochemical and behavioral parameters in rats: possible protective effect of omega 3".

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

Criciúma, 12 de novembro de 2013.

Wilson Heinzen Cardoso
Coordenador Adjunto da CEUA