



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**N-acetilcisteína previne a piora da memória espacial induzida
por ácido glutárico e lipopolissacarídeo em ratos jovens**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Silva Rodrigues

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**N-acetilcisteína previne a piora da memória espacial induzida
por ácido glutárico e lipopolissacarídeo em ratos jovens**

Por

Fernanda Silva Rodrigues

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM,RS) como requisito para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica
Toxicológica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Rechia Fighera
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**N-acetilcisteína previne a piora da memória espacial induzida
por ácido glutárico e lipopolissacarídeo em ratos jovens**

elaborada por

Fernanda Silva Rodrigues

como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Prof^a. Dr^a. Michele Rechia Fighera
(Orientadora)**

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (UFSC)

Prof^a. Dr^a. Roselei Fachinetto (UFSM)

Santa Maria, 10 de março de 2014

Dedico esta dissertação aos meus pais e ao meu irmão!

'Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.'

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer, a minha família que sempre me apoiou, muitas vezes, acreditou em mim mais do que eu mesma, e nunca mediu forças para que hoje eu pudesse chegar até aqui. Pai, mãe e Tonho vocês são minha força e minha inspiração, sem vocês não teria chego onde estou. Não há palavras para agradecer, mas meus sinceros Muito Obrigada! ‘ Pai e mãe com vocês eu já sorri e chorei de emoção, aprendi que perdoadando é que se tem perdão’.

Quero agradecer também a minha vó Cira pelo apoio desde sempre, pelo carinho e pelo zelo que sempre teve por mim. A minha vó Nelci que sempre me alegrou com sua companhia, sempre acreditou e torceu por mim. Muito obrigada vós!! Vô João, com certeza você está muito feliz e orgulhoso, onde quer que você esteja, obrigada por iluminar meu caminho! Todos meus tios, tias e meus primos queridos, muito obrigada por tudo, eu amo vocês, com vocês a vida sempre será uma festa, e eu fico muito feliz por isso!

Aos meus orientadores e amigos, Mi e Nando, pela oportunidade que me deram, me recebendo no laboratório aos 45 minutos do segundo tempo da minha graduação, meus eternos agradecimentos! Agradeço pela amizade, pela paciência, pela compreensão dos erros e pelos conhecimentos a mim passados. Minha eterna admiração e reconhecimento, muito obrigada! Espero um dia conseguir retribuir todo esse apoio a vocês!

Falando em laboratório, essa grande família que é o BioEx, vocês não são apenas colegas de trabalho, mas sim grandes amigos, irmãos... Iuri, Busanello, Fred, Mandolate, Samurai, Rogério, Excel, Maurinho, Maurão, Fê tiopental, Ale, Marla, admiro todos, vocês são pessoas incríveis! Obrigada pela ajuda no dia-a-dia no laboratório, pela parceria, amizade. Agradecimento especial a ‘Ceita’... Mauren, com certeza minha maior motivadora dentro do laboratório, a ajuda profissional que tu sempre me deu, e me dá até hoje é muito importante pra mim, obrigada pelo apoio e pela amizade que criamos! Ana Paula, pessoa com muito conhecimento e um dom de ensinar, sensacional. Obrigada pelas mil explicações de tudo e por sempre demonstrar um carinho enorme por mim. Bibiana, minha companheira, com certeza

crecemos muito juntas, obrigada por sempre me ouvir, me ajudar, ser minha amiga!

Alíne, Camii, Gii... 'lágrimas na vitória, sempre na derrota ou glória, é luz na escuridão, somos um só coração! Sempre vivo na memória, fazem parte da minha história. Nada vai nos separar, a amizade é tudo! É se dar sem esperar, nada em troca dessa união, é ter alguém pra contar na indecisão, nunca se desesperar, sempre alí pra estender a mão, maior valor não há, é feito irmão!' Obrigada pela amizade, pelo apoio sempre sempre, pelas conversas, pela cumplicidade, por todos os momentos, por me motivarem, por estarem sempre comigo nas horas boas e ruins. Vocês são muito especiais, é reconfortante saber que vocês estão sempre comigo, amo muito vocês!

Gostaria de agradecer também as 'Delícias' que me divertiram muuito esse ano, espero que continuemos nesse clima...Gi, Jana, Luani e Anna, obrigada! Obrigada também à Sofia pelas longas conversas sobre o futuro profissional, pelos conselhos. Grande amiga, obrigada pelo apoio de sempre! As gurias do handebol, HFMS 'vamo que vamo', só quem pratica algum esporte sabe o prazer e a gratificação que é participar de uma equipe, todas com um mesmo objetivo. Valeu gurias! Gostaria de agradecer também aos meus amigos de Cruz Alta, sempre me motivando! Todos fazem parte desta conquista!

À Universidade Federal de Santa Maria por tornar possível o sonho da graduação e pós-graduação em uma universidade pública e de qualidade. À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

E para finalizar, gostaria de agradecer a Nossa Senhora de Fátima! Mesmo acreditando que cada um é responsável pelo seu destino, sei que em algum lugar há uma força maior que ilumina meu caminho!

Muito Obrigada!!!

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

N-acetilcisteína previne a piora da memória espacial induzida por ácido glutárico e lipopolissacarídeo em ratos jovens

Autor: Fernanda Silva Rodrigues

Orientadora: Michele Rechia Figuera

Co-orientador: Luiz Fernando Freire Royes

Local e data de defesa: Santa Maria, 10 de março de 2014.

A acidemia glutárica do tipo I (AG-I) é um erro inato do metabolismo (EIM) caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo de ácido glutárico (AG). As manifestações clínicas são predominantemente neurológicas, e desenvolvem-se principalmente na infância. Entre essas alterações, as quais são precipitadas por processos infecciosos, pode-se citar o déficit cognitivo. Embora estudos recentes sugerem que a inflamação e o estresse oxidativo estão envolvidos no déficit cognitivo, não se sabe se os marcadores inflamatórios e oxidativos facilitam o prejuízo de memória após a administração de AG. A partir disso, o objetivo desta dissertação foi investigar o desempenho de ratos jovens injetados cronicamente com AG e lipopolissacarídeo (LPS) no teste de memória espacial no labirinto de Barnes. Além disso, foi avaliado os níveis das defesas antioxidantes, níveis de citocinas, atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase e volume hipocampal. Como a N-acetilcisteína (NAC) possui propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, foi testado se esse composto poderia melhorar as alterações comportamentais, bioquímicas e estruturais induzidas pela administração de AG e LPS. Para isso, os ratos jovens foram injetados com AG (5 $\mu\text{mol/g}$ do peso corporal⁻¹; subcutaneamente; duas vezes por dia; do 5º ao 28º dia de vida), e foram suplementados com NAC (150 mg/kg/dia; por gavagem; pelo mesmo período). A fim de mimetizar um estado infeccioso, LPS (2 mg/Kg; E. coli 055 B5) ou veículo (salina 0.9%) foi injetado intraperitonealmente uma vez por dia, do 25º ao 28º dia de vida. Nesse estudo, AG causou déficit de aprendizagem espacial no labirinto de Barnes, e o LPS potencializou esse prejuízo de memória induzido pelo AG nos ratos jovens. Em adição, a administração de AG e LPS aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α and IL-1 β), e a associação desses compostos potencializou o aumento dos níveis de IL-1 β , mas não de TNF- α no hipocampo dos animais. Embora a associação de AG e LPS tenha causado o aumento o conteúdo TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), a redução das defesas antioxidantes e inibição da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase (total e subunidade α_1), a associação de AG e LPS não teve efeito aditivo nos marcadores de estresse oxidativo e na atividade da bomba de Na^+ e K^+ . O volume hipocampal não foi alterado após a administração do AG e LPS. A N-acetilcisteína protegeu contra o prejuízo de aprendizagem espacial e aumento de citocinas inflamatórias induzido pelo AG e LPS. A NAC também protegeu contra os efeitos deletérios induzidos pelo AG e LPS, caracterizado pela inibição da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase (total e subunidade α_1) e aumento do conteúdo de TBARS, bem como a redução das defesas antioxidantes (tióis não-proteicos, conteúdo de glutatona, atividade da superóxido dismutase e catalase). Esses resultados sugerem que marcadores inflamatórios e oxidativos podem estar envolvidos, em parte, na neuropatologia da AG-I neste modelo. Dessa forma, a proteção farmacológica com a NAC durante crises encefalopáticas pode ser considerada como uma terapia adjuvante para prevenir a disfunção hipocampal e a progressão da doença em crianças com AG-I.

Palavras-chave: AG; LPS; IL-1 β , TNF- α , memória, hipocampo, atividade da Na^+ , K^+ -ATPase.

ABSTRACT

Master Dissertation

Graduating Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

N-acetylcysteine prevents spatial memory impairment induced by chronic early postnatal glutaric acid and lipopolysaccharide in rat pups

Author: Fernanda Silva Rodrigues

Advisor: Michele Rechia Figuera

Co-advisor: Luiz Fernando Freire Royes

Date and place of defense: Santa Maria, March 10st, 2014

Glutaric aciduria type I (GA-I) is an inborn error of metabolism (EIM) characterized biochemically by accumulation of glutaric acid (GA). The clinical manifestations are mainly neurological and develop during childhood. Among these changes, there are the seizures and cognitive deficits, which may be precipitated by infectious processes. Although growing evidence supports that inflammation and oxidative damage are both involved in learning impairment, it is not known whether inflammatory and oxidative stress markers facilitate GA-induced memory impairment. From this, the main objective of this study was to investigate the performance of rat pups chronically injected with GA and lipopolysaccharide (LPS) in spatial memory test on Barnes maze. To evaluate antioxidant defenses, cytokines levels, Na⁺, K⁺-ATPase activity, and hippocampal volume. Furthermore, we also evaluated whether N-acetylcysteine (NAC) could improve these behavioral, biochemical or structural changes induced by GA and LPS administration. For this, the rat pups were injected with GA (5 μmol/g of body weight⁻¹, subcutaneously; twice per day; from 5th to 28th day of life), and were supplemented with NAC (150 mg/kg/day; intragastric gavage; for the same period). In order to mimic a severe infection state, LPS (2 mg/kg; E.coli 055 B5) or vehicle (saline 0.9%) was injected intraperitoneally, once per day, from 25th to 28th day of life. Oxidative stress biomarkers, antioxidant activity and hippocampal volume were assessed. In this study, GA caused spatial learning deficit in the Barnes maze, and that LPS potentiated the memory impairment induced by GA in rat pups. In addition, GA and LPS increased proinflammatory cytokine levels (TNF-α and IL-1β), and the co-administration of these compounds potentiated the increase of IL-1β levels but not TNF-α levels in the hippocampus of these animals. Although GA and LPS administration increased TBARS (thiobarbituric acid-reactive substance) content, reduced antioxidant defenses and inhibited Na⁺, K⁺-ATPase activity (total and subunit α₁), GA and LPS co-administration did not have additive effect on oxidative stress markers and Na⁺, K⁺ pump. The hippocampal volume did not change after GA or LPS administration. N-acetylcysteine protected against impairment of spatial learning and increase of cytokines levels induced by GA and LPS. The NAC also protected against deleterious effects induced by GA and LPS, as characterized by inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity (total and subunit α₁) and increase of TBARS content, as well as the reduction of antioxidant defenses (non protein thiols and glutathione content, superoxide dismutase and catalase activities). These results suggest that inflammatory and oxidative markers may underlie at least in part of the neuropathology of GA-I in this model. Pharmacological protection with NAC during encephalopathic crises could be considered as an adjuvant therapy to prevent hippocampal dysfunction and the progression of disease in children with GA-I.

Keywords: GA; LPS; IL-1β; TNF-α; memory; hippocampus; Na⁺, K⁺-ATPase activity.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase	19
Figura 2 – Similaridade estrutural entre glutamato, ácido glutárico e 3-hidróxiglutarico	23
Figura 3 - Representação esquemática da conclusão da presente Dissertação	65

LISTA DE ABREVIATURAS

3-OH-AG	Ácido 3-hidroxi-glutárico
4-HNE	4-hidroxi-nonenal
γ GCS	γ -glutamil-cisteína sintetase
AG	Ácido Glutárico
AG-I	Acidemia Glutárica do tipo I
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
CAMKII	Proteína cinase dependente de cálcio calmodulina II
CAT	Catalase
DCFH	Diclorofluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EIM	Erro inato do metabolismo
ER	Espécies reativas
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido δ -aminobutírico
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona-S-transferase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSSG	Glutaciona oxidada
GCDH	Glutaril-CoA desidrogenase
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
LPS	Lipopolissacarídeo
LPO	Peroxidação lipídica

LTP	Potenciação de longa duração
MDA	Malondialdeido
mGLU-R	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
NAC	N-acetilcisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NPSH	Grupos tióis não protéicos
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
RL	Radical livre
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Erros Inatos do Metabolismo	15
1.2. Acidemias Orgânicas	16
1.3. Acidemia Glutárica Tipo I (AG-I)	17
1.3.1. Definição	17
1.3.2. Incidência.....	19
1.3.3. Achados clínicos.....	20
1.3.4. Achados neuropatológicos.....	21
1.3.5. Fisiopatologia	21
1.3.6. Diagnóstico.....	25
1.3.7. Tratamento	26
1.4. Biomarcadores oxidativos e inflamatórios na Acidemia Glutárica tipo I	27
1.4.1. Estresse oxidativo e acidemia glutárica.....	27
1.4.2. Marcadores inflamatórios e acidemia glutárica	31
1.5. Memória e Acidemia Glutárica.....	32
1.6. N-acetilcisteína.....	35
1.7. OBJETIVO	38
1.7.1. Objetivo Geral	38
1.7.2. Objetivos Específicos.....	38
2. ARTIGO CIENTÍFICO	39
2.1. N- acetylcysteine prevents spatial memory impairment induced by chronic early postnatal glutaric acid and lipopolysaccharide in rat pups.....	39
2.1.2. Título em português	39
2.1.2. Autores.....	39
3. DISCUSSÃO.....	58
4. CONCLUSÕES	64
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma revisão de literatura sobre os temas abordados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste trabalho.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** da dissertação apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contidos no final neste trabalho.

O item **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** refere-se somente as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios hereditários baseados em deficiências enzimáticas, levando ao acúmulo de substratos e a falta de produtos da reação enzimática afetada, ou devido a deficiência em transportadores, resultando no acúmulo de substratos em determinados compartimentos celulares (ILLSINGER; DAS, 2010). Em consequência deste bloqueio metabólico, pode ocorrer o acúmulo de precursores tóxicos, com formação de rotas metabólicas alternativas, e deficiência de substâncias essenciais no organismo, podendo gerar distúrbios no desenvolvimento físico e mental (OBERHOLZER et al., 1967).

No início do século XX, o médico britânico Archibald Edward Garrod (1857-1936) empregou pela primeira vez o termo EIM para relatar situações clínicas as quais ele acreditou serem consequências de defeitos em vias metabólicas. A primeira doença estudada foi a alcaptonúria, a qual é caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo do ácido homogentísico, e clinicamente por artrite aguda (SCRIVER, 2008).

Hoje, os EIMs são chamados também de doenças metabólicas congênitas ou doenças metabólicas hereditárias. Observadas individualmente são consideradas raras, mas, se analisadas coletivamente, são numerosas e responsáveis por significantes níveis de morbidade e mortalidade (SAHOO et al., 2012). Atualmente, já foram catalogados mais de 700 EIMs devido aos avanços nos estudos genéticos e técnicas de diagnóstico (ILLSINGER; DAS, 2010).

A maioria dos EIMs são doenças associadas a um único gene, e podem ser classificados em três grupos principais: (1) doenças que dão origem à intoxicação através do acúmulo de compostos intracelulares ao longo do tempo; (2) doenças envolvendo o metabolismo energético; e (3) doenças envolvendo o metabolismo de moléculas complexas. As doenças que causam intoxicação aguda ou crônica englobam as acidemias orgânicas como a acidemia metilmalônica, propiônica, isovalérica e glutárica (SAUDUBRAY; CHARPENTIER, 1995; SAHOO et al., 2012).

Os EIM afetam aproximadamente 1 a cada 800 recém nascidos vivos (SAHOO et al., 2012), e apesar de serem eventos individualmente raros, esse grupo de doenças representa um importante problema de saúde e seu diagnóstico, frequentemente, se constitui em desafio para o clínico.

1.2. Acidemias Orgânicas

As acidemias ou acidúrias orgânicas constituem um grupo de EIM e são caracterizadas pelo acúmulo de um ou mais ácidos orgânicos nos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes afetados, ocasionado pela deficiência, total ou parcial, na atividade de alguma enzima envolvida no metabolismo de aminoácidos, lipídeos ou carboidratos (CHALMERS E LAWSON, 1982). Um subgrupo das acidemias orgânicas, que apresentam manifestações neurológicas predominantemente, tem sido classificado como doenças de ácidos orgânicos “cerebrais”. Dentro desse subgrupo, encontra-se a Acidemia Glutárica do tipo I (AG-I) (HOFFMANN et al., 1994).

Os sintomas neurológicos apresentados pelas crianças com acidemias orgânicas são frequentemente manifestados durante crises agudas precipitadas por estresse catabólico. Durante essas circunstâncias, há ocorrência de um déficit energético, com conseqüente mobilização dos estoques de carboidratos, ácidos graxos e proteínas. Estas moléculas sofrem processos de catabolismo, mas devido ao bloqueio na rota metabólica, ácidos orgânicos e outros compostos são acumulados. Nesse contexto, tem sido sugerido que alguns desses metabólitos podem agir como toxinas endógenas e tornarem-se neurotóxicos (MCLAUGHLIN et al., 1998; OLIVERA-BRAVO et al., 2011; 2013; SCHUCK et al., 2013).

A frequência destas doenças na população em geral é pouco conhecida, o que pode ser devido à falta de laboratórios especializados para o seu diagnóstico e ao desconhecimento médico sobre essas enfermidades. Na Holanda, país considerado referência no diagnóstico dos erros inatos do metabolismo, a incidência é estimada em 1: 2.200 recém-nascidos, enquanto que, na Alemanha, Israel e Inglaterra é aproximadamente 1: 6.000 – 1: 9.000 recém nascidos (HOFFMANN et al., 2004). Em países que possuem uma taxa

de consanguinidade elevada, como na Arábia Saudita, a frequência de acidemias orgânicas é de 1: 740 nascidos vivos (RASHED et al. 1994).

Dentre as acidemias, encontram-se a acidemia Isovalérica, acidemias Lácticas, deficiência da 3-metilcrotonil CoA carboxilase, deficiência de biotinidase, acidemia 3-metilglutacônica, acidemia 3-hidroxi 3-metilglutárica, acidemia propiônica, acidemia metilmalônica e acidemia glutárica (SAUDUBRAY; SEDEL; WALTER, 2006).

1.3. Acidemia Glutárica Tipo I (AG-I)

1.3.1. Definição

AG – I (OMIM # 231670) é um erro inato do metabolismo que foi descrito pela primeira vez em 1975 por Goodman e colaboradores. Nesta acidemia, há uma deficiência parcial ou total da enzima mitocondrial glutaril-CoA desidrogenase (EC 1.3.99.7), a qual está envolvida na degradação dos aminoácidos L-lisina, L-hidroxilisina e L-triptofano (GOODMAN e FRERMAN, 2001). Esta enzima, que se localiza na matriz mitocondrial, catalisa a descarboxilação oxidativa do glutaril-CoA a crotonil-CoA e CO₂ na proporção 1:1:1, transferindo os elétrons para a cadeia respiratória via flavoproteína transferidora de elétrons (LENICH E GOODMAN, 1986). Essa reação possui duas diferentes etapas: a desidrogenação de glutaril-CoA a glutaconil-CoA e a descarboxilação de glutaconil-CoA a crotonil-CoA (HÄRTEI et al., 1993).

Mais de 63 mutações diferentes têm sido relatadas em pacientes com AG-I (HEDLUND; LONGO; PASQUALI; 2008). O gene da glutaril-CoA desidrogenase (GCDH) está localizado no cromossomo 19p 13.2 e codifica um polipeptídeo de 438 aminoácidos que sofre uma clivagem na porção N-terminal na qual são retirados 44 aminoácidos formando uma proteína madura dentro da matriz mitocondrial (GOODMAN et al., 1998). A mutação mais comum é a R402W, a qual é uma codificação de um aminoácido diferente do normal, e ela é responsável por menos de 20% das mutações (GOODMAN et al., 1998). A R402W mantém apenas cerca de 3% da atividade enzimática, enquanto que outras mutações semelhantes, como A421V, mantém uma atividade enzimática significativa, superior a 40% da atividade enzimática normal, quando expressa

em *Escherichia coli* (GOODMAN et al., 1998). Ainda não está claro se pacientes com mutações semelhantes a A421V, prevalentes na Pensilvânia, possuem maior probabilidade de permanecerem assintomáticos (HEDLUND; LONGO; PASQUALI; 2006). Apesar do conhecimento de diferentes mutações, não há correlação entre o genótipo, a atividade enzimática e o prognóstico dos pacientes (GOODMAN et al., 1998; KÖLKER et al., 2006).

Com o bloqueio da atividade enzimática, formam-se rotas metabólicas alternativas que resultam em concentrações elevadas de AG, 3-hidroxi-glutárico (3-OH-AG) e ácido glutacônico nos tecidos e líquidos biológicos (plasma, urina e liquor) dos pacientes com AG-I (GOODMAN et al., 2001; Figura 1). No plasma, as concentrações desses ácidos variam de 4 a 500 $\mu\text{mol/L}$ (HOFFMANN et al., 1996), mas no cérebro, as concentrações podem ser bem mais elevadas, variando entre 500 a 5000 $\mu\text{mol/L}$ para o AG e entre 40 a 200 $\mu\text{mol/L}$ para o 3-OH-AG (SAUER et al., 2006).

Essas diferenças de concentrações do AG e do 3-OH-AG no sangue e no cérebro, podem ser explicadas pelo fato que estes ácidos orgânicos são produzidos nas células neurais e a barreira hematoencefálica é pouco permeável a eles, levando ao acúmulo dessas substâncias no sistema nervoso central (SNC), o que se constitui em um fator de risco para a neurodegeneração característica dos pacientes afetados (SAUER et al., 2006; KÖLKER et al., 2006).

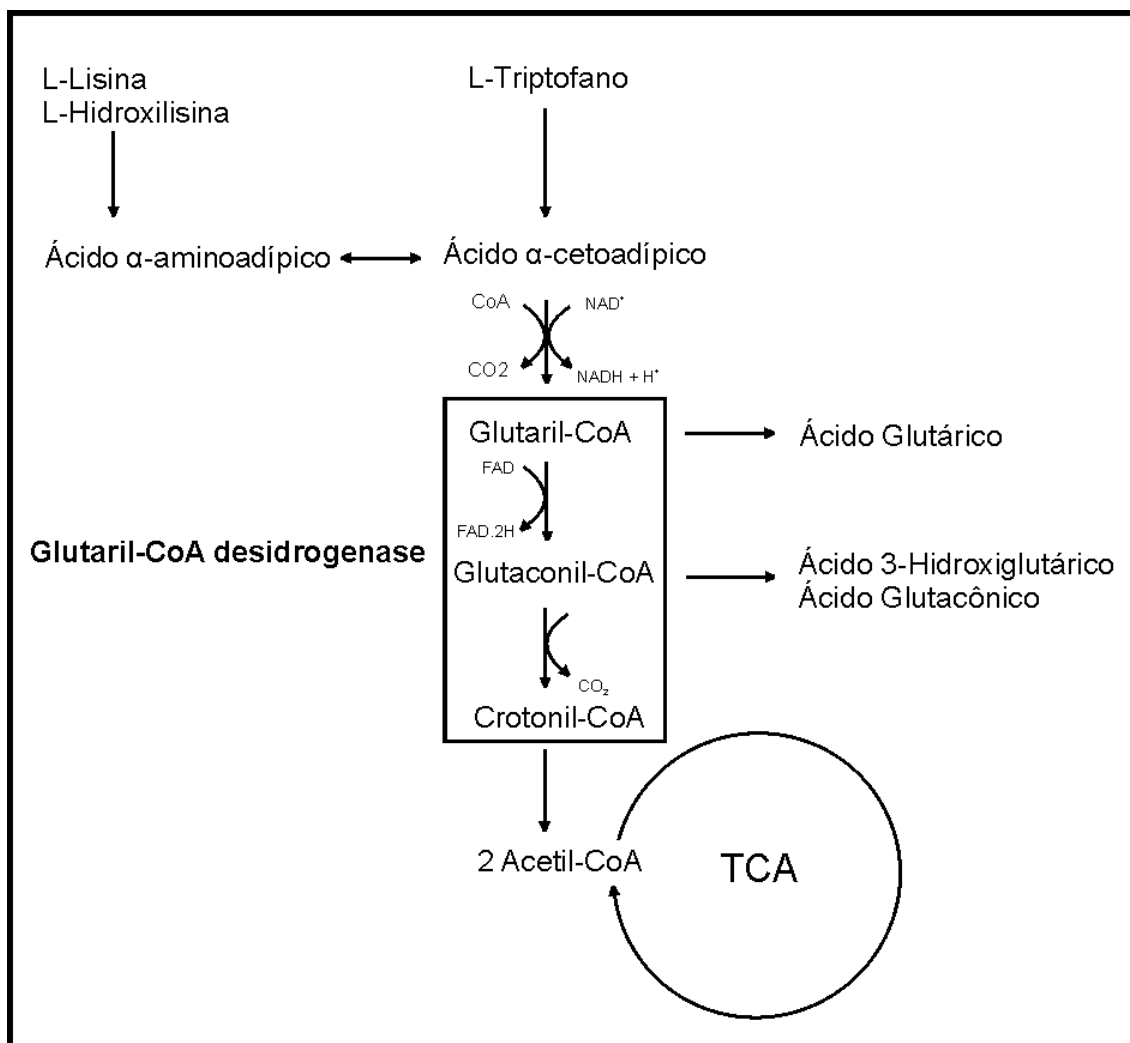


Figura 1. Deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase (Adaptado de Goodman e Frerman, 2001).

1.3.2. Incidência

A prevalência da AG-I é estimada em 1: 30.000 a 80.000 (GOODMAN E FRERMAN, 2001) ou 1:100.000 recém-nascidos (LINDNER et al., 2004). A doença é muito frequente, 1:300, entre certos grupos étnicos, tais como a comunidade Ordem Amish da Pensilvânia (MORTON et al., 1991) e o norte americano, Ojibway no Canadá (GREENBERG et al., 1995). No Brasil, ainda não há estudos epidemiológicos a cerca da AG-I. Somente um estudo realizado na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, demonstrou a prevalência de acidemias orgânicas em pacientes brasileiros com suspeita de alguma destas acidemias. Neste estudo, foram analisados 1.480 pacientes suspeitos, investigados entre os anos de 1994 e 2000. Destes, 73 (4,9%) foram

diagnosticados com acidemias orgânicas, sendo que dentre eles, 9 foram detectados com acidemia glutárica tipo I (WAJNER et al., 2001).

1.3.3. Achados clínicos

As manifestações clínicas podem variar consideravelmente entre os pacientes afetados. Um dos achados clínicos mais comum é a macrocefalia presente ao nascimento ou o seu desenvolvimento logo em seguida, no período pós-natal. Inicialmente, a maioria dos pacientes não apresentam manifestações clínicas além da macrocefalia (HEDLUND, LONGO, PASQUALI, 2006). A sintomatologia inicial é geralmente branda, com alguns pacientes desenvolvendo-se normalmente até o aparecimento das crises encefalopáticas (HOFFMANN et al., 1995).

Acredita-se que haja uma fase de maior vulnerabilidade para o aparecimento das crises encefalopáticas, o qual está associado a um período limitado de desenvolvimento do cérebro. Aproximadamente 90% das crianças apresentam sintomas clínicos graves antes dos 36 meses de idade, e nenhuma crise encefalopática aguda tem sido descrita após este período (HOFFMANN et al., 1996; BJUGSTAD et al., 2000).

Nos pacientes com AG-I e que apresentam as crises encefalopáticas, os sinais e sintomas que surgem são geralmente neurológicos. Entre eles podemos citar: à neurodegeneração estriatal, hipotonia, rigidez muscular, espasticidade, distonia e discinesia facial (HOFFMANN E ZSCHOCKE, 1999; STRAUSS, K. A. et al., 2003; KÖLKER et al., 2004). Além disso, podemos observar o aparecimento de convulsões, déficit cognitivo, ataxia, irritabilidade e retardo mental (KÜLKENS et al., 2005; BONEH et al., 2008; BEAUCHAMP et al., 2009).

Além dessas manifestações clínicas, os pacientes apresentam um quadro laboratorial que caracteriza-se, principalmente, por acidose metabólica, hipercetonemia, hiperamonemia, hipoglicemia, neutropenia e trombocitopenia (GOODMAN E FRERMAN, 2001).

1.3.4. Achados neuropatológicos

Patologicamente, esta acidemia é caracterizada principalmente por degeneração bilateral estriatal (caudado e putâmen) (GOODMAN et al., 1977; FUNK et al., 2005). Esta perda de neurônios estriatais ocorre logo após as crises encefalopáticas que são precipitadas por infecções, doenças febris ou mesmo vacinações rotineiras (situações nas quais o paciente se encontra em elevado catabolismo) principalmente nos primeiros 36 meses de idade (FUNK et al., 2005; HOFFMANN e ZSCHOCKE, 1999).

Além destes achados neuropatológicos, os pacientes com AG-I também apresentam atrofia frontotemporal cortical observada ao nascimento, formação espongiiforme e redução de substância branca (leucocefalopatia progressiva) (KYLLEMAN et al., 1994). Frequentemente, os pacientes apresentam um alargamento dos espaços subaracnóides que, devido à alta irrigação sanguínea, os tornam suscetíveis a hemorragias agudas (DRIGO et al., 1996; HOFFMANN e ZSCHOCKE, 1999).

1.3.5. Fisiopatologia

Embora os sintomas neurológicos sejam predominantes na AG-I, pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual o AG é neurotóxico (GOODMAN e FRERMAN, 2001). Em 1976, Stokke e colaboradores realizaram o primeiro trabalho com o intuito de explicar a fisiopatologia da AG-I. Este trabalho demonstrou uma inibição competitiva da glutamato descarboxilase, enzima que catalisa a conversão do glutamato a ácido γ -aminobutírico (GABA), na presença de AG, 3-OH-AG e ácido glutacônico, sugerindo assim, que o desequilíbrio na produção de GABA poderia estar envolvido na patogênese da AG-I. Nesse contexto, estudos mostraram que as convulsões induzidas pela injeção intraestriatal de AG (FIGHERA et al., 2006; MAGNI et al., 2012) e 3-OH-AG (DE MELLO et al., 2001) são prevenidas pelo muscimol, um agonista de receptores GABA_A. Apesar disso, concentrações reduzidas de GABA no estriado foram encontradas somente em um paciente com AG-I (LEIBEL et al., 1980).

Nas últimas décadas, distintos mecanismos têm sido propostos na tentativa de explicar a fisiopatogenia do dano cerebral na AG-I. Entre estes mecanismos podemos citar as alterações no metabolismo energético (ULLRICH et al., 1999; FERREIRA et al., 2005; LATINI et al., 2005a), a produção de espécies reativas (LATINI et al., 2002; 2005b; De OLIVEIRA MARQUES et al., 2003; FIGHERA et al., 2006) e a excitotoxicidade (DE MELLO et al., 2001; ROSA et al., 2007).

Em relação ao metabolismo energético, Silva e colaboradores (2000) mostraram que o AG inibe os complexos I-III e II-III da cadeia respiratória, diminui a produção de CO₂ e os níveis de ATP em córtex cerebral de ratos. Além disso, foi demonstrado uma inibição dos complexos I-III, II, II-III em músculos esqueléticos e cérebros de ratos tratados de forma aguda e crônica com AG (FERREIRA et al., 2005). Resultados semelhantes foram descritos também *in vitro*, além da demonstração da inibição da enzima creatina cinase em cérebro de ratos (Da C. FERREIRA et al., 2008). No que diz respeito ao 3-OH-AG, estudos mostram que este metabólito induz uma moderada inibição dos complexos II e V da cadeia respiratória, reduz significativamente os níveis de fosfocreatina em culturas de neurônios de ratos (ULLRICH et al., 1999; DAS et al., 2003) e em homogeneizados de córtex cerebral e células C6 de glioma de ratos (LATINI et al., 2005b). No entanto, um estudo em culturas neuronais de telencéfalos de embriões de pinto mostrou uma pequena inibição do complexo C somente em altas concentrações de 3-OH-AG (10 mM) sem nenhuma alteração dos outros complexos da cadeia respiratória (KOLKER et al., 2002). Estes estudos concordam em parte com um estudo realizado em partículas submitocondriais de coração bovino que não mostrou nenhum efeito do 3-OH-AG sobre os complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons (SAUER et al., 2005). Sendo assim, tem sido postulado que, principalmente, o AG pode causar interferência no metabolismo energético celular, levando provavelmente a uma redução na produção de ATP.

Também tem sido mostrado aumento na produção de radicais livres (RL) e a redução das defesas antioxidantes no cérebro de ratos com neurotoxicidade induzida por AG e 3-OH-AG (LATINI et al., 2002; 2005b; 2007; De OLIVEIRA MARQUES et al., 2003; FIGHERA et al., 2006). De acordo, foi evidenciado que o 3-OH-AG causou aumento na lipoperoxidação, na produção

de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, bem como levou a diminuição das defesas antioxidantes no córtex cerebral e estriado de ratos (LATINI et al., 2002, 2005a). Quanto ao AG, foi demonstrado que causa aumento na produção de espécies reativas e reduz as defesas antioxidantes em cérebro de ratos (De OLIVEIRA MARQUES et al., 2003), como também aumenta o conteúdo de proteína carbonil e a peroxidação lipídica no estriado de ratos (FIGHERA et al., 2006). Latini e colaboradores (2007) verificaram que tanto administração aguda quanto crônica de AG aumentou a peroxidação lipídica e diminuiu as defesas antioxidantes em diferentes estruturas cerebrais, no fígado e nos eritrócitos de ratos. De acordo, Magni e colaboradores (2012) mostraram que a exposição do AG causou aumento na geração de espécies reativas e redução na enzima glutathione peroxidase (GPx) e glutathione-S-transferase (GST), mas que o uso de um antioxidante previniu esses efeitos. Além disso, foi observada uma redução nas concentrações de glutathione reduzida (GSH) cerebral e hepática em camundongos deficientes da enzima GCDH (SAUER et al., 2005). A partir destes achados, tem sido postulado que o AG pode causar interferência no metabolismo oxidativo celular, levando provavelmente a uma redução nas defesas antioxidantes e/ou um aumento na produção de espécies reativas.

Além da interferência no metabolismo oxidativo, estudos mostraram que o AG e o 3-OH-AG possuem similaridade estrutural com o glutamato (HOFFMANN e ZSCHOCKE, 1999; WAJNER et al., 2004; GOODMAN, 2004; Figura 2), desta maneira estudos explicam a neurotoxicidade desta acidemia pela interação desses ácidos orgânicos com receptores e transportadores de glutamato.

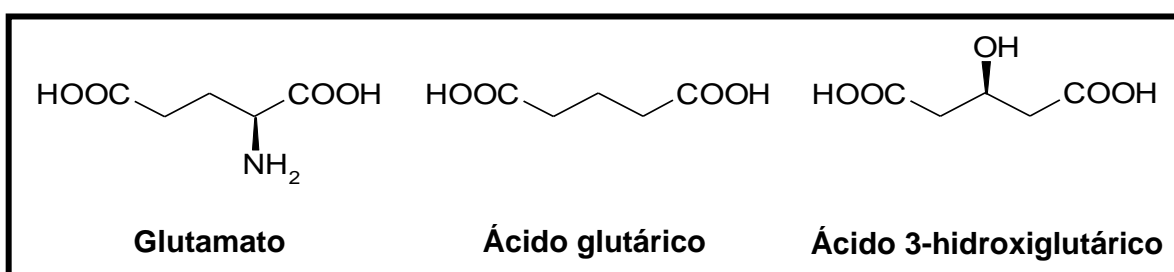


Figura 2. Similaridade estrutural entre glutamato, ácido glutárico e ácido 3-hidroxi glutárico.

Em relação ao 3-OH-GA, estudos evidenciaram que este ácido orgânico ativa seletivamente receptores do tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA) (BJUGSTAD et al., 2000). Nesse contexto, foi demonstrado que a pré-incubação de culturas de neurônios com antagonistas específicos de receptores NMDA, bem como a pré-administração desses antagonistas *in vivo* reduzem ou mesmo previnem o dano celular provocado pelo 3-OH-GA (DE MELLO et al., 2001). No entanto, Ullrich e colaboradores (1999), utilizando estudos eletrofisiológicos em diferentes sistemas celulares não encontraram evidências de que o 3-OH-AG liga-se diretamente a receptores NMDA, sugerindo que um déficit no metabolismo energético poderia explicar de modo indireto a ativação desses receptores. Desta maneira, considerando que os receptores NMDA NR1/NR2B são predominantemente expressos no cérebro imaturo (McDONALD et al., 1988) e que a ocorrência do dano neuronal depende do modelo em estudo, sugere-se a existência de uma dependência da distribuição regional e do período de desenvolvimento na suscetibilidade dos neurônios à toxicidade do 3-OH-AG (ULLRICH et al., 1999; KÖLKER et al., 2004; GOODMAN, 2004).

Quanto ao AG, foi demonstrado que este metabólito inibe a captação e a ligação do L-[³H]glutamato a seus transportadores em sinaptossomas de cérebro de ratos (MAGNI et al., 2007; 2009), aumentando assim o risco para superexcitação devido a uma elevação na concentração de glutamato na fenda sináptica. Também foi demonstrado que o AG reduz a captação de L-[³H]glutamato em vesículas sinápticas, além de interagir com receptores glutamatérgicos metabotrópicos e ionotrópicos do tipo AMPA (não-NMDA) em cérebro de ratos (PORCIÚNCULA et al., 2004). Entretanto, Kölker e colaboradores (2000) não encontraram evidências de que o AG possa interagir com receptores do tipo não-NMDA e relacionam seus efeitos tóxicos a receptores NMDA.

Por outro lado, Olivera e colaboradores (2008) demonstraram o envolvimento dos astrócitos na patogênese da AG-I. Os autores observaram que tanto o AG como o 3-OH-AG induziram a proliferação de astrócitos e causaram despolarização mitocondrial em culturas de astrócitos. Da mesma forma, verificaram que a injeção *in vivo* de AG induziu a proliferação de astrócitos, principalmente na forma imatura. Além disso, esses mesmos

autores observaram que a administração de antioxidantes preveniu a disfunção mitocondrial e o aumento da proliferação astrócitária *in vitro* e *in vivo*, sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo na indução da astrocitose. Assim, esses resultados sugerem que a disfunção mitocondrial induzida pelos metabólitos da AG-I leva os astrócitos a adotar um fenótipo proliferativo, o que pode ser fundamental para a perda neuronal e as alterações na estrutura cerebral encontradas na AG-I.

Apesar da investigação intensa e da gravidade dos sintomas apresentados pelos pacientes com AG-I, ainda não há na literatura trabalhos que relacionem as alterações fisiopatológicas com o déficit de aprendizado apresentado pelos pacientes, bem como ainda não está bem delimitado o mecanismo pelo qual o acúmulo dos ácidos orgânicos leva a neurotoxicidade.

1.3.6. Diagnóstico

Mesmo com o desenvolvimento de diversas estratégias terapêuticas para o tratamento da AG-I, o diagnóstico precoce continua sendo crucial para um melhor prognóstico para os pacientes afetados, sendo eles crianças assintomáticas, a fim de prevenir a crise encefalopática, ou indivíduos já com alterações neurológicas, nos quais uma rápida intervenção poderá minimizar os danos.

Todas as crianças que apresentem macrocefalia progressiva de etiologia desconhecida devem ser submetidas a um estudo de aminoácidos e ácidos orgânicos na urina para rastreio da AG-I, especialmente se apresentam alterações atróficas cerebrais progressivas nos exames de imagem, ou apresentam discinesia aguda ou atraso motor subagudo, acompanhado por crescente distonia (ALMEIDA, 2007).

O marcador bioquímico mais utilizado para a detecção da AG-I é a observação de quantidades elevadas de AG e 3-OH-AG nos líquidos biológicos, especialmente a urina dos pacientes (GOODMAN et al., 1977; Kolker et al., 2006) . O diagnóstico é geralmente realizado através da detecção desses compostos e seus ésteres de glicina e carnitina na urina, por cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massa (HOFFMAN, 1994; KOLKER et al., 2006). Como método auxiliar de diagnóstico, podem ser

determinados, por espectrometria de massa, o perfil de acilcarnitinas e a diminuição de carnitinas livres nos líquidos biológicos (ZIADEH et al., 1995). Em relação à análise mutacional, ela não é muito utilizada para fins de diagnóstico devido ao número muito grande de mutações conhecidas, esse tipo de análise possui maior relevância em estudos de comunidades onde a consanguinidade é elevada e para fins de pesquisa (KOLKER et al., 2006).

Apesar da existência destes métodos, a identificação desta acidemia apresenta grandes dificuldades, pois o grau de deficiência da enzima não está correlacionado com a intensidade dos sintomas apresentados pelos pacientes, e a excreção de AG pode ser normal em pacientes que apresentam sintomas graves (GOODMAN e FRERMAN, 2001).

Alguns pacientes apresentam excreção pouco elevada, intermitente, ausente ou normal de AG (HOFFMANN et al., 1996), e nesses casos a determinação da atividade da GCDH em fibroblastos ou leucócitos deve ser realizada sempre que houver fortes suspeitas clínicas e neuro-radiológicas da doença (GOODMAN e FRERMAN, 2001).

1.3.7. Tratamento

De modo geral, as medidas terapêuticas existentes objetivam prevenir principalmente as crises encefalopáticas, mas também as crises metabólicas e a progressão da degeneração neurológica.

A restrição dietética dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano, com ênfase maior para a lisina, precursores diretos dos ácidos orgânicos acumulados, é essencial para o bom prognóstico dos pacientes afetados (GOODMAN e FRERMAN, 2001). Acompanhando a restrição dietética, a suplementação com dieta hipercalórica, L-carnitina e riboflavina tem apresentado bons resultados na diminuição da toxicidade dessas substâncias e na prevenção de crises encefalopáticas (HOFFMANN et al., 1996; CHALMERS, BAIN e ZSCHOCKE, 2006). Baseado em estudos prévios em um modelo animal de AG-I, Zinnanti e colaboradores (2006) propuseram a utilização da suplementação de glicose e homoarginina a fim de reduzir o acúmulo cerebral dos metabólitos tóxicos gerados pela deficiência da GCDH.

Além disso, vários medicamentos têm sido testados e apresentaram resultados positivos no tratamento da AG-I, dentre eles estão anticolinérgicos, a toxina botulínica (BURLINA et al., 2004), anticonvulsivantes (HOFFMANN et al., 1996) e suplementação com creatina e antioxidantes (HOFFMANN e ZSCHOCKE, 1999).

Novas estratégias terapêuticas estão sendo pesquisadas a fim de prevenir as crises encefalopáticas e os danos causados pelo acúmulo dos ácidos orgânicos característicos. Além disso, na medida em que se conheçam os mecanismos exatos do dano cerebral nos pacientes com acidemia glutárica tipo I, terapias mais específicas se tornarão disponíveis.

1.4. Biomarcadores oxidativos e inflamatórios na Acidemia Glutárica tipo I

1.4.1. Estresse oxidativo e acidemia glutárica

Quimicamente, radical livre (RL) é definido como um átomo ou grupo de átomos que contém um ou mais elétrons desemparelhados (SOUTHORN e POWIS, 1988; HALLIWELL, 1989). Logo, os radicais livres podem ser formados pela adição ou pela perda de um elétron de uma substância não-radical. No entanto, existem compostos igualmente reativos aos RL que não possuem um desemparelhamento na camada de valência, e portanto não podem ser classificados como RL. Essas substâncias são classificadas como espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (DROGE, 2002). Estes, por sua vez, são compostos altamente reativos que buscam estabilidade durante sua breve existência, reagindo com a matéria circundante, desta maneira causando danos às membranas celulares, proteínas e DNA (HALLIWELL, 2012). As EROs são produzidas durante o metabolismo celular, dentre eles estão o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($^{\bullet}OH$). Níveis fisiológicos de espécies reativas (ER) podem ser eliminados por um sistema antioxidante enzimático e não enzimático (NAVARRO e BOVERIS, 2007).

No entanto, um aumento na produção de ERO e/ou uma diminuição na eficiência dos sistemas antioxidante pode levar ao estresse oxidativo, que é caracterizado por, uma oxidação de biomoléculas com consequente perda de

suas funções biológicas (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). Sies, em 1991, definiu o estresse oxidativo como uma perturbação no balanço pró e antioxidante, em favor do primeiro, levando a danos potenciais. Uma importante fonte produtora de ERO é o sistema de transporte de elétrons mitocondrial (DEL MAESTRO, 1980). O primeiro radical formado é o O_2^- , sua produção se dá principalmente no complexo I (NADH desidrogenase) e complexo III (ubiquinona citocromo c oxidase) no qual a coenzima FMN e o ubiquinol reduzem o oxigênio univalentemente, formando o O_2^- (NAVARRO; BOVERIS, 2007). A partir do O_2^- , primeiro intermediário formado a partir da redução incompleta do oxigênio, podem se formar outras ERO, como o H_2O_2 e o OH^\bullet . O H_2O_2 é produzido enzimaticamente pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) e o OH^\bullet o qual pode ser produzido a partir do H_2O_2 reagindo com cobre (Cu^{+1}) ou ferro (Fe^{+2}) na reação de Fenton, ou a partir do O_2^- reagindo com H_2O_2 na reação de Haber – Weiss (LIANG; HO; PATEL, 2000).

As células dispõem de mecanismos protetores contra as ERO, este sistema é composto principalmente pelas enzimas SOD, glutathiona peroxidase (GPx), e Catalase (CAT), além de um sistema de antioxidantes não enzimático (vitaminas A, C, E e D, e glutathiona reduzida) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995). A SOD catalisa a dismutação do O_2^- a H_2O_2 . Há dois tipos de SOD, aquelas que contém cobre e zinco no sítio ativo, e são encontradas principalmente no citoplasma, mas também nos peroxissomos, lisossomos e espaço intermembrana mitocondrial, e também aquelas que contém manganês no sítio ativo e são encontradas principalmente na matriz mitocondrial (CHANCE e SIES; BOVERIS, 1979). Outra enzima importante é a CAT que degrada o H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Ela está presente em todos os tipos de células no peroxissoma. A atividade da CAT é a principal reguladora dos níveis intracelulares de H_2O_2 (GAETANI et al., 1993). Outra forma de degradação do H_2O_2 é através da enzima GPx. Esta enzima catalisa a reação de hidroperóxidos com a GSH formando glutathiona oxidada (GSSG) e H_2O (MILLS, 1960). Fisiologicamente, a GPx funciona acoplada a glutathiona redutase (GR), que por sua vez, catalisa a redução de GSSG para GSH, utilizando NADPH como coenzima (MAIORINO et al., 1990).

A mensuração direta das espécies reativas é muito difícil, pelo fato de que essas substâncias possuem uma vida curta e sua recombinação química é

quase imediata (RICE-EVANS e BURDON, 1993). Sendo assim, a mensuração das consequências das espécies reativas é bem aceita. A determinação da formação de grupos carbonil (>C – O) é um método bastante utilizado para avaliar o dano das ERO as proteínas. Além disso, a peroxidação lipídica (LPO) é um processo fisiológico que ocorre continuamente nas membranas celulares como um fator de renovação das membranas e também para síntese de prostaglandinas e leucotrienos. No entanto, este processo pode se tornar tóxico quando as defesas antioxidantes são insuficientes ou quando há uma produção intensa de ERO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1995). A LPO produz aldeídos, gases hidrocarbonados e vários resíduos químicos, como o malondialdeído (MDA), dienos conjugados e 4-hidroxinonenal (4-HNE) (HOTZ et al., 1987). Desta forma, esta reação pode ser estimada pela medida de seus produtos, e é utilizada para medir indiretamente a produção de RL (HOTZ et al., 1987).

O cérebro é particularmente susceptível ao estresse oxidativo, uma vez que ele utiliza grandes quantidades de oxigênio comparado com outros órgãos, cerca de 20% do consumo total do nosso organismo em repouso, contém uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e de Fe^{2+} (JOVANOVIC et al., 2011). Em certas condições patológicas, a produção de espécies reativas está aumentada, e as defesas antioxidantes podem ser insuficientes para manter a homeostase redox (HALLIWELL, 1989).

O estresse oxidativo pode promover uma adaptação por parte da célula, afim de detoxificar as espécies reativas, bem como pode causar danos a alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) e até mesmo morte celular causada por necrose ou apoptose (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1995). Sendo assim, o estresse oxidativo pode representar um mecanismo fundamental envolvido em doenças humanas, como as doenças neurodegenerativas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Nesse contexto, foi mostrado que o AG aumenta a produção de espécies reativas, e reduz as defesas antioxidantes em cérebro de ratos (DE OLIVEIRA MARQUES et al., 2003). Além disso, tanto a administração aguda, quanto crônica de AG aumentou a peroxidação lipídica e diminuiu as defesas antioxidantes em diferentes estruturas cerebrais, no fígado e nos eritrócitos de ratos (LATINI et al., 2007). De acordo, Seminoti e colaboradores (2012)

mostraram, em camundongos nocautes para a enzima GCDH, um aumento na peroxidação lipídica (TBARS) e produção de radicais livres (oxidação de DCFH-DA), assim como, uma redução dos níveis de GSH e da atividade de enzimas antioxidantes no córtex e estriado desses animais.

Além disso, Fighera e colaboradores (2006) mostraram aumento nos níveis de proteína carbonil e de lipoperoxidação induzido pela administração de AG, e também diminuição da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase. De fato, esta enzima é altamente sensível ao dano oxidativo, por possuir muitos resíduos de cisteína (JAMME et al., 1995; MATALON et al., 2003).

Cabe ressaltar que a Na^+, K^+ -ATPase é a responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico celular através do transporte ativo de três íons Na^+ para o meio extracelular e dois íons K^+ para o meio intracelular, com o gasto de 1 molécula de ATP (HORISBERGER, 2004). Uma vez que a Na^+, K^+ -ATPase é crucial para a manutenção do gradiente iônico dos neurônios, é bem aceitável que uma redução na atividade dessa enzima pode prejudicar a atividade neuronal e o armazenamento da memória (VASCONCELLOS et al., 2005; LIMA et al., 2008). Estes dados estão de acordo com Moseley e colaboradores (2007) que mostraram que a supressão gênica da Na^+, K^+ -ATPase causa prejuízo ao aprendizado espacial em camundongos.

Também tem sido mostrado que, além do dano oxidativo, citocinas pró-inflamatórias, as quais são sintetizadas e liberadas por células gliais, estão envolvidas na inibição da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase (YANG et al., 2003; KREYDIYYEH et al., 2004; KREYDIYYEH e AL-SADI, 2004; LU et al., 2009).

Nesse contexto, estudos sugerem que o estresse oxidativo e o processo inflamatório podem modular a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (FIGHERA et al., 2006, MAGNI et al., 2012) e que, uma redução na atividade desta enzima, pode estar associado ao edema cerebral e a anormalidades corticais (atrofia cortical com leucodistrofia) observados nos pacientes com AG-I.

1.4.2. Marcadores inflamatórios e acidemia glutárica

O processo inflamatório compreende um conjunto de cascatas celulares e moleculares em resposta a danos teciduais cujo objetivo é preservar a homeostase do tecido. Esta resposta é mediada por inúmeras moléculas, incluindo as citocinas, quimiocinas, cininas, fatores do crescimento, óxido nítrico e EROs. Além de modular a resposta inflamatória celular, estas substâncias também auxiliam na recuperação tecidual (DAS; MOHAPATRA; MOHAPATRA, 2012). Apesar de ser necessária, a inflamação apresenta efeitos colaterais que acabam por danificar células vizinhas saudáveis, exarcebando os danos iniciais (AUFRAY, SIEWEKE e GEISSMANN, 2009).

No SNC, o termo neuroinflamação é definido por uma reação tecidual que ocorre em resposta a um evento nocivo, induzindo a um aumento na ativação das células gliais e da produção de citocinas, assim como, da cascata de ativação do complemento. Neste caso, não são observados os sinais clássicos da inflamação: rubor, dor, calor e edema, os quais estão presentes nas lesões nos tecidos periféricos (ROSALES-CORRAL et al., 2010).

Um dos acontecimentos centrais da neuroinflamação é a ativação da microglia (LOANE e BYRNES, 2010). As células da microglia expressam um conjunto de receptores que a permitem identificar e reagir a estímulos nocivos e eventos danosos (BLOCK, ZECCA e HONG, 2007). Assim, essas células reagem a esses estímulos mudando da sua forma quiescente para forma ativa fagocitária e migratória (GIULIAN et al., 1989; DAVALOS et al., 2005). Uma vez ativada, a microglia passa então a produzir citocinas e EROs, entre outros fatores inflamatórios (LU et al., 2009). Os astrócitos tornam-se rapidamente ativos em resposta a mediadores pró-inflamatórios (MYER et al., 2006) e também produzem citocinas pró-inflamatórias (DONG e BENVENISTE, 2001). As citocinas são proteínas solúveis e constituem o maior grupo de mediadores inflamatórios (CEDERBERG e SIESJO, 2010), sendo que as citocinas pró-inflamatórias são as principais responsáveis por iniciar a neuroinflamação, dentre elas estão a interleucina-1alfa (IL-1 α), interleucina-1beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (CEDERBERG e SIESJO, 2010).

A resposta inflamatória é observada em diversas patologias e insultos ao SNC, sendo esta, uma combinação de respostas agudas e crônicas das células

deste tecido a um determinado dano, podendo contribuir para a lesão tecidual, disfunção e perda neuronal ou para a regeneração e reparo deste tecido (RIVEST, 2003; DAS; MOHAPATRA; MOHAPATRA, 2012). De maneira geral, em consequência a uma lesão do SNC pode ocorrer o extravasamento de produtos sanguíneos e de componentes intracelulares, a formação de espécies reativas a ativação de células especializadas, propiciando assim o início da resposta inflamatória (JULIET, MAO, DEL BIGIO, 2008; BYE,; TURNLEY, A. M.; MORGANTI-KOSSMANN, M. C., 2012).

Na AG-I, sabe-se que os principais sintomas, incluindo as disfunções neurológicas, acontecem após as crises encefalopáticas, as quais são precipitadas por processos infecciosos, sugerindo o papel de mediadores inflamatórios nessa acidemia orgânica (STRAUSS et al., 2003; KÖLKER et al., 2006). Nesse contexto, Magni e colaboradores (2010) mostraram que o aumento de IL-1 β no estriado, induzido por lipopolissacarídeo (LPS), aumentou a susceptibilidade ao aparecimento de convulsões em ratos injetados com AG, mostrando um possível envolvimento desta citocina na disfunção neurológica presente na AG-I.

Apesar da inflamação ser um fator muito importante, talvez desencadeante, para o aparecimento das manifestações clínicas, pouco se sabe sobre o mecanismo de relação entre o acúmulo de AG, e outros metabólitos da AG-I, e mediadores inflamatórios.

1.5. Memória e Acidemia Glutárica

A memória é o processo pelo qual há a aquisição, formação, manutenção e recordação de informações (QUILLFELDT, 2009), ou seja, é a capacidade que temos de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente (LENT, 2004). A memória não é considerada uma simples entidade, mas sim, diversas entidades separadas que dependem de diferentes sistemas cerebrais que podem interagir entre si (SQUIRE e ZOLA-MORGAN, 1996).

Acredita-se que um aumento na liberação de neurotransmissores, principalmente o glutamato, seja o primeiro passo para a formação da memória (McGAUGH, 2000; McGAUCH e IZQUIERDO, 2000). Uma vez liberado, o

glutamato une-se aos receptores glutamatérgicos denominados: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA), no neurônio pós-sináptico, permitindo a entrada de íons Na^{2+} na célula, levando a despolarização. Como consequência da despolarização, o íon Mg^{2+} desobstrui o canal do receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA), que passa a responder ao glutamato, permitindo a entrada de íons Ca^{2+} na célula. Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu-R) também podem ser ativados e induzir a liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares (IZQUIERDO e MEDINA, 1995). Como consequência disso, são ativadas proteínas como a proteína cinase C (PKC), proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina II (CAMKII) e proteína cinase A (PKA), que por sua vez, ativam mecanismo intracelulares que culminam com a síntese protéica, e no aumento da transmissão de informações entre neurônios (plasticidade sináptica) (MCGAUCH e IZQUIERDO, 2000; McGAUCH, 2000). Todos esses processos estão sujeitos a modulação, inclusive por outros neurotransmissores como dopamina, noradrenalina, acetilcolina e GABA. Além disso, a formação da memória também é dependente de mudanças na eficiência sináptica que permite o fortalecimento das associações entre os neurônios, esse fortalecimento das conexões sinápticas é alcançado através de um mecanismo chamado potencialização de longa duração (LTP) (LYNCH, 2004). De fato, a LTP foi proposta como sendo a base para a consolidação da memória, e consiste em diferentes fases, envolvendo diferentes mecanismos moleculares. Primeiramente, acontece uma fase precoce (E-LTP), que dura de 2 a 3 horas e é independente de síntese protéica, enquanto que uma fase mais persistente e duradoura (L-LTP) requer síntese de novas proteínas e pode durar por um período de semanas (LYNCH, 2004).

Nesse sentido, sabe-se que a LTP pode sofrer inibição por meio de espécies reativas e citocinas pró-inflamatórias (LYNCH, 2004). Estudos apontam que o peróxido de hidrogênio inibe a LTP em CA1 *in vitro* e giro denteado *in vivo* (PELLMAR e LEPINSKI, 1993; AUERBACH e SEGAL, 1997). De acordo, Lynch (2002) mostrou uma correlação negativa entre a concentração de espécies reativas de oxigênio no hipocampo de ratos e a capacidade desses animais em sustentar a LTP. Além da modulação pelas espécies reativas, já está bem descrito que concentrações elevadas de IL-1 β também inibem a LTP (MURRAY e LYNCH, 1998; KELLY et al., 2001; LYNCH

e LYNCH, 2002) possivelmente pelo fato desta interleucina inibir a liberação de glutamato (LYNCH, 2004). Neste contexto, tem sido mostrado que LTP é prejudicada em circunstâncias nas quais as concentrações de IL-1 β no hipocampo está aumentada, como por exemplo, em ratos velhos ou estressados (MURRAY e LYNCH, 1998) e ratos tratados com LPS (VEREKER et al., 2000). Também foi mostrado que o tratamento com LPS inibiu o aprendizado espacial em ratos (SHAW, COMMINS e O'MARA, 2001).

Foram estabelecidas várias classificações para a memória, em relação ao conteúdo (declarativa ou não-declarativa), a função (memória de referência/espacial ou de trabalho), a natureza (associativa ou não) ou a motivação (recompensa ou aversiva) e em relação ao tempo (memória de curta ou longa duração) (QUILLFELDT, 2009).

Apesar de os processos de memória envolverem diversas estruturas cerebrais, durante as últimas décadas, uma forte evidência surgiu mostrando que o hipocampo é essencial para o aprendizado e para a memória (CORKIN, 2002; CORKIN et al., 1997; PIGOTT e MILNER, 1993). Estudos em humanos com dano hipocampal fornecem evidências de que essa região cerebral desempenha um papel crucial na memória espacial (ABRAHAMS et al., 1997; ASTUR et al., 2002)

Mesmo sendo o estriado a estrutura cerebral mais afetada na AG-I, estudos têm relatado que pacientes com AG-I apresentam déficit de memória (PATIL et al., 2004; BONEH et al., 2008; BEAUCHAMP et al. 2009) e sugerem o envolvimento de outras estruturas cerebrais, como o hipocampo, no atraso cognitivo observado nos pacientes com AG-I (Da C. FERREIRA et al., 2008). Patil e colaboradores (2004) utilizaram um teste psicoeducacional para diagnosticar possíveis distúrbios no aprendizado de uma criança com AG-I, e evidenciaram que o acúmulo de AG e dos demais metabólitos seriam os responsáveis pelo déficit de aprendizagem apresentado pela criança glutaricoacidêmica analisada. Outro trabalho, também com pacientes, revelou deficiência nas atividades motoras finas e diferentes níveis de anormalidades na fala (BONEH et al., 2008). Experimentalmente, apenas um trabalho mostrou que a administração crônica de AG induziu um déficit duradouro no aprendizado espacial realizado em labirinto aquático de morris (Da C. FERREIRA et al., 2008).

Considerando que o acúmulo de AG leva a um aumento nos marcadores de dano oxidativo e inflamatório, e segundo LYNCH (2004) esses danos podem estar relacionados ao déficit de memória desencadeado por diferentes patologias, terapias que tenham ação antioxidante e também diminuam marcadores inflamatórios podem ser utilizadas afim de reduzir os danos neuroquímicos, e talvez minimizar o déficit de memória.

1.6. N-acetilcisteína

A *N*-acetilcisteína (NAC) é um doador de grupos sulfidríla muito semelhante ao aminoácido cisteína, embora apresente um substituinte acetil no nitrogênio do grupo amino que reduz a reatividade do seu grupo tiol, conferindo à molécula uma menor toxicidade e menor susceptibilidade (ATKURI et al., 2007). Suas características farmacocinéticas, estimadas em humanos, indicam uma meia vida plasmática de 2,5 h e um metabolismo de primeira passagem que torna a sua forma livre totalmente indetectável no plasma 10-12 h após sua administração. A metabolização da NAC libera L-cisteína que atua como precursor direto da síntese da glutathiona reduzida (BERK et al, 2013).

Na prática clínica, a NAC tem sido usada por mais de 30 anos como mucolítico para doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) devido a sua capacidade de romper pontes dissulfeto presentes nas cadeias mucoprotéicas, diminuindo a viscosidade (DODD et al., 2008). Também é utilizada como antídoto no tratamento contra envenenamento com paracetamol, por agir como fonte de cisteínas necessárias à síntese da GSH, molécula amplamente depletada durante a detoxificação do metabólico hepático do paracetamol (ATKURI et al., 2007). Além disso, tem sido usada como protetor renal em nefropatia induzida por contraste e como agente terapêutico no tratamento de HIV (DODD et al., 2008). Há evidências recentes sugerindo que a NAC também pode ter benefícios terapêuticos em vários transtornos neuropsiquiátricos, agindo sobre o estresse oxidativo, deficiência da GSH, vias inflamatórias e modulação do glutamato e do antitransportador cistina-glutamato (BERK et al, 2013).

A NAC tem sido amplamente estudada, principalmente por sua capacidade de elevar os níveis de GSH. A GSH é um tripeptídeo formado por ácido glutâmico, glicina e cisteína e desempenha um importante papel na manutenção do balanço redox intracelular (HADDAD e HARB, 2004). Sua síntese, a partir da cisteína proveniente da NAC, envolve três passos enzimáticos ocorridos no citosol. O primeiro é a condensação entre glutamato e L-cisteína, catalizado pela enzima glutamato-cisteína ligase. No segundo passo, há conversão de um resíduo de glutamato à γ - glutamil em uma reação catalizada pela γ -glutamyl-cisteína sintetase (γ GCS), sendo este o passo limitante desta rota sintética. O terceiro e último passo é catalisado pela glutamil/glutathione sintase e converte γ -glutamyl-cisteína no tripeptídeo γ -glutamyl-cisteinil-glicina, também conhecido como GSH (HADDAD e HARB, 2004; DEAN, GIORLANDO, BERK, 2011).

A GSH é utilizada pela GPx para a conversão do peróxido de hidrogênio à água, bem como, para redução de hidroperóxidos lipídicos em seus álcoois correspondentes. Nessa reação, duas moléculas de GSH são convertidas em glutathione oxidada dissulfeto (GSSG) a qual é reciclada novamente em duas GSH por ação da enzima glutathione redutase (GR).

Além de ser um potente restaurador da GSH, estudos indicam uma ação neutralizante da NAC sobre espécies reativas produzidas durante a inflamação, propriedade que poderia alterar a modulação redox presente neste processo, e conseqüentemente, exercer efeitos antiinflamatórios (GRESSIER et al., 1993; SADOWSKA et al., 2006). Sendo assim, a NAC tem demonstrado benefícios em patologias que apresentam quadros inflamatórios associados (ZAFARULLAH et al., 2003).

Mesmo conhecendo a ação antioxidante e antiinflamatória da NAC, e sabendo que o estresse oxidativo e a inflamação possuem efeitos negativos na memória (LYNCH, 2004), torna-se plausível a investigação de um possível efeito protetor da NAC frente a um prejuízo de memória. Sendo assim, recentemente, Gonçalves e colaboradores (2010) mostraram que o tratamento crônico com a NAC preveniu a perda de memória em ratos expostos ao cádmio.

Assim, dado o elevado grau de limitação que a GA-I traz para a criança portadora desta patologia, o entendimento dos mecanismos envolvidos nas

alterações neurológicas induzidas pelo acúmulo de GA após um processo infeccioso é importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para essa patologia.

1.7. OBJETIVO

1.7.1. Objetivo Geral

Investigar se o processo inflamatório potencializa o déficit de memória presente no modelo crônico de AG-I, bem como possíveis alterações bioquímicas neste modelo. Além disso, investigar se a administração de NAC minimiza essas alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pelo AG e pelo processo inflamatório.

1.7.2. Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da administração crônica de AG e NAC, na presença ou não de LPS, nos ratos jovens em relação:

- Ao peso corporal dos ratos;
- A atividade locomotora e exploratória desses animais;
- A memória espacial no teste do labirinto de Barnes e a ansiedade pelo teste do labirinto em cruz elevado;
- Aos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) no hipocampo;
- Aos marcadores de dano oxidativo: TBARS e grupos tióis não proteicos (NPSH);
- Aos níveis de defesas antioxidantes: GSH, SOD e CAT no hipocampo;
- A atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase no hipocampo;
- Ao volume hipocampal dos animais.

2. ARTIGO CIENTÍFICO

2.1. N- acetylcysteine prevents spatial memory impairment induced by chronic early postnatal glutaric acid and lipopolysaccharide in rat pups

2.1.2. Título em português

N-acetilcisteína previne a piora da memória espacial induzida por ácido glutárico e lipopolissacarídeo em ratos jovens

2.1.2. Autores

Fernanda Silva Rodrigues, Mauren Assis Souza, Danieli Valnes Magni, Ana Paula de Oliveira Ferreira, Bibiana Castagna Mota, Andreia Machado Cardoso, Mariana Paim, Léder Leal Xavier, Juliano Ferreira, Maria Rosa Schetinger, Jaderson Costa da Costa, Luiz Fernando Freire Royes, Michele Rechia Fighera

N-Acetylcysteine Prevents Spatial Memory Impairment Induced by Chronic Early Postnatal Glutaric Acid and Lipopolysaccharide in Rat Pups

Fernanda S. Rodrigues^{1,2,5}, Mauren A. Souza^{1,2,5}, Danieli V. Magni⁷, Ana Paula O. Ferreira^{1,2,5}, Bibiana C. Mota^{1,2,5}, Andreia M. Cardoso², Mariana Paim⁴, Léder L. Xavier⁴, Juliano Ferreira², Maria Rosa C. Schetinger², Jaderson C. Da Costa³, Luiz Fernando F. Royes^{2,5,6}, Michele R. Figuera^{1,2,5,6*}

1 Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Neuropsiquiatria, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, **2** Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, **3** Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisas Biomédicas e Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, **4** Faculdade de Biociências, Departamento de Ciências Fisiológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, **5** Centro de Educação Física e Desportos, Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Laboratório de Bioquímica do Exercício (BIOEX), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, **6** Centro de Ciências da Saúde Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia and Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, **7** Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI - Campus Santiago, Santiago, Rio Grande do Sul, Brasil

Abstract

Background and Aims: Glutaric aciduria type I (GA-I) is characterized by accumulation of glutaric acid (GA) and neurological symptoms, such as cognitive impairment. Although this disease is related to oxidative stress and inflammation, it is not known whether these processes facilitate the memory impairment. Our objective was to investigate the performance of rat pups chronically injected with GA and lipopolysaccharide (LPS) in spatial memory test, antioxidant defenses, cytokines levels, Na⁺, K⁺-ATPase activity, and hippocampal volume. We also evaluated the effect of N-acetylcysteine (NAC) on these markers.

Methods: Rat pups were injected with GA (5μmol/g of body weight⁻¹, subcutaneously; twice per day; from 5th to 28th day of life), and were supplemented with NAC (150mg/kg/day; intragastric gavage; for the same period). LPS (2mg/kg; *E.coli* 055 B5) or vehicle (saline 0.9%) was injected intraperitoneally, once per day, from 25th to 28th day of life. Oxidative stress and inflammatory biomarkers as well as hippocampal volume were assessed.

Results: GA caused spatial learning deficit in the Barnes maze and LPS potentiated this effect. GA and LPS increased TNF-α and IL-1β levels. The co-administration of these compounds potentiated the increase of IL-1β levels but not TNF-α levels in the hippocampus. GA and LPS increased TBARS (thiobarbituric acid-reactive substance) content, reduced antioxidant defenses and inhibited Na⁺, K⁺-ATPase activity. GA and LPS co-administration did not have additive effect on oxidative stress markers and Na⁺, K⁺ pump. The hippocampal volume did not change after GA or LPS administration. NAC protected against impairment of spatial learning and increase of cytokines levels. NAC also protected against inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity and oxidative markers.

Conclusions: These results suggest that inflammatory and oxidative markers may underlie at least in part of the neuropathology of GA-I in this model. Thus, NAC could represent a possible adjuvant therapy in treatment of children with GA-I.

Citation: Rodrigues FS, Souza MA, Magni DV, Ferreira APO, Mota BC, et al. (2013) N-Acetylcysteine Prevents Spatial Memory Impairment Induced by Chronic Early Postnatal Glutaric Acid and Lipopolysaccharide in Rat Pups. PLoS ONE 8(10): e78332. doi:10.1371/journal.pone.0078332

Editor: Luis Eduardo M Quintas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

Received: April 25, 2013; **Accepted:** September 11, 2013; **Published:** October 24, 2013

Copyright: © 2013 Rodrigues et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The present work was supported by FAPERGS / CNPQ (grants: Pronem: 11/2082-4). The funders had the role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mrfiguera@yahoo.com.br

Introduction

GA-I is an inherited neurometabolic disease caused by a deficiency of mitochondrial enzyme glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH; EC 1.3.99.7) involved in the metabolism of L-lysine, L-hydroxylysine and L-tryptophan. Affected patients usually present a major accumulation of GA and a lesser amount of 3-hydroxyglutaric acid (3-OH-GA) and glutacnic acid in the body fluids [1-4]. The symptoms and signs of GA-I are predominantly neurological and include seizures, dystonia, dyskinesia, memory impairment, and irreversible cerebral injury, especially during crises of metabolic decompensation [5-7]. It is feasible that during these episodes, which usually follow infections or other metabolic stress conditions, the increased tissue levels of GA due to highly accelerated endogenous proteolysis may trigger molecular mechanisms leading to neurological dysfunction. In fact, affected infants may become debilitated and septic rather quickly [8], and sepsis may contribute to their neurologic deterioration.

Although the neurological disorders are prevalent in GA-I, little is known about the mechanism by which the accumulated organic acids lead to these alterations after infection process [9-11]. Memory impairment, studies have reported that patients with GA-I present cognitive deficit [5-7] mainly after encephalopathic crises precipitated by a non-specific illness or infection [10], which suggests a close association between inflammation and the occurrence of cognitive disorder in GA-I children.

In this context, studies have reported a correlation between elevated levels of proinflammatory cytokines and cognitive deficits after neuroinflammatory processes [12,13]. Moreover, a large number of cognitive disorders in humans and animal models are associated with elevated levels of proinflammatory molecules, such as IL-1 β and TNF- α [12-19].

Besides neuroinflammatory processes, oxidative stress has been also implicated as an important causative factor in various neurodegenerative and neurometabolic diseases, including glutaric acidemia [9,11,20-22]. Although the mechanisms underlying brain damage in GA-I are not well established, growing evidence suggests that excitotoxicity [23,24], Na⁺/K⁺-ATPase activity inhibition [9,20], inflammation [11], and free radical generation [9,22] play a central role in the neuropathogenesis of the GA-I.

In this context drugs with antioxidant and antiinflammatory potential could be consequently a promising approach to neuroprotection in patients with glutaric acidemia [9,11,20,22]. This seems to be the case of NAC, an agent with antioxidant and antiinflammatory properties, which inhibits oxidative metabolism and decreases the release of proinflammatory molecules [25-27]. Studies have also shown that NAC prevents memory impairment in some experimental models [28].

Since there is clinical evidence that infection and/or inflammation mediators facilitate metabolic crises and neurologic dysfunction (including cognitive impairment) in patients with GA-I, in this study we investigated the performance of rat pups chronically injected with GA and LPS in spatial memory test, antioxidant defenses, cytokines levels,

Na⁺/K⁺-ATPase activity, and hippocampal volume. Furthermore, we also evaluated whether NAC could improve these behavioral, biochemical or structural changes induced by GA and LPS administration.

Materials and Methods

Ethics Statement

Laboratory experiments were performed in accordance with national and international legislations (Brazilian College of Animal Experimentation [COBEA] and the U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals-PHS Policy) and approved by the Ethics Committee for Animal Research of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM; Permit Number: 116/2010). Indeed, animal handling and laboratory assays were carried out in such a way that all efforts were made to minimize suffering.

Reagents

Unless otherwise stated, reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Animals

The present study utilized Wistar rats with 5 days of life. Pregnant Wistar rats were housed in individual cages and left undisturbed during gestation. Forty-eight hours after delivery, litters were culled to eight male pups. Pups were fed by the mother since birth until 21 days of life when they were weaned. Animals were divided in order to have the same number of rats for each treatment in each cage. Animals had free access to water and to a standard commercial chow and were maintained on a 12:12 h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature (24 \pm 1°C, 55% relative humidity) colony room. The "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication no. 80-23, revised 1996) were followed in all experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Drugs and Injections

GA Injection. Buffered GA, pH 7.4 (5 μ mol/g of body weight⁻¹) was administered subcutaneously, twice a day, from 5th to 28th day of life to produce brain concentrations of GA around 0.6 μ mol g⁻¹, ~0.72 mM [29] similar to concentrations found in patients with GA-I. Control animals received saline subcutaneously in the same volumes and frequency. All solutions were prepared so that each animal received 10 μ L solution/g of body weight⁻¹.

LPS Injection. As GA-I patients may become debilitated after an infection process and since sepsis may contribute to their neurologic deterioration [8], the rat pups were injected intraperitoneally (I.p.) with LPS (2 mg/kg; *E.coli* 055 B5) [30,31] or vehicle (saline 0.9%), once per day, on postnatal days 25-28 to mimic a severe infection state [32].

NAC administration

Rat pups were supplemented with NAC (150mg/kg/day) or vehicle (saline 0.9%) by intragastric gavage once a day on postnatal days 5–28 [33].

Physical development

All rats used in experiments had their behavioral development assessed. For this, the weight of animals was daily determined at the appropriate ages by one experimenter who was not aware of the subject condition.

Cognitive tasks

Behavioral experiments were carried out between 9:00 am and 2:00 pm. Animals were assessed on the Barnes maze on postnatal days 29–32. After Barnes maze test, animals were tested in the open field task on postnatal day 32.

Barnes Maze task

The next day after the end of treatment animals were trained to solve the Barnes maze. The Barnes maze is a validated test often used for the assessment of spatial learning and memory in rodents [34]. The Barnes maze paradigm exploits the natural inclination of small rodents to seek escape to a darkly lit sheltered environment when placed in an open arena under bright and aversive illumination. Our maze consists of a 120 cm diameter circular wooden table, 3.5 cm thick and elevated 90 cm above the floor.

Twenty holes (6 cm diameter) were equidistantly located around the perimeter and centered 5 cm from it. The apparatus was located in a 4 m x 4 m test room where four visuospatial cues made of rigid black paper (rectangle, circle, cross, and triangle) were affixed to the walls but not directly over any maze hole; this increases the spatial component of the Barnes maze during training [35]. A black wooden escape tunnel (15 cm x 10 cm x 30 cm) was placed beneath one randomly selected hole for each rat but remained constant throughout the training sessions for a given rat. The remaining 19 holes led only to a false escape box (15cm x 10cm x 10cm), which from the platform, appeared indistinguishable from an escape box but was too small to be entered. False boxes removed visual cues that might be observed through an open hole. There was a bright illumination of 300 lux over the maze.

On the first day of the experiment the rats were moved to a testing room and left undisturbed for 60 min. Following this habituation period the rats were trained to find the escape hole. They were placed in the escape box for 1 min and then into a cylindrical opaque chamber (start box) in the center of the maze. With light on, the start box was removed and the rats were allowed to explore freely and find the escape box. The maximum time allowed to find the escape was 180 s. Each rat was given three trials per day over four consecutive days. In each trial we recorded the time to reach the escape tunnel and the number of wrong holes visited. A visited hole was considered when the animal poked at a hole. The arena and the boxes were wiped clean using distilled water both between each training session for a given rat and between each rat. Immediately after the second training session on the

Barnes maze, animals were transferred to an open-field measuring 60 x 60 cm, with the floor divided into 12 squares measuring 12 x 12 cm each. The open-field test was carried out to identify motor disabilities and lasted for 5 min. During this time an observer who was not aware of pharmacological treatments recorded the number of crossing and rearing responses manually.

Open-field task

After the fourth day of Barnes maze test the locomotor activity was measured for 5 min in the open field. The apparatus consisted of a wooden box measuring 60 cm x 40 cm x 50 cm with a glass front wall. Its floor was divided by black lines into 12 equal squares. Animals were gently placed facing the rear left corner of the arena and the number of squares crossed with the four paws recorded for 5 min to evaluate motor activity [36]. The testing room was dimly illuminated with indirect white lighting.

Elevated plus maze task

Based on the design of File and Gonzalez [37] the maze consisted of two opposite closed arms (30 cm x 5 cm) enclosed with walls (15 cm in height) and two opposite open arms (also 30 cm x 5 cm, without edges) forming a plus shape. The whole apparatus had a central arena (5 cm x 5 cm) and was elevated to 80 cm above the floor by a tripod. Each rat was placed in the central arena of the maze facing an open arm and observed for 5 min. The behaviors recorded were: total number of entries, the percentage of time spent on either arm, and percentage of time spent in the middle. The apparatus was cleaned thoroughly between the 5 min observation sessions with a 30 % ethanol solution.

Sample processing

After the behavioral evaluation (second day of Barnes Maze test), a subset of animals was killed by decapitation, and hippocampi were rapidly removed, dissected and homogenized in 1-ml sterile PBS, and then stored at -70 °C until processed further.

IL-1 β and TNF- α Immunoassay

To analyze the content of IL-1 β and TNF- α the hippocampus was weighted and homogenized (1:10) in a solution containing bovine serum albumin (BSA 10 mg/ml), EGTA (2 mM), EDTA (2 mM) and PMSF (0.2 mM) in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) using a Potter homogenizer. The hippocampus homogenate was centrifuged (3000 g for 10 min) and cytokines were determined in supernatant. Cytokine levels were measured using a commercially available ELISA Kit from R&D Systems (Minneapolis, MN) using an antibody selective against rat IL-1 β or TNF- α , according to the manufacturer's protocol. Results are expressed in pg/mg of protein for hippocampus homogenate assays. Absorbance was read at 405 nm. The detection limit was 4 ng/ml.

Measurement of TBARS content

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) content was estimated in a medium containing 0.2 ml of brain homogenate, 0.1 ml of 8.1% SDS, 0.4 ml of acetic acid buffer (500 mM, pH 3.4), and 0.75 ml of 0.81% (TBA). The mixture was finally made up to 2 ml with type I ultrapure water and heated at 95 °C for 90 min in a water bath using a glass ball as a condenser. After cooling to room temperature, absorbance was measured in the supernatant at 532 nm [38].

Non Protein Thiol determination

Non Protein Thiols (NPSH) were measured spectrophotometrically with Ellman's reagent [39]. An aliquot of 200 μ L for hippocampus in a final volume of 900 μ L of solution was used for the reaction. The reaction product was measured at 412 nm after the addition of 10 mM 5-5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (0.05 mL). A standard curve using cysteine was added to calculate the content of thiol groups in the samples, and was expressed as μ mol SH/mg tissue.

Catalase activity determination

For the catalase (CAT) assay in hippocampus, the tissue was homogenized in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, at a proportion of 1:9 (w/v) and 1:5 (w/v), respectively. The homogenate was centrifuged at 2000 g for 10 min to yield a supernatant that was used for the enzyme assay [40]. The reaction mixture contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7), 10 mM H_2O_2 , and 20 μ L of the supernatant. The rate of H_2O_2 reaction was monitored at 240 nm for 2 min at room temperature as determined in total blood assay. The enzymatic activity was expressed in units mg⁻¹ protein (One unit of the enzyme is considered the amount of CAT which decomposes 1 μ mol of H_2O_2 per min at pH 7 at 25 °C.)

Superoxide dismutase activity determination

With the purpose of performing the superoxide dismutase (SOD) assay in hippocampus, the tissue was adequately diluted with Tris-HCl pH 7.4 at a proportion of 1:40 (w/v) and 1:80(w/v) respectively [41]. Briefly, epinephrine undergoes auto-oxidation at pH 10.2 to produce adrenochrome, a colored product that was detected at 480 nm. The addition of samples (10, 20, 30 μ L) containing SOD inhibits the auto-oxidation of epinephrine. The rate of inhibition was monitored for 180 s. The amount of enzyme required to produce 50% inhibition was defined as one unit of enzyme activity.

Glutathione levels

The levels of glutathione (GSH) were determined fluorometrically as described by Hissin and Hilf [42] with minor modifications using O-phthalaldehyde (OPA) as fluorophore. Briefly, the hippocampus was homogenized in 0.1M $HClO_4$. Homogenates were centrifuged at 2500 g for 10 min and the low-speed supernatants were separated for measurement of GSH. The supernatant (100 μ l) was incubated with 100 μ l of OPA (0.1% in methanol) and 1.8 ml of 0.1M phosphate buffer (pH 8.0) for 15 min at room temperature in the dark. Fluorescence was measured with a fluorescence

spectrophotometer at excitation wavelength of 350 nm and at emission wavelength of 420 nm. GSH levels were expressed as nmol GSH/mg of tissue.

Na⁺, K⁺-ATPase activity measurements

The Na⁺/K⁺-ATPase activity was measured according to Wyse et al.[43]. Briefly, the assay medium consisted of 30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4; 0.1 mM EDTA, 50 mMNaCl, 5 mMKCl, 6 mM MgCl₂, and 50 μ g of protein in the presence or absence of ouabain (1 mM) in a final volume of 350 μ L. The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate to a final concentration of 5 mM. After 30 min at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 70 μ L of 50% (w/v) trichloroacetic acid. Saturating substrate concentrations were used, and the reaction was linear with protein and time. Appropriate controls were included in the assays for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified by the colorimetric method described by Fluke and Subbarow [44] using KH_2PO_4 as reference standard. Specific Na⁺/K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed in nmol Pi/mg protein/min.

In a separate set of experiments we investigated whether some Na⁺/K⁺-ATPase isoform is selectively inhibited. For this purpose we used a classical pharmacological approach based on the isoform-specific sensitivity to ouabain [45]. We determined whether some treatments inhibited ouabain-sensitive ATPase activity using 3 μ M (that inhibits Na⁺/K⁺-ATPase isoforms containing α 2 and α 3 subunits) or 4 mM ouabain (that inhibits all isoforms).

Hippocampal Volume

Considering that hippocampus cannot act as a unitary structure and that dorsal portion is related to learning processes and memory [93], we decided to investigate the effect of GA, LPS and NAC treatment on the volume of dorsal hippocampus. In our study the dorsal hippocampus was defined as the hippocampus comprised between the following Paxinos and Watson atlas coordinates: Bregma -1.60mm/ Interaural 7.40mm; Bregma -3.8mm/Interaural 5.2mm. We analyzed this hippocampal region because it is deeply associated to learning and memory processes and presents well defined anatomical limits, being suitable to unbiased volume estimation using Cavalieri principle. For this purpose, after the behavioral evaluation (second day of Barnes Maze test), a subset of animals was deeply anesthetized with thiopental (40 mg/kg, i.p.) and transcardially perfused with saline solution followed by a solution of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. After perfusion, the brains were removed from the skulls, post-fixed in the same solution at room temperature for 24 h and cryoprotected by immersion in 30% sucrose solution in phosphate buffer at 4 °C until they sank. After these procedures, the brains were quickly frozen in isopentane, previously cooled in liquid nitrogen (-70°C). For each brain, coronal sections from the hippocampus (60 μ m) were obtained using a cryostat (Leica CM 1850) at -20° C and mounted on gelatinized slides. These sections were identified according to Paxinos and Watson's Atlas (coordinates:

interaural 7.2 mm, bregma -1.8 mm and interaural 5.4 mm, bregma -3.6 mm). Slides were hydrated in decreasing ethanol solutions (absolute, 80%, 70%) and distilled water. They were placed in cresyl violet solution acidified 0.01% for approximately 1 min. Then, they were dehydrated in increasing alcohol solutions (70%, 80% absolute) and cleared in xylene, and finally covered with coverslips with entellan resin.

Volume estimation of dorsal hippocampus

Sections of dorsal hippocampus were digitized using an Olympus BX50 microscope coupled to a Motic Images Plus 2.0 camera and Image Pro Plus Software 6.1 (Media Cybernetics, CA, USA). The unbiased volume estimation of the dorsal hippocampus was performed using the Cavalieri principle associated to the counting point method. The volume was estimated using the following equation: $V = T \cdot a/p \cdot \Sigma P$, where, V = Volume estimation; T = Distance between the analyzed sections (240 μ m); a/p = point area (1 mm²) and ΣP is the sum of points overlaid in the image [46–48]. Two histology specialists blinded to the source of the images carried out the volume estimations.

Protein determination

Protein content was measured colorimetrically by the method of Bradford [49] using bovine serum albumin (1 mg/ml) as a standard.

Statistical Analysis

The statistical analysis was carried out by two or three-way analysis of variance (ANOVA) and only F values of $P < 0.05$ are presented. Post hoc analysis was carried out by Duncan's multiple comparisons test, when appropriate. All data were expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed utilizing the SPSS software in a PC-compatible computer.

Results

Physical Development of Animals

The physical development of animals determined by their weights during the treatment is shown in Figure 1A and 1B. Statistical analysis of the weight of animals (three-way ANOVA) did not show a significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction: $[F(1,57) = 0.46; p > 0.05]$.

Effect of NAC on Open field task

The exploratory and locomotor activity of animals is shown in Figure 2. Statistical analysis of the number of crossing and rearing (three-way ANOVA) did not show a significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction: $[F(1,57) = 1.00; p > 0.05]$; Figure 2A and $[F(1,57) = 1.00; p > 0.05]$; Figure 2B; respectively).

Effect of NAC on Spatial Memory

The effect of GA and LPS treatment on cognitive performance is shown in Figure 3B. Statistical analysis

demonstrated that all the animals $[F(1,57) = 14.33; p < 0.001]$ decreased the latency to escape indicating that they have learned the task.

In addition, statistical analysis of the latency to escape revealed that GA and LPS co-administration potentiated the memory impairment in the Barnes task $[F(1,57) = 27.85; p < 0.001]$. On the other hand, statistical analysis (three-way analysis of variance (ANOVA) revealed a significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction on the second $[F(1,57) = 5.28; p < 0.05]$ and third days of test $[F(1,57) = 3.95; p < 0.05]$; Figure 3A), indicating a decreased performance of these animals in this spatial learning paradigm. These results revealed that NAC administration decreased the latency to escape induced by GA and LPS co-administration. Considering that GA, LPS and NAC presented effects mainly on the second day of spatial memory testing, the next experiments carried out were limited to 2 days.

Effect of NAC on anxiety

Statistical analysis of the percent of time and entries in open arm in the elevated plus maze (three-way ANOVA) did not show a significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction: $[F(1,57) = 0.43; p > 0.05]$ and $[F(1,57) = 0.27; p > 0.05]$, respectively]. In addition, statistical analysis (three-way ANOVA) did not show a significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction for percent of time $[F(1,57) = 0.85; p > 0.05]$, number of entries into the enclosed arm $[F(1,57) = 0.34; p > 0.05]$ and time spent on middle $[F(1,57) = 0.34; p > 0.05]$, indicating that the treatment had no effect on anxiety-like behavior (Table 1).

Effect of NAC on IL-1 β and TNF- α levels

Since numerous studies have found a link between elevated levels of cytokines and memory deficits after neuroinflammatory processes [12,13], we decided to determine the levels of IL-1 β and TNF- α in hippocampus of rat pups.

TNF- α levels in the hippocampus are shown in Figure 4A. The statistical analysis (two-way ANOVA) revealed an increase in TNF- α levels induced by GA $[F(1,44) = 22.83; p < 0.001]$ and LPS $[F(1,44) = 14.93; p < 0.001]$ when compared with de control group. Statistical analysis (two-way ANOVA) also revealed an increase in IL-1 β levels induced by GA $[F(1,42) = 38.86; p < 0.001]$ and LPS $[F(1,42) = 26.15; p < 0.001]$ when compared with the control group (Figure 4B). The GA and LPS co-administration had no additive effects in TNF- α $[F(1,44) = 0.13; p > 0.05]$ levels. However, this treatment potentiated the increase of IL-1 β levels $[F(1,42) = 0.01; p > 0.05]$ in the hippocampus of rat pups.

Furthermore, Figure 4 (A and B) shows NAC effect on TNF- α and IL-1 β levels in hippocampus of rat pups. Statistical analysis (three-way ANOVA) revealed that NAC administration reduced TNF- α levels [significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction: $F(1,44) = 3.7; p < 0.05]$ and IL-1 β levels increase [significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction: $F(1,44) = 5.73; p < 0.05]$, respectively] induced by GA and LPS in the hippocampus of rat pups.

Physical development of animals

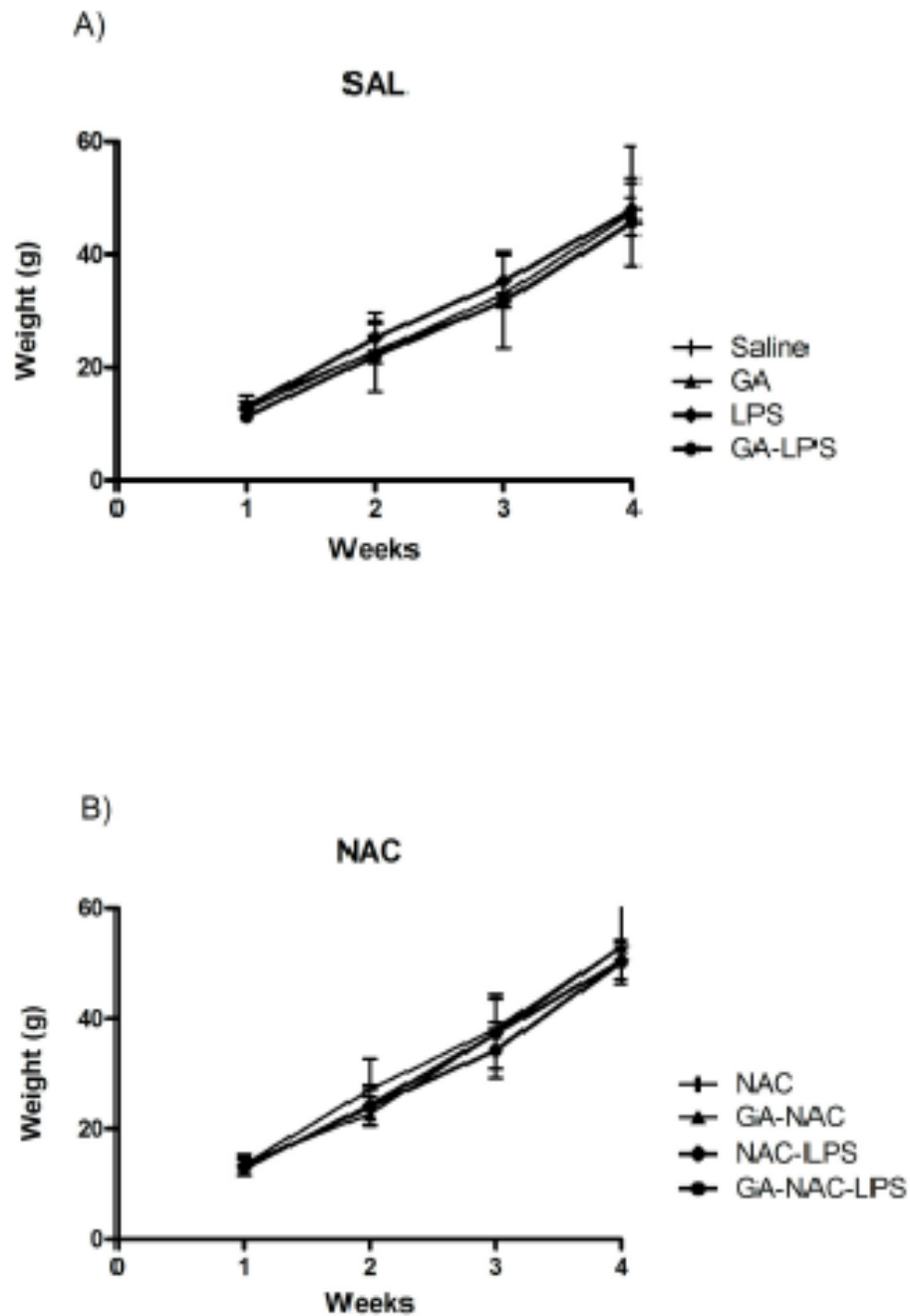


Figure 1. Effect of early postnatal chronic GA, NAC and LPS administration on physical development of animals. Data are presented as means \pm S.E.M. for $n = 8-9$ in each group. No significant differences between groups were detected.

doi:10.1371/journal.pone.0078332.g001

Open field Task

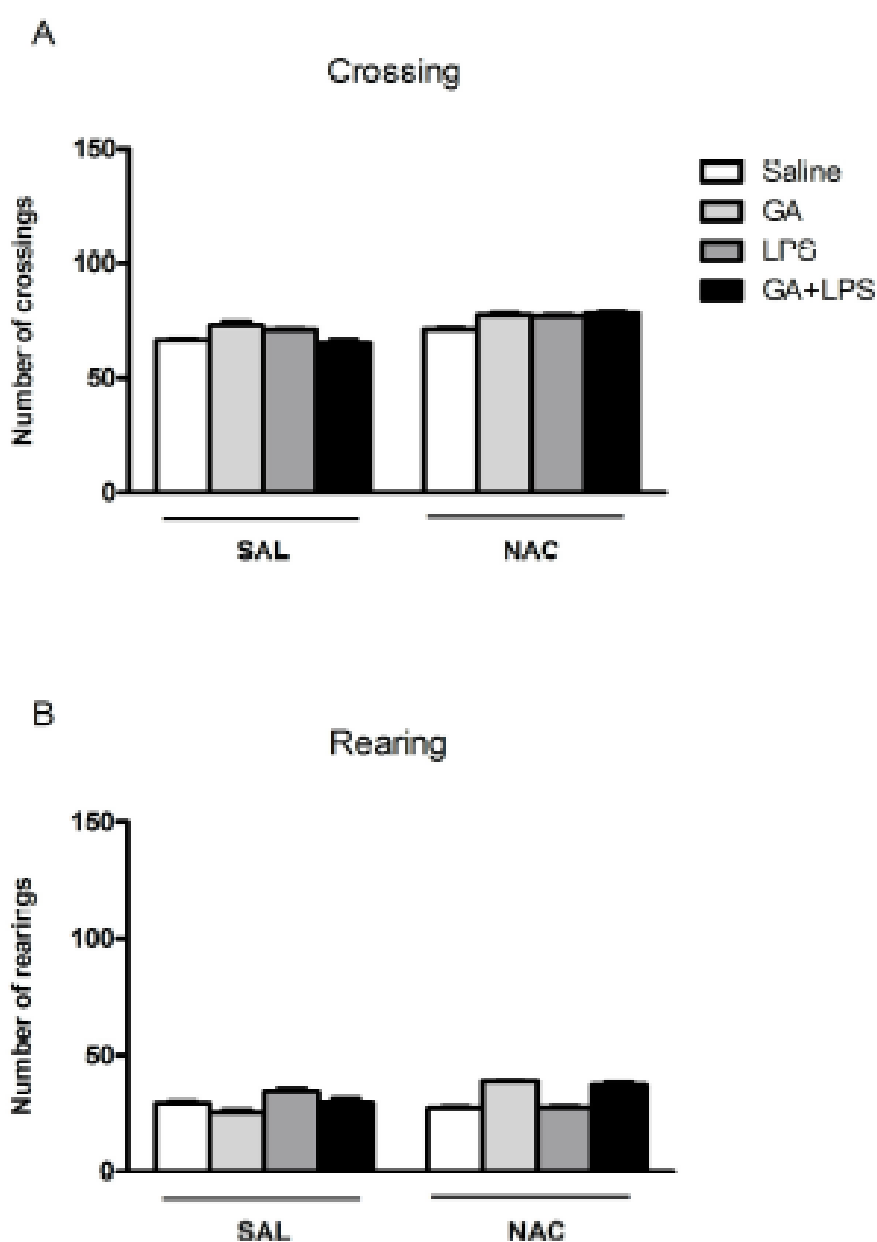


Figure 2. Effect of early postnatal chronic GA, NAC and LPS administration on the number of crossing (A) and rearing (B) of the animals. Data are presented as means \pm S.E.M. for $n = 8-9$ in each group. No significant differences between groups were detected.

doi:10.1371/journal.pone.0078332.g002

Barnes Arm Maze

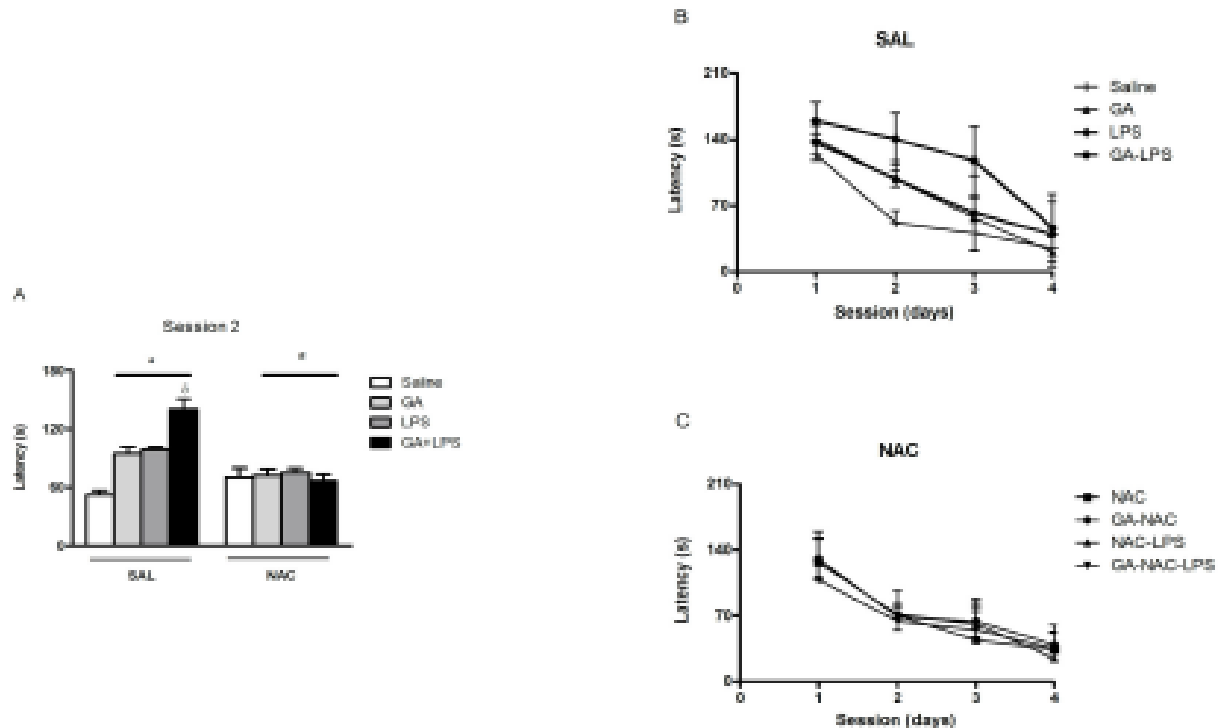


Figure 3. NAC prevents the memory deficit induced by GA and LPS measured as escape latency of rat pups in the Barnes maze. * $P < 0.05$ compared with saline treated group, $^{\#}P < 0.05$ compared with respective control group and $^{\Delta}P < 0.001$ compared with GA-treated group (Duncan's multiple comparisons test). Data are presented as means \pm S.E.M. for $n = 7-9$ in each group. Figures 3B and 3C show an amplification of the second day of test.

doi:10.1371/journal.pone.0078332.g003

Effect of NAC on Antioxidant Defenses

TBARS content. Statistical analysis on TBARS content (three-way ANOVA) showed a significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction: [$F(1,48)=4.32$; $p < 0.05$] (Figure 5). Post hoc analysis showed that the GA and LPS administration increased TBARS content and that systemic NAC administration prevented the GA and LPS-induced TBARS content increase.

NPSH content. Statistical analysis on SH content (three-way ANOVA) showed a significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction: [$F(1,44)=6.9$; $p < 0.05$] (Figure 6A). Post hoc analysis showed that the GA and LPS administration decreased SH content and that systemic NAC administration prevented this effect.

Glutathione levels. Statistical analysis on GSH levels (three-way ANOVA) showed a significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction: [$F(1,48)=32.62$; $p < 0.001$] (Figure 6C). Post hoc analysis showed that the GA and LPS administration decreased GSH

levels and that systemic NAC administration prevented this effect (Figure 6B).

CAT activity. Statistical analysis on the CAT activity (three-way ANOVA) showed a significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction: [$F(1,48)=14.5$; $p < 0.001$] (Figure 6C). Post hoc analysis showed that the GA and LPS administration decreased CAT activity and that systemic NAC administration prevented this effect.

SOD activity. Statistical analysis on the SOD activity (three-way ANOVA) showed a significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction: [$F(1,25)=11.90$; $p < 0.001$] (Figure 6D). Post hoc analysis showed that the GA and LPS administration decreased SOD activity and that systemic NAC administration prevented this effect.

Table 1. Effect of early postnatal chronic GA, NAC and LPS administration on anxiolytic-like behavior of rat pups on the second day of Barnes.

Group	Sal	GA	LPS	GA-LPS	Sal	GA	LPS	GA-LPS
	SAL				NAC			
%T.O	8.5 ± 1.9	8.11 ± 2.5	14.4 ± 2.3	7.3 ± 3.7	7.07 ± 2.3	14.2 ± 4.2	13.9 ± 4.2	17.5 ± 6.0
%No.E.O	30.8 ± 4.7	28.6 ± 2.4	25.0 ± 5.9	28.3 ± 6.7	30.1 ± 4.3	35.2 ± 8.0	29.8 ± 7.9	31.0 ± 5.9
%T.E	62.2 ± 3.0	64.5 ± 4.6	76.0 ± 3.8	62.0 ± 5.0	60.9 ± 1.76	63.9 ± 9.0	76.5 ± 5.2	67.7 ± 6.0
%No.E.E	66.0 ± 4.7	73.2 ± 2.4	74.8 ± 5.9	71.6 ± 6.7	69.8 ± 4.3	64.7 ± 8.0	70.1 ± 7.9	68.9 ± 5.9
%T.M	8.9 ± 1.5	9.1 ± 2.7	10.7 ± 2.0	10.4 ± 2.4	7.7 ± 1.2	21.6 ± 6.4	9.4 ± 2.9	13.9 ± 2.3
N	8	7	7	7	7	7	7	7

Data are presented as means ± S.E.M. for n = 7-8 in each group. No significant differences between groups were detected. %T.O percent of time spent on open arms; %No.E.O percent of number of entries on open arms; %T.E percent of time spent on closed arms; % No.E.E percent of number of entries on enclosed arms; %T.M percent of time spent on the middle.

doi: 10.1371/journal.pone.0078332.t001

Effect of NAC on Na⁺, K⁺-ATPase activity

Statistical analysis (two-way ANOVA) showed that GA [F(1,56)=4.91; p <0.05] inhibited Na⁺,K⁺-ATPase activity but LPS did not potentiate this effect. Statistical analysis (three-way ANOVA) revealed that NAC administration attenuated the decrease Na⁺,K⁺-ATPase activity [significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction: [F(1,56)=4.07; p <0.05] induced by GA and LPS (Figure 7A).

We also investigated whether GA and LPS could inhibit selectively some isoform of Na⁺,K⁺-ATPase. For this purpose we used a classical pharmacological approach based on the isoform-specific sensitivity to ouabain [45]. Statistical analysis (three-way ANOVA) revealed that NAC administration protected against the decrease Na⁺,K⁺-ATPase (α1-subunit) activity [significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction: [F(1,56)=4.50; p <0.001] induced by GA and LPS (Figure 7B).

Effect of treatments on Hippocampal volume

Figure 8 shows that there was no difference between groups concerning hippocampal volume of rat pups. Statistical analysis of hippocampal volume (three-way ANOVA) did not show a significant drug (Saline or GA) by toxin (Saline or LPS) by treatment (Sal or NAC) interaction: [F(1,38)= 0.08; p> 0.05]. Figure 9 shows a representative figure of dorsal hippocampus of all treatments.

Discussion

Patients with GA-I usually present acute clinical features early in life resulting from metabolic decompensation with respiratory distress and neurological symptoms, including psychomotor delay, irritability, lethargy, hypotonia, convulsions, and coma. Most children survive to the first acute metabolic crisis, but develop long-term complications including neurological [5-7]. Although it is believed that these abnormalities occur as a result of the primary metabolic impairment, the underlying mechanism of brain damage and neurological deficits in GA-I is poorly understood.

It is known that patients and experimental models of this IEM exhibit neuronal damage and changes in several areas of the central nervous system, as well as in several other neurological diseases [8,10,12,13]. This is often related to oxidative stress and neuronal death, causing cognitive impairment and neuroinflammatory processes [9-13-19-22]. A recent study in an experimental model has elucidated the role of inflammatory mediators in model of acute seizures by GA [11]. However, it is not known if GA itself may increase these mediators and if they are related with memory deficit.

This current study was carried out with young rats in a period of development with proven synaptogenesis and cell proliferation in several brain structures involved in learning and memory. We found that the chronic GA administration (5th - 28th day of life) at doses that raise its concentration in blood and in the brain [29] and LPS injection cause memory deficits in spatial recognition, decrease antioxidant defenses, and induce increased levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1β and TNF-α) in the hippocampus. In addition, an increasing oxidative markers and consequent inhibition of the Na⁺, K⁺-ATPase activity, without modifying hippocampal volume was observed.

It is important to observe that chronic GA, LPS or NAC administration had no effect on body weight, implying that chronic injection did not cause malnutrition in animals (Figure 1). Similarly, the same treatments did not change rat performance in the open field task as observed by a number of rearing and crossing at the testing session (Figure 2). In addition, these treatments did not change the behavior of rat pups in the elevated plus maze task, indicating that GA, LPS and NAC were not anxiogenic (Table 1).

As regards to the behavior of rat pups, we observed that LPS potentiated the deficit of spatial learning induced by GA (Figure 3 A-C). This result suggests that early chronic postnatal administration of GA caused a long-standing deficit in spatial learning probably secondary to GA-induced brain dysfunction [29], which was potentiated by an inflammatory insult. In fact, studies have suggested that neonatal inflammation causes cognitive impairment in humans and experimental models [53-55]. Taken together, we can suggest that the potentiation of cognitive deficit induced by GA neonatal administration after inflammatory insult could be involved with the cognitive dysfunction presented in GA-I children [5-7], since these patients frequently develop neurological dysfunction after an infectious process [50-56].

In line of this view, our data revealed that spatial learning deficit induced by GA and LPS was associated with an

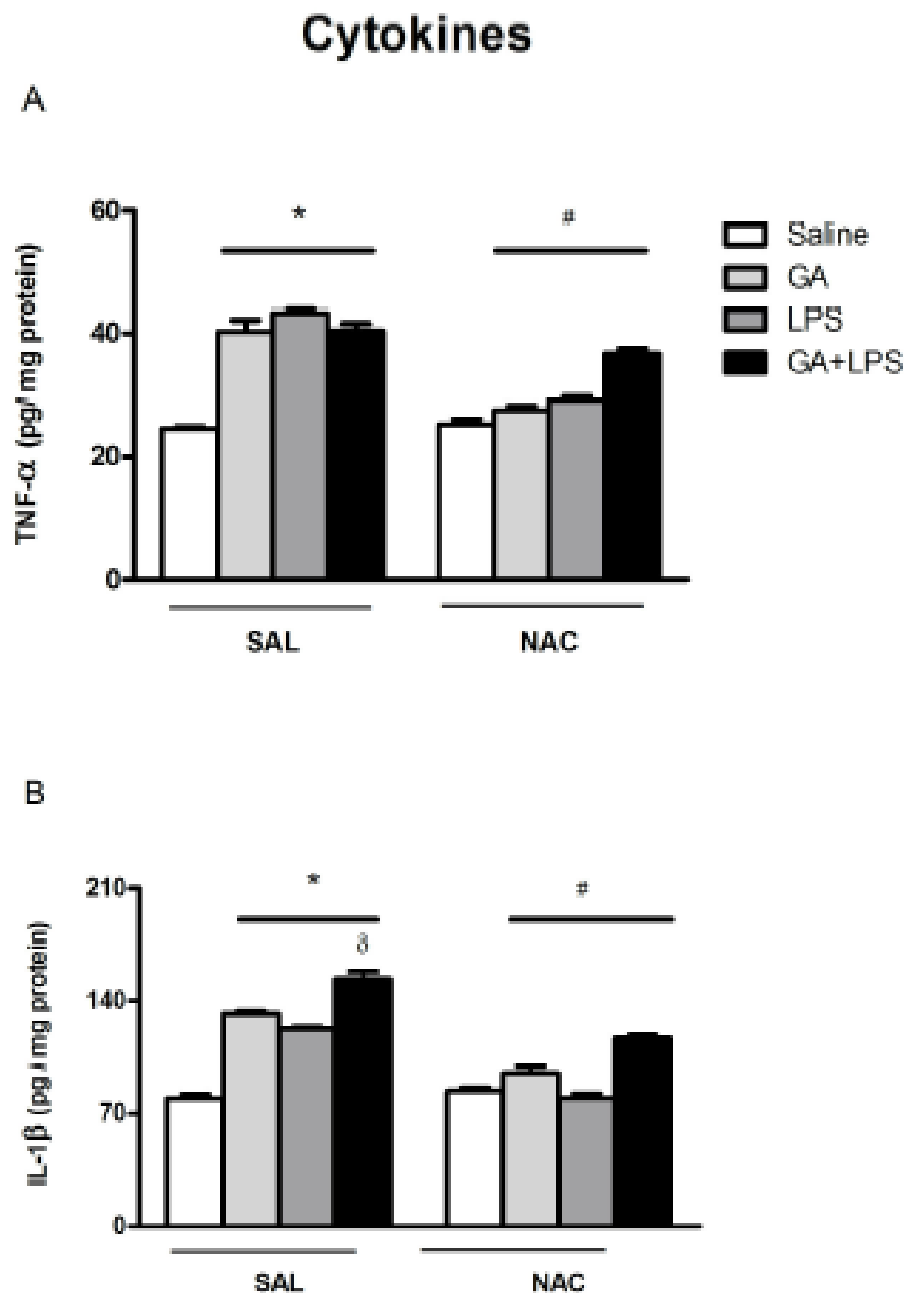


Figure 4. Effect of early postnatal chronic GA, NAC and LPS administration on cytokine levels on the second day of Barnes maze. NAC prevented the increase in TNF- α (A) and IL-1 β (B) levels. * $P < 0.001$ compared with saline treated group, # $P < 0.001$ compared with the respective control group and * $P < 0.05$ compared with GA-treated group (Duncan's multiple comparisons test). Data are presented as means \pm S.E.M. for $n = 6-7$ in each group.
doi:10.1371/journal.pone.0078332.g004

increase of proinflammatory cytokine levels such as TNF- α and IL-1 β (Figure 4A and B), and that the co-administration of these

compounds potentiated IL-1 β levels in the hippocampus of rat pups (Figure 4 B). It is important to note that the cytokines such

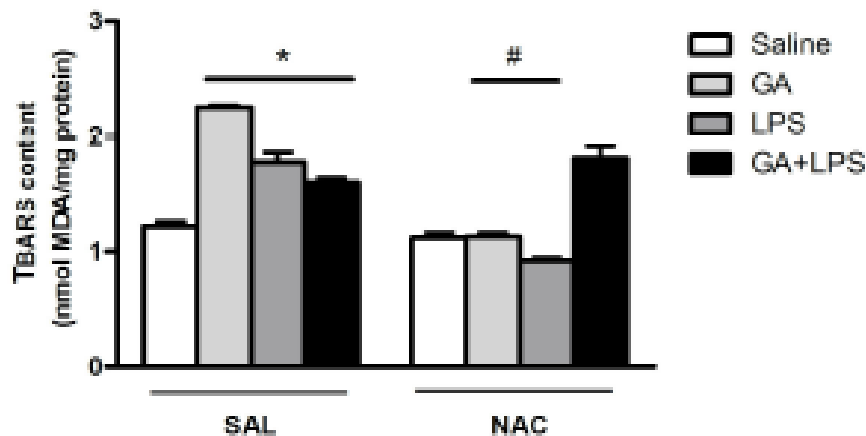


Figure 5. Effect of early postnatal chronic GA, NAC and LPS administration on TBARS content. NAC prevented the increase of TBARS content induced by GA and LPS. * $P < 0.01$ compared with saline treated group and # $P < 0.05$ compared with respective control group (Duncan's multiple comparisons test). Data are presented as means \pm S.E.M. for $n = 7$ in each group.

doi:10.1371/journal.pone.0078332.g005

as IL-1 β and TNF- α are primarily synthesized and released by glial cells that can be activated by trauma, infection or the presence of endogenous yet abnormal protein aggregates [57,58]. Since the activation of microglia produces a variety of inflammatory mediators [59] and the exposure to GA activates glial cells [22], it is plausible to propose that the increase of cytokine levels induced by GA may be due to glial activation and that LPS potentiated this effect mainly by increasing IL-1 β levels (Figure 4B).

Current evidence indicates that cytokines, particularly IL-1 β , increase neuronal excitability by activating IL-1 receptors [64]. The neuronal IL-1R1 stimulation induces Src kinase-mediated tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit in N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. As a consequence, IL-1 β facilitates NMDA receptor-mediated Ca²⁺ influx into neurons, promoting excitotoxicity [102]. Considering that IL-1 β can also inhibit glutamate uptake in astrocytes [67] and increase its glial release possibly via TNF- α production [64], the increase of pro-inflammatory cytokines may result in elevated extracellular glutamate levels and toxicity in this model of organic acidemia. In agreement of this view, a considerable body of evidence has demonstrated that glutamate receptor modulation can lead to GA-induced toxicity [9,11,20,21]. Furthermore, the administration of LPS can also impair memory and elevate hippocampal IL-1 β levels [64] by increasing the GABAergic inhibition [55,66].

Since synaptic neurotransmission changes induced by cytokine may result in memory impairment [66,67], the actions of GA and LPS in neurotransmission [64] could potentiate the cognitive deficit observed in this study. In agreement to this, it has been observed in post mortem brain of GA-I patients pronounced reactive hypertrophic astrocytes with chronic astrogliosis and reactive microglia [60-63].

Furthermore, TNF- α and IL-1 β act in their respective receptors and cause activation of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF κ B), a transcription

factor that migrates to the cell nucleus and can promote elevated concentrations of intracellular calcium as well as a production of NO and H₂O₂ increase [95,96]. NO is a free radical that when reacting with superoxide anion (O₂⁻), also formed during the inflammatory process by enzymes such as NADPH oxidase) generates the highly reactive peroxynitrite (ONOO⁻) [97]. These free radicals induce a nitrosative/oxidative stress that may result in DNA damage, increase of lipid peroxidation and impaired antioxidant defenses [71,72].

Interestingly, we revealed that GA and LPS administration increased TNF- α and IL-1 β levels as well as increased lipid peroxidation and impaired antioxidant defenses in the hippocampus of rat pups. Regarding the antioxidant defenses, the concentrations of GSH, which is the major brain antioxidant, were reduced in the hippocampus of the animals that received GA and LPS. Considering that GSH is an effective scavenger of free radicals [68] and that a disruption of GSH system homeostasis by neuroinflammation [97] may result in oxidative injury in sensitized neurons [69,70], reduced GSH levels in hippocampus caused by GA and LPS administration may be at least in part involved in the memory deficit observed in these rat pups. Furthermore, GA and LPS decreased GAT and SOD activities in the hippocampus (Figure 6C-D), suggesting that the reduction of GAT and SOD activities did not present a compensatory mechanism in response to the increased formation of reactive species. In fact, oxidative stress accompanies inflammatory processes [73] and patients with GA-I frequently develop cognitive damage during and after infections associated with inflammation and with a potential increase of tissue concentrations of GA [52,74]. Also, reactive astrogliosis, a characteristic feature of neuroinflammation, is often found in brain GA-I patients [60-63].

Considering that GA, inflammatory mediators and oxidative damage have been implicated as negative modulators of Na⁺, K⁺-ATPase [9,20,75-77], which is the major determinant of sodium concentration and cellular excitability, we investigated if

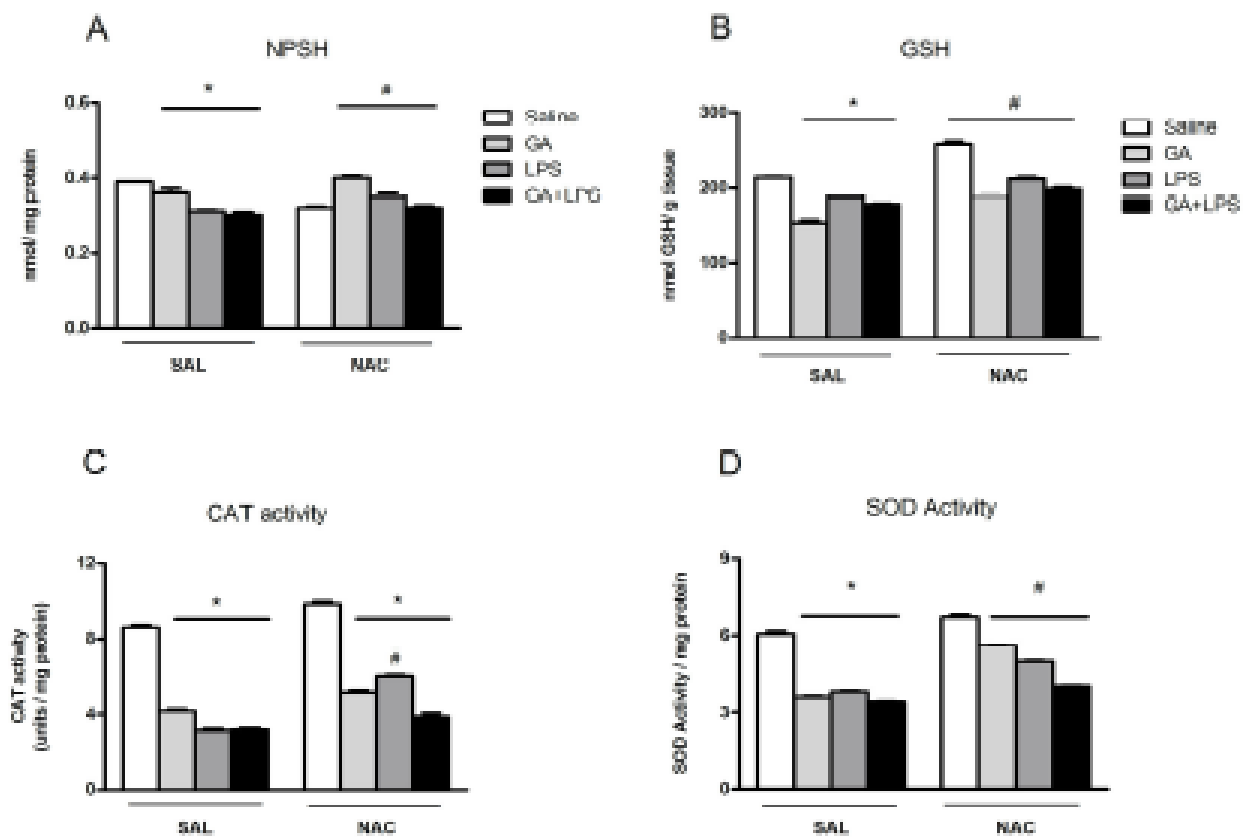


Figure 8. Effect of early postnatal chronic GA, NAC and LPS administration on NPSH content, GSH level, CAT and SOD activities. NAC prevented the decrease of antioxidant defenses induced by GA and LPS. * $P < 0.001$ compared with saline treated group and # $P < 0.001$ compared with respective control group (Duncan's multiple comparisons test). Data are presented as means \pm S.E.M. for $n = 7$ in each group.

doi:10.1371/journal.pone.0078332.g008

the mediators could alter the enzyme activity. In fact, studies showed that proinflammatory cytokines such as IL-1 β and reactive species have been shown to decrease the expression of Na⁺, K⁺-ATPase during severe experimental sepsis [78].

In our investigation it was interesting to learn that besides LPS and GA have increased oxidative and inflammatory markers, these compounds inhibited markedly Na⁺, K⁺-ATPase activity suggesting the participation of this enzyme in spatial memory deficit in this acidemia model. These results are in accordance with Liu and colleagues [79] that showed an inhibition of the activity of this enzyme by LPS. In addition, Lima et al. [80] showed that in situations which cause brain inflammation and oxidative stress such as traumatic brain injury, the inhibition Na⁺, K⁺-ATPase activity occurs concomitantly to a cognitive impairment. Some studies have also shown that the inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity induces spatial learning deficits [80,81] and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats [82]. In fact, Na⁺, K⁺-ATPase activity can be inhibited by the direct and indirect

action of LPS [79,83,84], as well as by GA and LPS-induced free radical and inflammatory mediator generation [85,86]. Thus, it is plausible to propose that some of the mechanisms may result in the Na⁺, K⁺-ATPase inhibition and contribute with memory impairment observed in this study.

Although we have shown that GA and LPS facilitate the memory deficit, in the present study we did not find changes in the dorsal hippocampal volume after GA, LPS or GA/LPS administration (Figures 8 and 9). These results agree with studies that show the GA-I patients develop mainly bilateral striatal degeneration, but not in hippocampus, during catabolic or infectious events observed in neuroradiological imaging [62,87-89]. In fact, Oliveira-Bravo et al. [77,90] showed that a single intracerebroventricular dose of GA induced degeneration mainly in the striatum. Furthermore, Ulrich et al. [91] showed that only 3-OH-glutaric, but not GA and glutaconic acid induced neurodegeneration in corticostriatal and hippocampal slice cultures from rat brain. Thus, this result reveals that GA did not induce reduction of hippocampal volume, suggesting that the

NaK-ATPase Activity

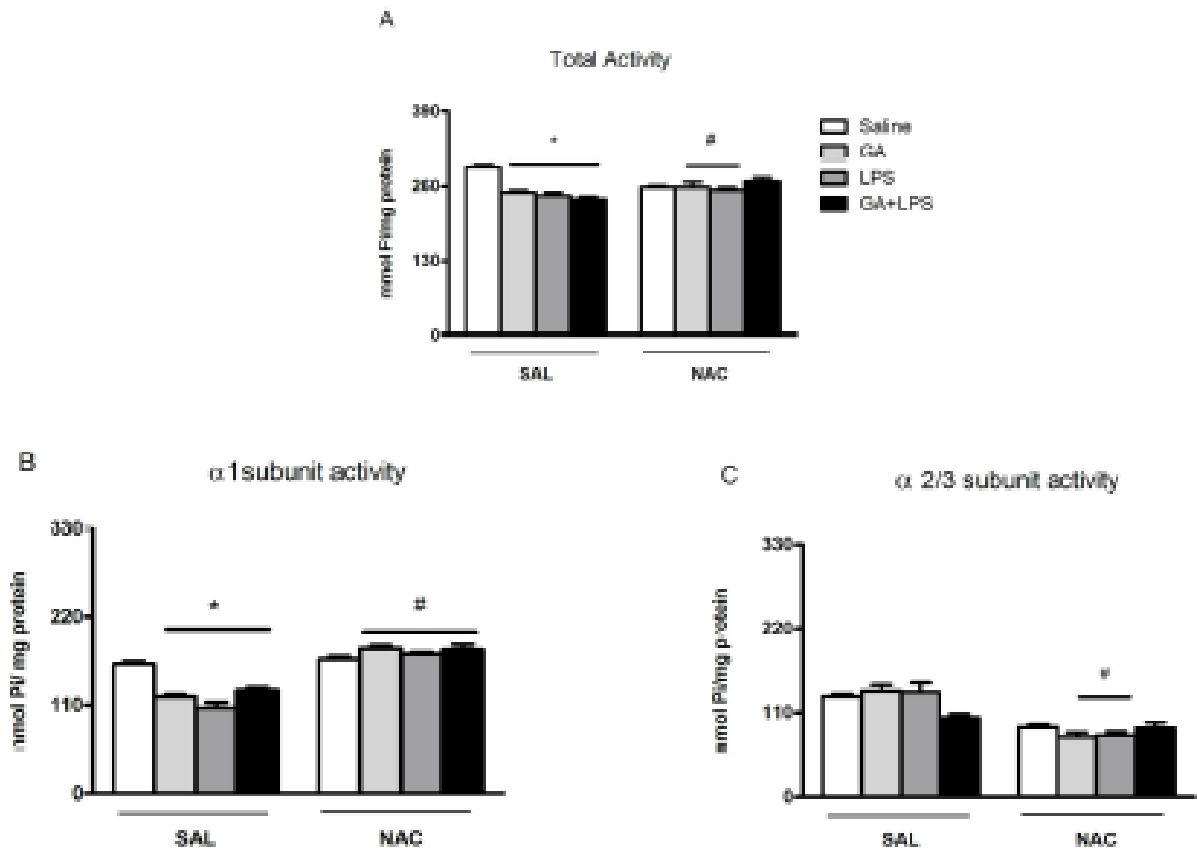


Figure 7. NAC prevented the decrease of $\alpha 1$ subunit activity of Na^+/K^+ -ATPase enzyme. Effect of early postnatal chronic GA, NAC and LPS administration on Na^+/K^+ -ATPase total activity (A); on $\alpha 1$ subunit activity of Na^+/K^+ -ATPase enzyme (B); and on $\alpha 2/3$ subunit activity of Na^+/K^+ -ATPase enzyme (C), on the second day of Barnes maze. * $P < 0.001$ compared with saline treated group and # $P < 0.001$ compared with respective control group (Student–Newman–Keuls test). Data are presented as means \pm S.E.M. for $n = 7$ – 9 in each group.

doi:10.1371/journal.pone.0078332.g007

memory deficit in rat pups was not due to tissue lesion in this GA-I model.

Since we observed the increase of inflammatory and oxidative marker levels in the hippocampus of rat pups after the GA and LPS administration, we decided to test whether the chronic co-treatment with NAC, an agent with antioxidant and anti-inflammatory properties, could protect the alterations induced by GA and LPS. In fact, the results presented in this report showed that NAC supplementation was effective in preventing the decreased cognitive deficit as well as the increase of inflammatory and oxidative mediators levels induced by GA and LPS in rat pups. The supplementation of this compound also protected against the Na^+/K^+ -ATPase activity inhibition (total and $\alpha 1$ subunit).

Recent studies have shown that cytokines have potential to alter the redox equilibrium, thereby affecting GSH/GSSG shuttling and recycling [97]. For example, after H_2O_2 or amyloid- β intracerebral injection in rat brain, it was observed an association between lipid peroxidation and the levels of cytokines in addition to a significant inverse correlation between glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation levels [98,99]. In this line of view, we showed that the treatment of rat primary astrocytes with TNF- α or IL-1 β leads to marked alteration in cellular redox (decrease in intracellular GSH). On the other hand, pretreatment of astrocytes with NAC, an antioxidant and efficient thiol source for glutathione, prevents cytokine-induced decrease in GSH [100,101]. In fact, our findings showed that NAC supplementation decreased cytokine

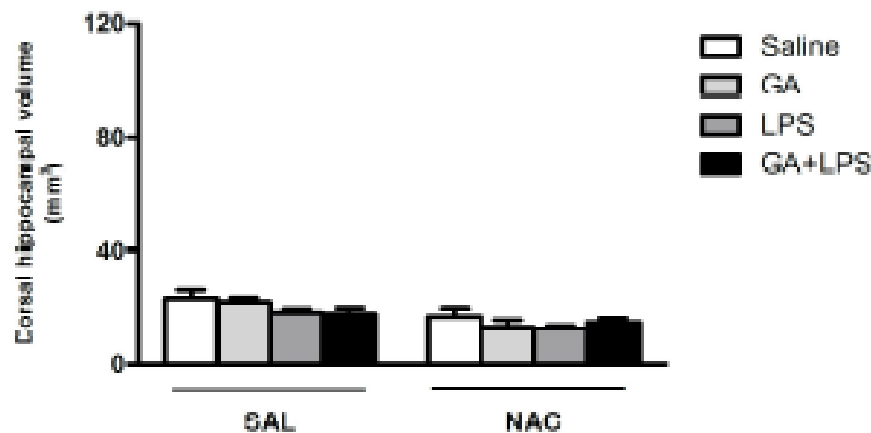


Figure 8. Effect of early postnatal chronic GA, NAC and LPS administration on hippocampal volume. Data represent means \pm S.E.M. for $n = 5-6$ in each group. No significant differences between groups were detected.

doi:10.1371/journal.pone.0078332.g008

levels and TBARS production as well as increased GSH content and improved memory deficit induced by GA and LPS. Accordingly, glutathione prevented Na^+/K^+ -ATPase activity inhibition GA-induced in neuronal cultures [52]. These data suggest that inflammatory events and oxidative stress occur in a synchronized manner by changing the redox environment, and that compounds with anti-inflammatory and antioxidant properties could be used as adjuvant therapy to some neurodegenerative disorders.

Thus, a currently reported increase in GA-induced spatial memory deficit by LPS not only supports the idea that inflammatory mediators, such as IL-1 β facilitates the cognitive impairment, but also adds pharmacologic evidence to the fact that infections and oxidative damage precipitate metabolic crises and worsen neurologic status of patients with GA-I. Furthermore, the Na^+/K^+ -ATPase activity inhibition also plays an important role for the cognitive impairment observed in this work. Taken together, all experimental findings suggest that oxidative stress GA and LPS-induced impairs the intrinsic cell

potential, leading to proinflammatory signals and creating a vicious circle between oxidative stress and neuroinflammation causing a negative modulation in Na^+/K^+ -ATPase activity that was responsive to NAC supplementation. Therefore, if the effects detected in this study also occur in patients with GA-I, it is tempting to propose that they may contribute, at least in part, to the neurological dysfunction found in GA-I, and that the

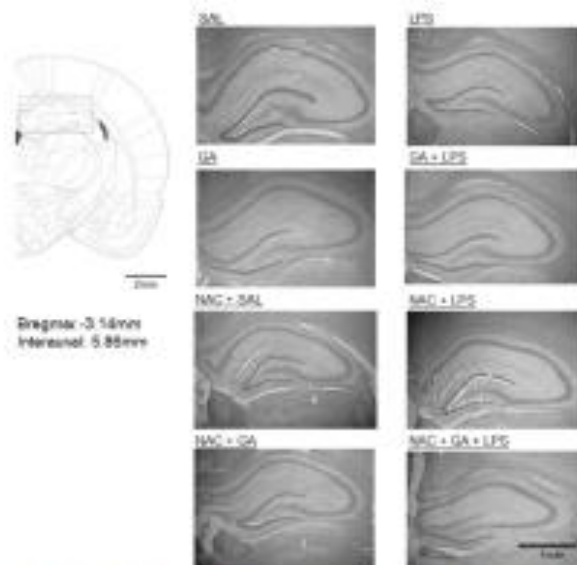


Figure 8. Digitized images of dorsal hippocampus showing similarities in the volume of this region between the different experimental groups. Schematic drawing obtained from Paxinos and Watson's Atlas.

doi:10.1371/journal.pone.0078332.g008

administration of NAC could represent a complementary therapy together with Lys dietary restriction and L-carnitine supplementation in the treatment of children with glutaric acidemia.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FSR MAS DVM APOF. Performed the experiments: MRR LFFR FGR. Analyzed the data: FSR MAS BCM APOF LLX. Contributed reagents/materials/analysis tools: AMC MP LX JF MRCS. Wrote the manuscript: MRR LFFR JCC.

References

- Goodman SI, Norenberg MD, Shikes RH, Breslich DJ, Moe PG (1977) Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. *J Pediatr* 90: 746-750. doi:10.1016/S0022-3476(77)81240-7. PubMed: 858963.
- Goodman SI (2001) Prenatal diagnosis of glutaric acidemias. *Prenat Diagn* 21: 1187-1188. doi:10.1002/pd.201. PubMed: 11787045.
- Struass KA, Puffenberger EG, Robinson DL, Morton DH (2003) Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 121C: 38-52. doi:10.1002/ajmg.c.20007. PubMed: 12888985.
- Struass KA, Morton DH (2003) Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 121C: 53-70. doi:10.1002/ajmg.c.20008. PubMed: 12888988.
- Bonah A, Beauchamp M, Humphrey M, Watkins J, Peters H et al. (2008) Newborn screening for glutaric aciduria type I in Victoria: treatment and outcome. *Mol Genet Metab* 94: 287-291. doi:10.1016/j.jmgm.2008.03.005. PubMed: 18411069.
- Pati N, Shinde S, Kenede S, Kulkarni M (2004) Glutaric aciduria type I associated with learning disability. *Indian J Pediatr* 71: 948. PubMed: 15531849.
- Beauchamp MH, Bonah A, Anderson V (2008) Cognitive, behavioural and adaptive profiles of children with glutaric aciduria type I detected through newborn screening. *J Inher Metab Dis* 32 Suppl 1: 207-213. doi:10.1007/s10545-009-1187-z. PubMed: 19488578.
- Burton BK (1998) Inborn errors of metabolism in infancy: a guide to diagnosis. *Pediatrics* 102: E69. doi:10.1542/peds.102.5.e69. PubMed: 9832597.
- Fighera MR, Royes LF, Furlan AF, Oliveira MS, Florenze NG et al. (2008) GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺/K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole. *Neurobiol Dis* 22: 811-823. doi:10.1016/j.nbd.2008.01.002. PubMed: 18518483.
- Kolker S, Sauer SN, Okun JG, Hoffmann GF, Koeller DM (2008) Lysine intake and neurotoxicity in glutaric aciduria type I: towards a rationale for therapy? *Brain* 129: e54. doi:10.1093/brain/aw1137. PubMed: 18870879.
- Magni DV, Souza MA, Oliveira AP, Furlan AF, Oliveira MS et al. (2011) Lipopolyaccharide enhances glutaric acid-induced seizure susceptibility in rat pups: behavioral and electroencephalographic

- approach. *Epilepsy Res* 93: 136-148. doi:10.1016/j.epilepsyres.2010.11.007. PubMed: 21183317.
12. Barrientos RM, Higgins EA, Sprunger DB, Watkins LR, Rudy JW et al. (2002) Memory for context is impaired by a post context exposure injection of interleukin-1 beta into dorsal hippocampus. *Behav Brain Res* 134: 291-298. doi:10.1016/S0168-4328(02)00043-8. PubMed: 12191818.
 13. Hein AM, Stutzman DL, Bland ST, Barrientos RM, Watkins LR et al. (2007) Prostaglandins are necessary and sufficient to induce contextual fear learning impairments after interleukin-1 beta injections into the dorsal hippocampus. *Neuroscience* 150: 754-763. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.10.003. PubMed: 18035502.
 14. Perrella C, Carrieri PB, Guarnaccia D, Sacca M (1992) Cerebrospinal fluid cytokines in AIDS dementia complex. *J Neurol* 239: 387-388. PubMed: 1403021.
 15. Pugh CR, Kurnagawa K, Fleisher M, Watkins LR, Meier SF et al. (1998) Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning. *Brain Behav Immun* 12: 212-229. doi:10.1006/brbi.1998.0524. PubMed: 9769157.
 16. Sparisman NL, Kohman RA, Garcia AK, Boehm GW (2005) Peripheral lipopolysaccharide administration impairs two-way active avoidance conditioning in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 85: 278-288. doi:10.1016/j.physbeh.2005.04.015. PubMed: 15938787.
 17. Olesse JM, Cao C, Mori T, Mamczak MB, Maxwell A et al. (2009) Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Pineal Res* 47: 82-96. doi:10.1111/j.1600-0709.2009.00692.x. PubMed: 19538338.
 18. Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V et al. (1989) Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7811-7815. doi:10.1073/pnas.86.19.7811. PubMed: 2529544.
 19. Casadesu G, Smith MA, Besu S, Hua J, Capobianco DE et al. (2007) Increased isoprostane and prostaglandin are prominent in neurons in Alzheimer disease. *Mol Neurodegener* 2: 2. doi:10.1186/1750-1326-2-2. PubMed: 17241482.
 20. Magni DV, Oliveira MS, Furian AF, Florenza NG, Fighera MR et al. (2007) Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats. *Brain Res* 1185: 339-345. doi:10.1016/j.brainres.2007.09.023. PubMed: 17950259.
 21. Magni DV, Furian AF, Oliveira MS, Souza MA, Lunard F et al. (2009) Kinetic characterization of L-[3H]glutamate uptake inhibition and increase oxidative damage induced by glutaric acid in striatal synaptosomes of rats. *Int J Dev Neurosci* 27: 65-72. doi:10.1016/j.ijdevneu.2008.09.004. PubMed: 18930800.
 22. Oliveira-Breno S, Fernández A, Sotobó MN, Rosillo JC, Casarosa G et al. (2011) Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I. *PLoS ONE* 6: e20831. doi:10.1371/journal.pone.0020831. PubMed: 2169251.
 23. Lima TT, Bagnini J, de Bastiani J, Fialho DB, Jurach A et al. (1998) Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. *Brain Res* 802: 55-60. doi:10.1016/S0006-8993(98)00583-0. PubMed: 9748501.
 24. Köllner S, Ahlemeyer B, Kriegstein J, Hoffmann GF (1999) 3-Hydroxyglutaric and glutaric acids are neurotoxic through NMDA receptors in vitro. *J Inher Metab Dis* 22: 259-262. PubMed: 10384382.
 25. Victor VM, Rocha M, De la Fuente M (2003) N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxaemia by regulating the redox state of immune cells. *Free Radic Res* 37: 919-929. doi:10.1080/1071750031000148727. PubMed: 14889999.
 26. Zhang XY, Hayashida S, Hayashida Y, Cui HS, Chi ZL (2007) Effect of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-induced uveitis in rats. *Jpn J Ophthalmol* 51: 14-20. doi:10.1007/s10384-006-0382-5. PubMed: 17285135.
 27. Scaini G, Teodorak BP, Jeremias IC, Morais MO, Mina F et al. (2012) Antioxidant administration prevents memory impairment in an animal model of maple syrup urine disease. *Behav Brain Res* 231: 92-98. doi:10.1016/j.bbr.2012.03.004. PubMed: 22433584.
 28. Gonçalves JF, Nicoloso FT, de Costa P, Farias JG, Carvalho FB et al. (2012) Behavior and brain enzymatic changes after long-term intoxication with cadmium salt or combination pesticides. *Food Chem Toxicol* 50: 3709-3718. doi:10.1016/j.fct.2012.07.016. PubMed: 22819775.
 29. Ferreira Gde C, Viegas CM, Schuck PF, Tonin A, Ribeiro CA, et al (2005) Gluteric acid administration impairs energy metabolism in midbrain and skeletal muscle of young rats. *Neurochem Res* 30: 1123-1131. doi:10.1007/s11064-005-7711-9. PubMed: 16292505.
 30. Eriksson C, Nobel S, Winblad B, Schultzberg M (2000) Expression of interleukin 1 alpha and beta, and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in the rat central nervous system after peripheral administration of lipopolysaccharides. *Cytokine* 12: 423-431. doi:10.1006/cyto.1999.0582. PubMed: 10857755.
 31. Maeda S, Nakatsuka I, Hayashi Y, Higuchi H, Shimada M et al. (2009) Heme oxygenase-1 induction in the brain during lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *Neuropsychiatr Dis Treat* 4: 883-887. PubMed: 18830440.
 32. Heo LY, Hwo XQ, Li SH, Li XH (2010) Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in cognitive deficits in age-increasing offspring rats. *Neuroscience* 166: 763-770. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.01.008. PubMed: 20074821.
 33. Gonçalves JF, Florenza AM, Sperevello RM, Mazzari CM, Bochi GV et al. (2010) N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. *Chem Biol Interact* 186: 53-60. doi:10.1016/j.cbi.2010.04.011. PubMed: 20399782.
 34. Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93: 74-104. doi:10.1037/h0077579. PubMed: 221551.
 35. Bach ME, Hawkins RD, Osman M, Kandel ER, Mayford M (1995) Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell* 81: 905-915. doi:10.1016/0092-8674(95)90010-1. PubMed: 7781087.
 36. Welsh RP, Cummins RA (1978) The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 83: 482-504. doi:10.1037/0033-2909.83.3.482. PubMed: 17582919.
 37. File SE, Gonzalez LE (1998) Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT1A-receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 123-128. doi:10.1016/S0013-0057(95)02108-8. PubMed: 8728549.
 38. Okawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3. PubMed: 58810.
 39. Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77. doi:10.1016/0003-9889(59)90090-8. PubMed: 13850840.
 40. Nelson DP, Rasow LA (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H 2 O 2 solutions in the UV). *Anal Biochem* 49: 474-478. doi:10.1016/0003-2697(72)90451-4. PubMed: 5082943.
 41. Mirra HP, Fridovich I (1972) The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 247: 6980-6982. PubMed: 4873289.
 42. Hsain PJ, Hill R (1978) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74: 214-228. doi:10.1016/0003-2697(78)90328-2. PubMed: 982078.
 43. Wyse AT, Streck EL, Barros SV, Brucque AM, Zugno AI et al. (2000) Methylmalonate administration decreases Neri,K1+ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11: 2331-2334. doi:10.1097/00007156-200007140-00052. PubMed: 10929695.
 44. Fiske CH, Subbarow Y (1927) The Nature of the "Inorganic Phosphate" in Voluntary Muscle. *Science* 65: 401-403.
 45. Nishi A, Fiacre G, Snyder GL, Dukobova I, Aperia A et al. (1999) Regulation of Neri, K1+ATPase isoforms in rat neocortex by dopamine and protein kinase C. *J Neurochem* 73: 1482-1501. PubMed: 10501194.
 46. Ailes YC, Greggio S, Ailes RM, Azevedo PN, Xavier LL et al. (2010) A novel preclinical rodent model of collagenase-induced germinal matrix/intraventricular hemorrhage. *Brain Res* 1356: 130-138. doi:10.1016/j.brainres.2010.07.106. PubMed: 20692238.
 47. de Paula S, Vitale AS, Greggio S, de Paula D, Mello PB et al. (2009) Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatr Res* 65: 831-835. doi:10.1203/PDR.0b013e3181619ed508. PubMed: 19430381.
 48. Gundersen RW (1987) Response of sensory neurites and growth cones to patterned substrata of laminin and fibronectin in vitro. *Dev Biol* 121: 423-431. doi:10.1016/0012-1606(87)90176-5. PubMed: 3582735.
 49. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3. PubMed: 942051.
 50. Seminati B, de Rosa MS, Fernandes CG, Amaral AJ, Braga LM et al. (2012) Induction of oxidative stress in brain of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice by acute lysine administration. *Mol Genet Metab* 108: 31-38. doi:10.1016/j.ymgme.2012.03.002. PubMed: 22445450.

51. Davis HP, Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96: 518-559. doi:10.1037/0033-2909.96.3.518. PubMed: 6295905.
52. Da C, Ferreira G, Schuck PF, Vegas CM, Tonin A, Ribeiro CA, et al (2008) Chronic early postnatal glutaric acid administration causes cognitive deficits in the water maze. *Behav Brain Res* 187: 411-418. doi:10.1016/j.bbr.2007.10.003. PubMed: 18023886.
53. Bilbo SD, Levkoff LH, Mahoney JH, Watkins LR, Rudy JW et al. (2005) Neonatal infection induces memory impairments following an immune challenge in adulthood. *Behav Neurosci* 119: 293-301. doi:10.1037/0735-7044.119.1.293. PubMed: 15727533.
54. Fan Y, Resnick SM, Wu X, Dnestrovskaya C (2008) Structural and functional biomarkers of prodromal Alzheimer's disease: a high-dimensional pattern classification study. *Neuroimage* 41: 277-285. doi:10.1016/j.neuroimage.2008.02.043. PubMed: 18400519.
55. Ikeda T, Mishima K, Aoi N, Liu AX, Egashira N et al. (2005) Dexamethasone prevents long-lasting learning impairment following a combination of lipopolysaccharide and hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Am J Obstet Gynecol* 192: 719-726. doi:10.1016/j.ajog.2004.12.648. PubMed: 15748663.
56. Mukhopadhyay C, Dey A, Bairy I (2008) *Citrobacter freundii* infection in glutaric aciduria type 1: adding insult to injury. *J Postgrad Med* 54: 35-36. doi:10.4103/0022-3859.29189. PubMed: 18296504.
57. Yang M, Liu B, Zhang X, Zhou W, Gao F et al. (2003) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a partial extracellular fragment of a sperm membrane protein YWJ-MA1PH related to the Alzheimer beta44-amyloid precursor protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59: 148-149. doi:10.1107/S0907444902018024. PubMed: 12466552.
58. Block ML, Hong JS (2007) Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem Soc Trans* 35: 1127-1132. doi:10.1042/BST0351127. PubMed: 17958294.
59. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Bales KR et al. (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 58: 453-462. doi:10.1002/glia.20487. PubMed: 17203472.
60. Goodman SI, Freeman FE, Loehr JP (1987) Recent progress in understanding glutaric acidemias. *Enzyme* 38: 76-79. PubMed: 3126045.
61. Koeller DM, Wootner M, Cmic LS, Kleinschmid-DeMasters B, Stephens J et al. (2002) Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet* 11: 347-357. doi:10.1093/hmg/11.4.347. PubMed: 11854187.
62. Funk CB, Prasad AN, Frok P, Sauer S, Koller S et al. (2005) Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type I cohort. *Brain* 128: 711-722. doi:10.1093/brain/ahw401. PubMed: 15889384.
63. Zinnanti WL, Lazovic J, Housman C, LeNoue K, O'Callaghan JP et al. (2007) Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *J Clin Invest* 117: 3258-3270. doi:10.1172/JCI31817. PubMed: 17932588.
64. Nguyen KT, Desik T, Owens SM, Kohno T, Fleisher M et al. (1998) Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat. *J Neurosci* 18: 2239-2248. PubMed: 9482808.
65. Ikegaya Y, Delcoro I, Inokura Y, Matsui N, Nishiyama N (2003) Interleukin-1beta abrogates long-term depression of hippocampal CA1 synaptic transmission. *Synapse* 47: 54-57. doi:10.1002/ten.10154. PubMed: 12422373.
66. Halldrom IC, Danik M, Lüheshi GN, Williams S (2005) Chronic LPS exposure produces changes in intrinsic membrane properties and a sustained IL-beta-dependent increase in GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 15: 858-864. doi:10.1002/hipo.20088. PubMed: 15889405.
67. Matsumoto Y, Yoshida M, Watanabe S, Yamamoto T (2001) Involvement of cholinergic and glutamatergic functions in working memory impairment induced by interleukin-1beta in rats. *Eur J Pharmacol* 430: 283-288. doi:10.1016/S0014-2999(01)01374-7. PubMed: 11711044.
68. Dringen R, Kussmaul L, Gutterer JM, Hirrlinger J, Herrprecht B (1999) The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem* 72: 2523-2530. PubMed: 10349883.
69. de Haan JB, Stadler C, Griffiths P, Kelnar M, O'Shea RD et al. (1995) Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 270: 22528-22538. doi:10.1074/jbc.270.35.22528. PubMed: 8712879.
70. Crack PJ, Cimdins K, Ali U, Hartog PJ, Iannello RC (2006) Lack of glutathione peroxidase-1 exacerbates Abeta-mediated neurotoxicity in cortical neurons. *J Neural Transm* 113: 645-657. doi:10.1007/s00702-005-0352-y. PubMed: 16252075.
71. Pufferlicker PS, Getz RL, Coyle JT (1993) Glutamic acid-induced lipid peroxidation: protection with butylated hydroxytoluene and U73127 in primary cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res* 624: 223-232. doi:10.1016/0006-8993(93)90081-W. PubMed: 8252395.
72. Fronteira MV, Velazquez JL, Hwang PA, Carlen PL (2000) Free radical production correlates with cell death in an in vitro model of epilepsy. *Eur J Neurosci* 12: 1431-1439. doi:10.1045/1480-6568.2000.00018.x. PubMed: 10762371.
73. Ferescoqi T, [Euneme] (2011) Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, 2011: 247-487. PubMed: 21403820.
74. Sauer SW, Okun JG, Fricker G, Mahringer A, Müller I et al. (2008) Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Neurochem* 97: 899-910. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.02813.x. PubMed: 18573641.
75. Kreydiyyeh SI, Abou-Obahine C, Hilel-Dandan R (2004) Interleukin-1 beta inhibits Na(+)/K(+) ATPase activity and protein expression in cardiac myocytes. *Cytokine* 26: 1-8. doi:10.1016/j.cyt.2003.11.014. PubMed: 15018405.
76. Kreydiyyeh SI, Al-Sadi R (2004) The signal transduction pathway that mediates the effect of interleukin-1 beta on the Na(+)/K(+)-ATPase in LLC-PK1 cells. *PLoS One* 448: 231-238. doi:10.1007/s00424-004-1242-0. PubMed: 14965961.
77. Oliveira MS, Furlan AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF et al. (2009) Prostaglandin E2 modulates Na(+)/K(+)-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem* 109: 416-428. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.02961.x. PubMed: 19200345.
78. Schmidt C, Höcherl K, Schweda F, Kurtz A, Bucher M (2007) Regulation of renal sodium transporters during severe inflammation. *J Am Soc Nephrol* 18: 1072-1083. doi:10.1681/ASN.2006050454. PubMed: 17314327.
79. Liu SH, Sheu TJ (1997) The in vivo effect of lipopolysaccharide on Na(+)/K(+)-ATPase catalytic (alpha) subunit isoforms in rat sciatic nerve. *Neurosci Lett* 234: 186-188. doi:10.1016/S0304-3840(97)00896-1. PubMed: 9364523.
80. Lima FD, Souza MA, Furlan AF, Rambo LM, Ribeiro LR et al. (2008) Na(+)/K(+)-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. *Behav Brain Res* 193: 306-310. doi:10.1016/j.bbr.2008.05.013. PubMed: 18573545.
81. Zhan H, Tada T, Nakazato F, Tanaka Y, Hongo K (2004) Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain. *Neurosci Res* 28: 35-40. doi:10.1179/0168164040773028807. PubMed: 14977055.
82. de la Reis EA, de Oliveira LS, Lamers ML, Netto CA, Wyse AT (2002) Arginine administration inhibits hippocampal Na(+)/K(+)-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Brain Res* 2: 151-157. PubMed: 12270492.
83. Forshammer J, Block L, Lundborg C, Biber B, Hansson E (2011) Naloxone and ouabain in ultra-low concentrations restore Na(+)/K(+)-ATPase and cytoskeleton in lipopolysaccharide-treated astrocytes. *J Biol Chem* 286: 31568-31567. doi:10.1074/jbc.M111.247787. PubMed: 21757727.
84. Lundborg C, Westerlund A, Björklund U, Biber B, Hansson E (2011) E-Resprodil restores GDNF-evoked Ca(2+) signaling and Na(+)/K(+)-ATPase expression in inflammation-pretreated astrocytes. *J Neurochem* 119: 888-898. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.02485.x. PubMed: 21883228.
85. Lees GJ (1993) Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 54: 287-322. doi:10.1016/0306-4522(93)90254-D. PubMed: 8338828.
86. Mufel P, Sandoval G (2000) Nitric oxide and peroxynitrite anion modulate liver plasma membrane fluidity and Na(+)/K(+)-ATPase activity. *Nitric Oxide* 4: 333-342. doi:10.1006/niox.2000.0285. PubMed: 10944417.
87. Kulkarni S, Harting I, Sauer S, Zachocka J, Hoffmann GF et al. (2005) Late-onset neurologic disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Neurology* 64: 2142-2144. doi:10.1212/01.WNL.0000187428.12417.62. PubMed: 15985501.
88. Strauss KA, Lazovic J, Wintermark M, Morton DH (2007) Multimodal imaging of striatal degeneration in Amish patients with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Brain* 130: 1905-1920. doi:10.1093/brain/awm058. PubMed: 17478444.

89. Harting I, Neumale-Probat E, Seltz A, Meier EM, Assmann B et al. (2009) Dynamic changes of striatal and extrastriatal abnormalities in glutaric aciduria type I. *Brain* 132: 1784-1782. doi:10.1093/brain/awp112. PubMed: 19433437.
90. Olivares-Suero S, Fernández A, Sotelo MN, Rosillo JC, Casanova G et al. (2011) Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric aciduria-I. *PLOS ONE* 6: e20831. doi:10.1371/journal.pone.0020831. PubMed: 21898251.
91. Ulrich K, Flob-Rahmel B, Schluff P, Muschhoff U, Dies A et al. (1999) Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. *J Inher Metab Dis* 22: 392-403. doi:10.1023/A:100595921323. PubMed: 10407778.
92. Kisker S, Olun JG, Ahlemeyer B, Wyse AT, Hörster F et al. (2002) Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *J Neurosci Res* 68: 424-431. doi:10.1002/jnr.10189. PubMed: 11992488.
93. Yirmiya R, Goshen I (2011) Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun* 25: 181-213. doi:10.1016/j.bbi.2011.07.012. PubMed: 20970492.
94. Bezzi P, Domercq M, Brembilla L, Galli R, Schols D et al. (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4: 702-710. doi:10.1038/89490. PubMed: 11428228.
95. Hemmers B, Meyer B (1998) Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol Biol* 100: 1-32. PubMed: 10906988.
96. Nathan C, Xie QW (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918. doi:10.1016/0092-8674(94)90298-8. PubMed: 7522969.
97. Rosales-Cornel S, Reiter RJ, Tan DX, Ortiz GG, Lopez-Armas G (2010) Functional Aspects of Redox Control During Neuroinflammation. *Antioxid Redox Signal* 13: 193-247. doi:10.1089/ars.2009.2829. PubMed: 19951033.
98. Rosales-Cornel S, Tan DX, Reiter RJ, Valdivia-Velazquez M, Coste-Martinez JP, Ortiz GG (2004) Kinetics of the neuroinflammation-oxidative stress correlation in rat brain following the injection of fibrillar amyloid-beta onto the hippocampus in vivo. *J Neuroimmunol* 150: 20-28.
99. Kierdorf K, Wang Y, Neumann H (2009 Jan 8) Immune-mediated CNS damage. *Results Probl Cell Differ*, 51: 173-98. PubMed: 19130024.
100. Schaefer FQ, Buechner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide-glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30: 1191-1212. PubMed: 11388918.
101. Marínovich GG, Cherenkevich SN, Sauer H (2005) Intra-cellular redox state: towards quantitative description. *Eur Biophys J* 34: 937-942. PubMed: 16215752.
102. Viviani B, Bertessaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, Binaglia M, Corsini E, Di Luca M, Galli CL, Marinovich M (2003) Interleukin-1beta enhances NMDA-receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci* 23: 8802-8700. PubMed: 14507988.

3. DISCUSSÃO

A acidemia glutárica do tipo I é um erro inato do metabolismo caracterizado bioquimicamente pelo acúmulo de AG e 3-OH-AG nos líquidos biológicos e tecidos corporais dos pacientes afetados (GOODMAN et al., 1977; GOODMAN e FREMAN, 2001; STRAUSS e MORTON, 2003; STRAUSS et al., 2003). O acúmulo desses ácidos tem sido considerado o responsável pelas alterações neurológicas descritas na doença, as quais aparecem nos períodos iniciais do desenvolvimento cerebral, e geralmente após crises de descompensação metabólica, vacinações rotineiras ou quadros infecciosos (GOODMAN e FRERMAN, 2001). Aproximadamente 90% das crianças afetadas desenvolvem graves sintomas clínicos antes dos 36 meses de idade, e a ocorrência de crises encefalopáticas, as quais levam ao início dos sintomas, não tem sido reportadas após os 5 anos de vida (HOFFMANN et al., 1996; BJUGSTAD et al., 2000; KÖLKER et al., 2006). Dentre as alterações neurológicas apresentadas pelos pacientes com AG-I, pode-se citar o déficit cognitivo (PATIL et al., 2004; KOLKER et al., 2006; BONEH et al., 2008; BEAUCHAMP et al., 2009). Embora os distúrbios neurológicos sejam prevalentes na AG-I, pouco é conhecido sobre o mecanismo pelo qual o acúmulo dos ácidos orgânicos causam essas alterações após processos infecciosos.

Os tratamentos atuais utilizados na terapêutica da AG-I não são completamente eficazes na prevenção das manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes, sendo assim, torna-se necessário a pesquisa de novos compostos que possam auxiliar no tratamento desta acidemia. Nesse contexto, a administração de NAC, um composto com ação antioxidante e antiinflamatória, tem se mostrado eficiente na prevenção do prejuízo da memória em ratos (LANTÉ et al., 2008; GONÇALVES et al., 2010) e em camundongos (FARR et al., 2003), além de ter apresentado efeitos positivos no tratamento de distúrbios neuropsiquiátricos em humanos (BERK et al., 2013). Conforme esses achados, a NAC seria um promissor candidato para ser testado como tratamento para várias doenças, principalmente aquelas que envolvessem na sua fisiopatologia, o estresse oxidativo e a fatores infalamtórios.

Os resultados do presente estudo mostram, pela primeira vez, que o déficit de memória espacial, induzido pela administração crônica de AG, foi potencializado pelo LPS, sugerindo o envolvimento do processo inflamatório na disfunção neurológica observada na AG-I. Entretanto, o tratamento com AG e LPS não causaram alteração morfológica do hipocampo dorsal nos animais (Figuras 8 e 9). Dados adicionais mostram que, embora o LPS tenha facilitado o déficit cognitivo, a administração de NAC preveniu a piora da memória e o aumento dos níveis de citocinas induzidas pelo AG e LPS. Também foi observado que a NAC protegeu do aumento dos níveis dos marcadores oxidativos e da inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzida por AG e LPS no hipocampo dos animais.

Além disso, observamos que nenhum dos tratamentos apresentou efeito no peso corporal, ou seja, não causaram desnutrição nos ratos jovens (Figura 1). Isto é importante, uma vez que animais desnutridos podem apresentar um comportamento diferente em testes neurocomportamentais (DAVIS; SQUIRE, 1984; SEMINOTTI et al., 2012). Logo, as alterações no teste do labirinto de Barnes, observadas nos animais tratados com AG, LPS ou NAC, não foram devido a este efeito nutricional. Da mesma forma, o desempenho dos animais no teste de ansiedade (Tabela 1) e no teste de locomoção e exploração (Figura 2) não foram alterados por nenhum dos tratamentos.

Em relação a avaliação da memória espacial, mostramos, pela primeira vez, que o LPS potencializou o déficit de memória induzido pelo AG neste modelo de acidemia. Estes dados sugerem que a potencialização do déficit de memória causado pelo insulto inflamatório, pode estar relacionado com as alterações cognitivas apresentadas por pacientes com AG-I (PATIL et al., 2004; BONEH et al., 2008; BEAUCHAMP et al., 2009). De fato, outros estudos também mostraram a relação de eventos infecciosos no período neonatal com a ocorrência do déficit cognitivo em humanos e em modelos experimentais (BILBO et al., 2005; IKEDA et al., 2005; FAN et al., 2008). Além disso, estudos sugerem a associação de disfunções cognitivas em humanos com elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, como $\text{IL-1}\beta$ e $\text{TNF-}\alpha$ (GRIFFIN et al., 1989, 1994; PERELLA et al., 1992; CASADESUS et al., 2007).

Dessa forma, neste trabalho, foi avaliado os níveis dessas citocinas após a administração de AG e LPS. Foi observado que a administração desses

compostos induziram a um aumento nos níveis de IL-1 β e TNF- α no hipocampo dos animais (Figura 4), sugerindo que o AG e o LPS podem gerar um processo inflamatório no SNC e contribuir para o déficit cognitivo observado nos teste do labirinto de Barnes (Figura 3).

Dados na literatura mostram que as citocinas, tanto IL-1 β quanto TNF- α , são primeiramente sintetizadas e liberadas pelas células gliais, as quais podem ser ativadas pelo trauma ou infecção (BLOCK; HONG, 2007). Uma vez que a ativação da microglia produz mediadores inflamatórios (QIN et al., 2007), e que a exposição ao AG e o LPS ativam células gliais e microglia, respectivamente (OLIVERA-BRAVO et al., 2011), sugerimos que o aumento de citocinas no hipocampo induzido pelo AG pode ser devido a ativação glial e que o LPS potencializou esse efeito.

Apesar do hipocampo requerer níveis basais de sinalização autoimune para seu desenvolvimento e funcionamento normal, até mesmo na aprendizagem e memória, na LTP e na neurogênese (WILLIAMSON e BILBO, 2013), estudos mostram que um grande número de doenças demenciais em humanos está associada com elevados números de moléculas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α (GRIFFIN et al., 1989, 1994; PERELLA et al., 1992; CASADEUS et al., 2007). Parâmetros neuroquímicos e de aprendizagem envolvidos na memória são sensíveis a moléculas imunoativas, da mesma forma que o hipocampo também é sensível a essas mesmas moléculas. Neste sentido, estudos indicam que a função cognitiva é interrompida por inflamação a nível cerebral (LYNCH, 2004) e que, elevados níveis de TNF- α podem resultar na supressão da LTP no hipocampo (CUNNINGHAM et al., 1996; BUTLER et al., 2004). Sendo assim, as citocinas inflamatórias podem influenciar vários componentes celulares no cérebro e podem ter um papel importante nos efeitos prejudiciais sobre o funcionamento da memória e plasticidade sináptica (NGUYEN et al., 1998).

Sabe-se também que insultos patológicos, como a isquemia ou acúmulo de agregados proteicos além de induzirem a uma neuroinflamação, geram um aumento no estresse oxidativo de uma maneira persistente (CORRAL et al., 2010), quebrando a homeostase do organismo e contribuindo para o aparecimento de doenças. De fato, distúrbios do desenvolvimento, como autismo, assim como disfunções mentais, entre elas, as demências, estão

associadas com a neuroinflamação e a geração de espécies reativas (SERRANO; KLANN, 2004; Da C. FERREIRA et al., 2008; DENG et al., 2012).

Dessa forma, desde que o AG e o LPS induzem a produção de radicais livres e citocinas, decidiu-se investigar o envolvimento de biomarcadores oxidativos no déficit cognitivo induzido pela administração de AG e LPS. Mostramos que o AG e o LPS induziram um aumento na peroxidação lipídica (Figura 5) e diminuição das defesas antioxidantes (Figura 6) como a glutathiona reduzida, grupos tióis, assim como, a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase. Como a GSH é um dos mais importantes antioxidantes do cérebro, sendo um efetivo neutralizador de radicais livres e protetor dos grupos tióis (DRINGEN et al., 1999), e seus níveis estiveram reduzidos no hipocampo dos animais que receberam AG e LPS, podemos concluir que os níveis de GSH reduzidos no hipocampo, podem estar, em parte, envolvidos no déficit de memória observado nos animais. Em adição, como o AG e LPS também diminuíram a atividade da CAT e da SOD no hipocampo, sugere-se que a redução da atividade dessas enzimas não apresentaram um mecanismo compensatório em resposta ao aumento da formação de espécies reativas. Apesar do estresse oxidativo modular a plasticidade sináptica, agindo como mensageiros celulares durante a LTP, o seu aumento gera efeitos negativos na formação da memória (SERRANO; KLANN, 2004) e está associado com a presença do processo inflamatório (FAROOQUI; FAROOQUI, 2011). Como os pacientes com AG-I, frequentemente, desenvolvem déficit cognitivo durante e depois de infecções, (SAUER et al., 2006; Da C FERREIRA et al., 2008) e a injeção de AG induz ao aumento do estresse oxidativo, podemos sugerir que as alterações vistas até o momento, neste trabalho, estão correlacionadas, e justificam em parte, os resultados.

Sabendo que o AG, os mediadores inflamatórios e o dano oxidativo têm sido implicados como moduladores negativos da Na^+, K^+ -ATPase (KREYDIYYEH; AL-SADI, 2004; KREYDIYYEH et al., 2004; FIGHERA et al., 2006; MAGNI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009), foi investigada a participação desta enzima no dano cognitivo. A administração de AG e de LPS inibiram a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, sugerindo o seu envolvimento no déficit de memória observado neste modelo de acidemia.

De fato, estudos mostram que as citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , e espécies reativas diminuem a expressão da Na⁺,K⁺-ATPase durante episódios de sepse em modelos experimentais (SCHIMIDT et al., 2007). Além disso, Lima e colaboradores (2008) mostraram que situações que causam inflamação cerebral e estresse oxidativo, como o traumatismo cranioencefálico, a inibição da Na⁺,K⁺-ATPase ocorre concomitantemente ao prejuízo cognitivo.

Entretanto, no presente estudo, não foi encontrada alteração de volume no hipocampo dorsal após a administração de AG e/ou LPS (Figuras 8 e 9). Esses resultados estão de acordo com estudos que mostram que pacientes com AG-I desenvolvem principalmente degeneração estriatal, observada em imagens neuroradiológicas (FUNK et al., 2005; KULKENS et al., 2005; STRAUSS et al., 2007; HARTIN et al., 2009), mas não degeneração hipocampal, durante eventos catabólicos ou infecciosos. Experimentalmente, Ulrich e colaboradores (1999) mostraram que somente 3-OH-AG, mas não AG nem ácido glutacônico, induziu neurodegeneração em cultura de fatias corticoestriatais e hipocampais de cérebro de ratos. Além disso, Olivera-Bravo e colaboradores (2011) mostraram que uma única dose intracerebroventricular de AG induziu degeneração principalmente no estriado.

Uma vez observado que a administração de AG e LPS induziu o aumento nos níveis de marcadores inflamatórios e oxidativos no hipocampo dos ratos jovens, decidimos testar se o co-tratamento crônico com NAC, um agente com ação antioxidante e antiinflamatória, poderia proteger das alterações induzidas pelo AG e LPS. Os presentes resultados mostraram que a suplementação com NAC foi eficaz na prevenção do déficit cognitivo, bem como no aumento dos níveis de citocinas e mediadores oxidativos induzidos pelo AG e LPS em ratos jovens. Além disso, a NAC também protegeu contra a inibição a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase (total e subunidade α 1). Em acordo, Kolker e colaboradores (2002) mostraram que o AG diminui a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em cultura de neurônios, e essa inibição foi prevenida pela glutathiona. Esses resultados estão de acordo com a ideia de que as espécies reativas e a neuroinflamação contribuem para o déficit cognitivo e alterações neuroquímicas observadas nesse estudo (FIGHERA et al., 2006; YIRMIYA; GOSHEN, 2011; SEMINOTTI et al., 2012).

Então, considerando todos os dados encontrados neste trabalho, pode-se sugerir que o estresse oxidativo induzido por AG e LPS prejudica o potencial intrínseco da célula, levando a sinais pró-inflamatórios e criando um ciclo vicioso entre estresse oxidativo e neuroinflamação, causando uma modulação negativa da atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Além disso, é plausível propor que essas alterações desempenham um papel importante na disfunção neurológica seguida da administração de AG e LPS, e assim contribuem para a fisiopatologia do prejuízo cognitivo observado nos pacientes com AG-I, particularmente durante crises encefalopáticas desencadeadas por infecções. Como a suplementação com a NAC foi capaz de prevenir o déficit cognitivo e as alterações bioquímicas induzidas pelo AG e LPS, sugere-se que este composto pode representar uma possível terapia adjuvante no tratamento de crianças com acidemia glutárica. Entretanto, estudos clínicos devem ser conduzidos na tentativa de se compreender melhor a ação da NAC nestes pacientes.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- a)** O tratamento crônico com AG (5 $\mu\text{mol/g}$; s.c.), bem como o tratamento com LPS (2 mg/Kg; i.p.) causaram um déficit no aprendizado espacial dos ratos jovens. A co-administração de AG e LPS causou um maior prejuízo de memória comparado com os outros tratamentos. No entanto, o co-tratamento crônico com NAC (150mg/kg, i.g.) protegeu do déficit de memória espacial induzido pelo AG e LPS.
- b)** Nenhum dos tratamentos alterou o peso dos animais, sugerindo que as alterações comportamentais e bioquímicas não ocorreram devido a um quadro de desnutrição.
- c)** Nenhum dos tratamentos alterou a atividade locomotora ou exploratória, bem como a ansiedade dos animais.
- d)** Os tratamentos com AG (5 $\mu\text{mol/g}$; s.c.) e LPS (2 mg/Kg; i.p.) induziram aumento nos níveis de TNF- α e IL-1 β no hipocampo dos animais. A co-administração de AG e LPS causou um maior aumento nos níveis de IL-1 β no hipocampo dos ratos jovens. Contudo, o co-tratamento com NAC (150mg/kg, i.g.) protegeu do aumento nos níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α .
- e)** Os tratamentos com AG e LPS induziram aumento no conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo dos ratos jovens. Apesar disso, o co-tratamento com NAC protegeu desse aumento.
- f)** Os tratamentos com AG e LPS causaram diminuição em marcadores de defesa antioxidante: conteúdo de grupos tióis não proteicos

(NPSH), conteúdo de glutatona reduzida (GSH), atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no hipocampo dos animais. Mas o co-tratamento com a NAC também foi eficaz na proteção da diminuição desses marcadores.

g) Os tratamentos com AG e LPS causaram uma redução na atividade total e na subunidade $\alpha 1$ na enzima Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo dos ratos jovens. No entanto, o co-tratamento com NAC protegeu dessa redução.

h) Nenhum dos tratamentos alterou o volume do hipocampo dorsal dos animais.

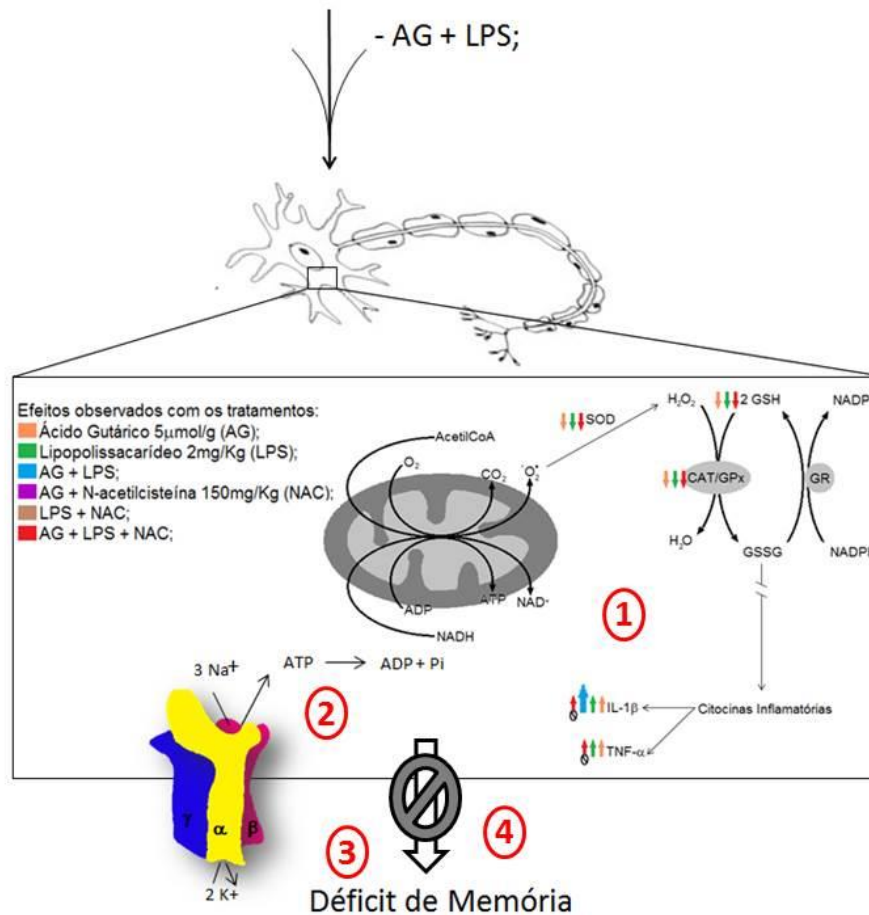


Figura 3. Representação esquemática da conclusão da presente Dissertação. A administração de AG e/ou LPS induziu o estresse oxidativo e o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo (1), estes eventos causaram

uma modulação negativa na atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase (2). Em conjunto, esses fatores repercutiram em um déficit de memória (3). Apesar disso, a suplementação com NAC preveniu essas alterações bioquímicas e, conseqüentemente, o déficit de memória (4).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMS, S. et al. Relation between cognitive dysfunction and pseudobulbar palsy in amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**. v. 5, p. 464-472, 1997.

AKTURI, K. R. et al. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 7, p. 355-359, 2007.

ALMEIDA, M. F. Consenso para o tratamento nutricional da acidúria glutárica tipo I. **Acta Pediátrica Portuguesa**. 2007 v. 38, p. 215-22, 2007.

ASTUR, R.S. et al. Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. **Behavioural Brain Research**. v. 132, p. 77-84, 2002.

AUERBACH, J. M., SEGAL, M. Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. **Journal Physiology**. v. 492, p. 479-493, 1996.

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual Review Immunology**. v. 27, p. 669, 692, 2009.

BEAUCHAMP, M.H.; BONEH, A.; ANDERSON, V. Cognitive, behavioural and adaptive profiles of children with glutaric aciduria type I detected through newborn screening. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. V. 32 Suppl 1, p. 207-213, 2009.

BERK, M. et al. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends Pharmacological Sciences**. v. 34, p. 167-177, 2013.

BILBO, S.D. Neonatal infection induces memory impairments following an immune challenge in adulthood. **Behavioural Neuroscience**. v. 119, p. 293-301, 2005.

BJUGSTAD, K.B.; GOODMAN, S.I.; FREED, C.R. Age at symptom onset predicts severity of motor impairment and clinical outcome of glutaric acidemia

type 1. **Journal Pediatrics**. v. 137, p. 681-686, 2000.

BLOCK, M.L.; HONG, J.S. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. **Biochemical Society Transactions**. v, 35. P. 1127-1132, 2007.

BONEH A., BEAUCHAMP M., HUMPHREY M., WATKINS J., PETERS H., et al. Newborn screening for glutaric aciduria type I in Victoria: treatment and outcome. **Molecular Genetics Metabolism**. v. 94, p. 287-291, 2008.

BONEH, A. et al. Clinical, ethical and legal considerations in the treatment of newborns with non-ketotic hyperglycinaemia. **Molecular Genetics Metabolism**. v. 94, p. 143-147, 2008.

BURLINA, A.P. et al. Management of movement disorders in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: anticholinergic drugs and botulinum toxin as additional therapeutic options. **Journal Inherited Metabolic Disease**. v. 27, p. 911-915, 2004.

BUTLER, M.P.; O'CONNOR, J. J.; MOYNAGH, P. N. Dissection of tumor-necrosis factor-alpha inhibition of long-term potentiation (LTP) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early- but not late-phase LTP. **Neuroscience**. v. 124, p. 319-326, 2004.

BYE, N. TURNLEY, A. M., MORGANTI-KOSSMANN, M.C. Inflammatory regulators of redirected neural migration in the injured brain. **Neurosignals**. v. 20, p. 132-146, 2012.

CASADESUS, G. et al. Increased isoprostane and prostaglandin are prominent in neurons in Alzheimer disease. **Molecular Neurodegeneration**. v. 2, p. 2, 2007.

CEDERBERG, D.; SIESJO, P. What has inflammation to do with traumatic brain injury? **Childs Nervous System**. v. 26, n. 2, p. 221-226, 2010.

CHALMERS, R.A.; BAIN, M.D.; ZSCHOCKE, J. Riboflavin-responsive glutaryl CoA dehydrogenase deficiency. **Molecular Genetics Metabolism**. v. 88, p. 29-37, 2006.

CHALMERS, R.A.; LAWSON, A. M. Organic acids in man. **Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias**. London, Chapman & Hall. p. 221-229, 1982.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**. v. 59, p. 527-605, 1979.

CORKIN, S. et al. H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. **Journal Neuroscience**. v. 10, p. 3964-79, 1997.

CORKIN, S. What's new with the amnesic patient H.M.? **Nature Reviews Neuroscience**. v. 2, p. 153-60, 2002.

CORRAL, J. et al. Pathologic complete responses after chemotherapy plus figitumumab in stage IV non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v. 29, p. 163,165, 2010.

CUNNINGHAM, A. J. et al. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. **Neuroscience Letters**. v. 203, p. 17-20, 1996.

Da C. FERREIRA, G. et al. Chronic early postnatal glutaric acid administration causes cognitive deficits in the water maze. **Behavioral Brain Research**. v. 187, p. 411-416, 2008.

DAS, A.M. et al. K. Glutaric aciduria I: creatine supplementation restores creatine phosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 78, p. 108-111, 2003.

DAVALOS, D. B.; KISLEY, M.A.; FREEDMAN, R. Behavioral and electrophysiological indices of temporal processing dysfunction in schizophrenia. **Journal Neuropsychiatry Clinical Neuroscience**. v. 17, p. 517-525, 2005.

DAVIS, H.P.; SQUIRE, L.R. Protein synthesis and memory: a review. **Psychological Bulletin**. v. 96; p. 518-559, 1984.

De MELLO, C. F. et al. Intrastriatal administration of 3-hydroxyglutaric acid induces convulsions and striatal lesions in rats. **Brain Research**. v. 916, p. 70-75, 2001.

De OLIVEIRA MARQUES, F. et al. Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. **Brain Research**. v. 964, p. 153-158, 2003.

DEAN, O.; GIORLANDO; F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. **Journal of Psychiatry Neuroscience**. v. 36, p. 78-86, 2011.

DEL MAESTRO, R. et al. Free radicals as mediators of tissue injury. **Acta Physiologica Scandinavica Supplementum**. v. 492, p. 43-57, 1980.

DENG, X. H. et al. Lipopolysaccharide induces paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) expression, synaptic alteration, and learning-memory deficit in rats. **Neuroscience**. v. 209, p. 161-170, 2012.

DODD, S. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. **Expert Opinion Biological Therapy**. v. 8, p. 1955-1962, 2008.

DONG, Y.; BENVENISTE, E. N. Immune function of astrocytes. **Glia**, v. 36, n. 2, p. 180-190, 2001.

DRIGO, P. et al. Macrocephaly, subarachnoid fluid collection, and glutaric aciduria type I. **Journal of Child Neurology**. v. 11, p. 414- 417, 1996.

DRINGEN, R. et al. The glutathione system of peroxide detoxification in less efficient in neurins than in astroglial cells. **Journal of Neurochemistry**. v. 72, p. 2523-2530, 1999.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cells function. **Physiology Review**: v. 82, p.47-95, 2002.

FAN, Y. et al. Structural and functional biomarkers of prodromal Alzheimer's disease: a high-dimensional pattern classification study. **Neuroimage**. v. 41, p. 277-285, 2008.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A.A. Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's diseases. **Parkinsons Disease**. p. 247-467, 2011.

FARR, S. A. The antioxidants α -lipoic acid and *N*-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. **Journal of Neurochemistry**. v. 84, p. 1173-1183, 2003.

FERREIRA, G.C. et al. Glutaric acid administration impairs energy metabolism in midbrain and skeletal muscle of young rats. **Neurochemistry Research**. v. 30, p. 1123-1131, 2005.

FIGHERA, M.R. et al. GM1 ganglioside prevents seizures, Na^+ , K^+ -ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole. **Neurobiology of Disease** v. 22, p611-623, 2006.

FUNK, C.B. et al. Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. **Brain**. v. 128, p. 711-722, 2005.

GAETANI, G. F. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Progress in Lipid Research**. v. 32, p. 71-110, 1993.

GIULIAN, D. et al. The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. **Journal Neuroscience**. v. 9, p. 4416-4429, 1989.

GONÇALVES, J.F. N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. **Chemico-Biological Interactions**. v. 186, p. 53-60, 2010.

GOODMAN, S. I. et al. Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations. **Human Mutation**. v. 12, p. 141-144, 1998.

GOODMAN, S.I. et al. Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. **Journal of Pediatrics**. v. 90, p. 746-750, 1977.

GOODMAN, S.I.; FRERMAN, F.E. Organic acidemias due to defects in lysine

oxidation: 2-ketoadipic acidemia and glutaric acidemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds.). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8^a edition. New York, McGraw-Hill. p. 2195-2204, 2001.

GOODMAN, S.I. Development of pathogenic concepts in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: The challenge. **Journal Inherited Metabolic Disease**. v. 27, p. 801-803, 2004.

GREENBERG, C.R. et al. A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl-CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I. **Human Molecular Genetics**. v. 4, p. 493-495, 1995.

GRESSIER, B. et al. Comparison of in vitro effects of two thiol-containing drugs on human neutrophils hydrogen peroxide production. **Methods and Findings in Experimental Clinical Pharmacology**. v. 15, p. 101-105, 1993.

GRIFFIN, W. S. et al. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**. v. 86, p. 7611-7615, 1989.

GRIFFIN, W. S. et al. Microglial interleukin-1 alpha expression in human head injury: correlations with neuronal and neuritic beta-amyloid precursor protein expression. **Neuroscience Letters**. v. 176, p. 133-136, 1994.

HADDAD, J.J.; HARB, H. L. L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? **Molecular Immunology**. v. 42, p. 987-1014, 2004.

HALLIWELL, B. Tell me about free radicals, doctor: a review. **Royal Society of Medicine**, v. 82, p.747-752, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 18; p. 125-160, 1995.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative

damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British journal of pharmacology**, v.142, p.231-55, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. Em: **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press. p. 187-267. 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Brazilian Journal of nutrition**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HÄRTEL, U. et al. Purification of glutaryl-CoA dehydrogenase from *Pseudomonas* sp., an enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. **Archives of Microbiology**. v. 159, p. 174-181, 1993.

HARTIN, I. et al. Dynamic changes of striatal and extrastriatal abnormalities in glutaric aciduria type I. **Brain**. v. 132, p. 1764-1782, 2009.

HEDLUND, G. L.; LONGO, N.; PASQUALI, M. Glutaric acidemia type 1. **American Journal of Medical Genetics Part C Seminars in Medical Genetics**. v. 142, p. 86-94, 2006.

HOFFMANN, G. F. et al. Early signs and course of disease of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Journal Inherited Metabolic Disease**. v. 18, p. 173-176, 1995.

HOFFMANN, G. F. et al. Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. **European Journal of Pediatrics**. v. 163; p. 76-80, 2004.

HOFFMANN, G.F. et al. Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Neuropediatrics**. v. 27, p. 115-123, 1996.

HOFFMANN, G.F. Selective screening for inborn errors of metabolism - past, present and future. **European Journal of Pediatrics**. v. 153, p. 2-8, 1994.

HOFFMANN, G.F.; ZSCHOCKE, J. Glutaric aciduria type I: from clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy. **Journal Inherited Metabolic Disease**. v. 22, p. 381-391, 1999.

HORISBERGER, J. D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. **Physiology (Bethesda)**. p. 377-387, 2004.

HOTZ, P.; HOET, P.; LAUWERYS R. Lipid peroxidation in human pathology: evaluation of data in literature. **Pathologie Biologie (Paris)**. v. 35; p. 1067-1073; 1987.

IKEDA, T. et al. Dexamethasone prevents long-lasting learning impairment following a combination of lipopolysaccharide and hypoxia-ischemia in neonatal rats. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. v. 192, p. 719-726, 2005.

ILLSINGER, S.; DAS, A. M. Impact of selected inborn errors of metabolism on prenatal and neonatal development. **IUBMB Life**. v. 62, p. 403-413, 2010.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 63, p. 19-32, 1995.

JAMME, I. et al. Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals. **NeuroReport**. v. 1; p. 333-337, 1995.

JOVANOVIĆ, Z.; JOVANOVIĆ, S. [Resistance of nerve cells to oxidative injury]. **Medicinski Pregled**, v. 64, n. 7-8, p. 386-391, 2011.

JULIET, P.A.; MAO, X.; DEL BIGLIO, M.R. Proinflammatory cytokine production by cultured neonatal rat microglia after exposure to blood products. **Brain Research**. p. 230-239, 2008.

KELLY, A. et al. The anti-inflammatory cytokine, IL-10, blocks the inhibitory effect of IL-1 β on LTP: a role for JNK. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276. P. 45564 – 45572, 2001.

KOELLER, D.M. et al. Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. **Human Molecular Genetics**. V. 11, p. 347-357, 2002.

KOLKER, S. et al. Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: a new pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Pediatric Research**. v. 47, p. 495-503, 2000.

KÖLKER, S. et al. Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Pediatric Research**. v. 59; p. 840-847, 2006.

KÖLKER, S. et al. Pathomechanismos of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Annals of Neurology**. v. 55, p. 7-12, 2004.

KREYDIYYEH, S. I. Interleukin-1 beta inhibits Na^+, K^+ -ATPase activity and protein expression in cardiac myocytes. **Cytokine**. v. 26, p. 1-8, 2004.

KREYDIYYEH, S. I.; AL-SADI, R. The signal transduction pathway that mediates the effect of interleukin-1 beta on the Na^+, K^+ -ATPase activity in LLC-PK1 cells. **Pflugers Archiv-European Journal of Physiology**. v. 448, p. 231-238, 2004.

KULKENS, S. et al. Late-onset neurologic disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Neurology**. v. 64, p. 2142-2144, 2005.

KYLLERMAN, M. et al. Dystonia and dyskinesia in glutaric aciduria type I: clinical heterogeneity and therapeutic considerations. **Movement Disorders**. v. 9, p. 22-30, 1994.

LANTÉ, F. et al. Late N-acetylcysteine treatment prevents the deficits induced in the offspring of dams exposed to an immune stress during gestation. **Hippocampus**. v. 18, p. 602-609, 2008.

LATINI, A. et al. Induction of oxidative stress by chronic and acute glutaric acid administration to rats. **Cell Molecular Neurobiology**. v. 27, p. 423-438, 2007.

LATINI, A. et al. 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. **Neuroscience**. v. 135, p.111-120, 2005a.

LATINI, A. et al. Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. **Journal Inherited Metabolic Disease**. v. 28, p. 57-67, 2005b.

LATINI, A. et al. 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. **Brain Research**. v. 956, p. 367-373, 2002.

LEIBEL, R.L. et al. Glutaric acidemia: a metabolic disorder causing progressive choreoathetosis. **Neurology**. v. 30, p. 1163-1168, 1980.

LENICH, A.C.; GOODMAN, S.I. The purification and characterization of glutaryl-CoA dehydrogenase from porcine and human liver. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 261, p. 4090-4096, 1986.

LENT, D.D.; KNOW, H.W. Antennal movements reveal associative learning in the American cockroach *Periplaneta americana*. **The Journal of Experimental Biology**. v. 207, p. 369-75, 2004.

LIANG, L. P.; HO, Y.S. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. **Neuroscience**. v. 101, p. 563-570, 2000.

LIMA, F. D. et al. Na⁺,K⁺-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. **Behavioral Brain Research**. v. 193, p. 306-310, 2008.

LINDNER, M. et al. Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. v. 27, p.851-859, 2004.

LOANE, D. J., BYRNES, K. R. Role of microglia in neurotrauma. **Neurotherapeutics**. v. 7, p. 366-377, 2010.

LU, J. et al. Systemic inflammatory response following acute traumatic brain injury. **Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)**. v. 14, p. 3795-3813, 2009.

LYNCH, M. A. Interleukin-1 beta exerts a myriad of effects in the brain and in particular in the hippocampus: analysis of some of these actions. **Vitamins & Hormones**. v. 64, p. 185-219, 2002.

LYNCH, A. M.; LYNCH, M. A. The age-related increase in IL-1 type I receptor in rat hippocampus is coupled with an increase in caspase-3 activation. **European Journal of Neuroscience**. v. 15, p. 1779 –1788, 2002.

LYNCH, M. A. Long-term potentiation and memory. **Physiological Reviews.** v. 84, p. 87-136, 2004.

MAGNI, D. V. et al. Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats. **Brain Research.** v. 1185, p. 336-345, 2007.

MAGNI, D. V. et al. Kinetic characterization of L-[(3)H]glutamate uptake inhibition and increase oxidative damage induced by glutaric acid in striatal synaptosomes of rats. **International Journal of Developmental Neuroscience.** v. 7, p. 65-72, 2009.

MAGNI, V. M. et al. Lipopolysaccharide enhances glutaric acid-induced seizure susceptibility in rat pups: behavioral and electroencephalographic approach. **Epilepsy Research.** v. 93, p. 138-148, 2010.

MAGNI, V. M. et al. m-Trifluoromethyl diphenyl diselenide attenuates glutaric acid-induced seizures and oxidative stress in rat pups: involvement of the γ -aminobutyric acidergic system. **Journal Neuroscience Research.** v. 60, p. 1723-1731, 2012.

MAIORINO, M.; GREGOLIN, C.; URSINI, F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Methods Enzymology.** v. 186, n., p. 448-457, 1990.

MATALON, S. DAVIS, I. C. Vectorial sodium transport across the mammalian alveolar epithelium: it occurs but through which cells? **Circulation Research.** v. 92, p. 348-349, 2003.

McDONALD, J. W.; SILVERSTEIN, F.S.; JOHNSTON, M. V. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. **Brain Research.** v. 459, p. 200-203, 1988.

McGAUGH, J. L. Memory: a century of consolidation. **Science.** v. 287, p. 248-251, 2000.

McGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends in Pharmacological Sciences.** v. 6, p. 208-210, 2000.

MCLAUGHLIN, B.A. et al. Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. **Neuroscience**, v. 86, p. 279-290, 1998.

MILLS, G. C. Glutathione Peroxidase and the Destruction of Hydrogen Peroxide in Animal Tissues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 86, n. 1, p. 1-5, 1960.

MORTON, D.H. et al. Glutaric aciduria type I: a common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania. **American Journal of Medical Genetics**. v. 41, p. 89-95, 1991.

MURRAY, C.A.; LYNCH, M. A. Dietary supplementation with vitamin E reverses the age-related deficit in long term potentiation in dentate gyrus. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 12161–12168, 1998.

MYER, D. J. et al. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. **Brain**, v. 129, n. Pt 10, p. 2761-2772, 2006.

NAVARRO, A.; BOVERIS, A. Brain mitochondrial dysfunction in aging: conditions that improve survival, neurological performance and mitochondrial function. **Frontiers in Bioscience**. v. 1; p. 1154-1163, 2007.

NGUYEN, K. T. et al. Exposure to acute stress induces brain interleukin-1 beta protein in the rat. **Journal of Neuroscienc**e. v. 18, p. 2239-2246,1998.

OBERHOLZER, V. G. et al. Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. **Archives of Disease in Childhood**. v. 42, p. 492-504, 1967.

OLIVERA, S. et al. Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis. **Neurobiology of Disease**. v. 32, p.528-534, 2008.

OLIVEIRA, M. S. et al. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseades. **Journal of Neurochemistry**. v. 109, p. 416-426, 2009.

OLIVERA-BRAVO, S. et al. Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I. **PLoS One**. v. 6, p. e20831, 2011.

OLIVERA-BRAVO, S. et al. White Matter Injury Induced by Perinatal Exposure to Glutaric Acid. **Neurotoxicity Research**. 2013.

PATIL, N. et al. Glutaric aciduria type I associated with learning disability. **Indian Journal of Pediatrics**. v. 71, p. 948, 2004.

PELLMAR, T. C., LEPINSKI, D.L. Gamma radiation (5-10 Gy) impairs neuronal function in the guinea pig hippocampus. **Radiation Research**. v.136, p. 255-26,1993.

PERRELLA, O. et al. Cerebrospinal fluid cytokines in AIDS dementia complex. **Journal of Neurology**. v. 239, p. 387-388, 1992.

PIGOTT, S.; MILNER, B. Memory for different aspects of complex visual scenes after unilateral temporal- or frontal-lobe resection. **Neuropsychologia**. v. 31, p. 1-15, 1993.

PORCIÚNCULA, L.O. et al. Glutaric acid stimulates glutamate binding and astrocytic uptake and inhibits vesicular glutamate uptake in forebrain from young rats. **Neurochemistry International**. v. 45, p.1075-1086, 2004.

QIN, L. et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Glia**. v. 55, p. 453-462, 2007.

QUILLFELDT, P. et al. Differences in the stable isotope signatures of seabird egg membrane and albumen--implications for non-invasive studies. **Rapid Communications Mass Spectrometry**. v. 23, p. 3632-3636, 2009.

RASHED, M. et al. Experience of King Faisal Specialist Hospital and Research Center with Saudi organic acid disorders. **Brain & Development**. v. 16, p. 1-6, 1994.

RICE-EVANS, C.; BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipid Research**.v. 32, p. 71-110, 1993.

RIVEST, S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 1, p. 13-19, 2003.

ROSA, R.B. et al. Evidence that glutaric acid reduces glutamate uptake by cerebral cortex of infant rats. **Life Science**. v. 81, p. 1668-1676, 2007.

ROSALES-CORRAL, S. et al. Functional aspects of redox control during neuroinflammation. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 13, p. 193-247, 2010.

SADOWSKA, A. M. Role of N-acetylcysteine in the management of COPD. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**. v. 1, p. 425-434, 2006.

SAHOO, S. et al. A compendium of inborn errors of metabolism mapped onto the human metabolic network. **Molecular bioSystems**, v., n., p., 2012.

SAUDUBRAY, J. M.; SEDEL, F.; WALTER, J.H. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. **Journal Inherited of Metabolic Disease**. v. 29, p. 261-274, 2006.

SAUER, S.W. et al. Bioenergetics in glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a role for glutaryl-coenzyme A. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 21830-21836, 2005.

SAUER, S. W. et al. Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **The Journal of Neurochemistry**. v. 97, p. 899-910, 2006.

SCHMIDT, C. et al. Regulation of renal sodium transporters during severe inflammation. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 18, p. 1072-1083, 2007.

SCHUCK, P. F. et al. Neurotoxic effects of trans-glutaconic acid in rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. p. 607-610, 2013.

SCRIVER, C.R. Garrod's Croonian Lectures (1908) and the charter 'Inborn Errors of Metabolism': albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. v.31, p. 580-598, 2008.

SEMINOTTI, B. et al. Induction of oxidative stress in brain of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice by acute lysine administration. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 106, p. 31-38, 2012.

SERRANO, F.; KLANN, E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. **Ageing Research Reviews**. v. 3, p. 431-443, 2004.

SHAW, K.N.; COMMINS, S.; O'MARA, S. M. Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. **Behavioural Brain Research**. v. 124, p. 47-54, 2001.

SHUCK, P. F. et al. Neurotoxic effects of trans-glutaconic acid in rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. p. 607-610, 2013.

SIES, H. Role of reactive oxygen species in biological processes. **Klin Wochenschr**. v. 69, p. 965-968, 1991.

SILVA, C.G. et al. Inhibition of energy production in vitro by glutaric acid in cerebral cortex of young rats. **Metabolic Brain Disease**. v. 15, p. 123-131, 2000.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine I. Nature and biologic reactins. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 63, p. 381-389, 1988.

SQUIRE, L. R.; ZOLA-MORGAN, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems, **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 93, p. 13515-13522, 1996.

STOKKE, O.; GOODMAN, S.I.; MOE, P.G. Inhibition of brain glutamate decarboxylase by glutarate, glutaconate, and beta-hydroxyglutarate: explanation of the symptoms in glutaric aciduria? **Clinica Chimica Acta**. v. 66 p. 411-415, 1976.

STRAUSS, K. A. et al. Multimodal imaging of striatal degeneration in Amish patients with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Brain**. v. 130, p. 1905-1920, 2007.

STRAUSS, K.A. et al. Type I glutaric aciduria. Part 1. Natural history of 77 patients. **American Journal of Medical Genetics**. v. 121, p. 38-52, 2003.

STRAUSS, K.A.; Morton, H. Type I glutaric aciduria. Part 2. A model of acute striatal necrosis. **American Journal of Medical Genetics**. v. 121 p. 53-70, 2003.

ULLRICH, K. et al. Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. v. 22, p. 392-403, 1999.

VASCONCELLOS, A. P. et al. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 84, p. 102-110, 2005.

VEREKER, E., O'DONNELL, E. LYNCH, M.A. The inhibitory effect of interleukin-1beta on long-term potentiation is coupled with increased activity of stress-activated protein kinases. **Journal of Neuroscience**. v. 20, p. 6811-6819, 2000.

WAJNER, M. et al. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: Insights from animal studies. **Journal of Inherited Metabolic Disease** v. 27, p. 427-448, 2004.

WAJNER, M. et al. Organic aciduria: diagnosis in high-risk Brazilian patients. **Journal of Pediatrics**. v. 77, p. 401-406, 2001.

WILLIAMSON, L. L.; BILBO, S. D. Chemokines and the hippocampus: A new perspective on hippocampal plasticity and vulnerability. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 30, p. 186-194, 2013.

YANG, M. et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a partial extracellular fragment of a sperm membrane protein YWK-II/APPH related to the Alzheimer betaA4-amyloid precursor protein. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**. v. 59, p. 146-149, 2003.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I. Immune modulation of learning memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 25, p. 181-213, 2011.

ZIADEH, R. et al. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Pennsylvania: Neonatal screening shows high incidence and unexpected mutation frequencies. **Pediatric Research**. v. 37, p. 675-678, 1995.

ZINNANTI, W.J. et al. A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. **Brain**. v.129, p. 899-910, 2006.