

---

**INGRID TREMEL BARBATO**

**AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PELA  
INGESTÃO DE UM CONJUNTO DE AMINOÁCIDOS EM  
PORTADORES DA SÍNDROME DO X FRÁGIL: ESTUDO  
CLÍNICO E ESTUDO NEUROQUÍMICO PRÉ-CLÍNICO**

**FLORIANÓPOLIS**

**2006**

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro Tecnológico  
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**Avaliação de Estratégia Terapêutica pela Ingestão de um  
Conjunto de Aminoácidos em Portadores da Síndrome do X  
Frágil: Estudo Clínico e Estudo Neuroquímico Pré-Clínico**

INGRID TREMEL BARBATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química da Universidade Federal de Santa  
Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto (EQA/UFSC)  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Carla Inês Tasca (BQA/UFSC)

**Florianópolis, SC**

**Dezembro 2006**

---

Ingrid Tremel Barbato

**Avaliação de Estratégia Terapêutica pela Ingestão de um Conjunto de Aminoácidos em Portadores da Síndrome do X Frágil: Estudo Clínico e Estudo Neuroquímico Pré-Clínico**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

**Área de Concentração**  
**Processos Químicos e Biotecnológicos**

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
Orientador

---

Profa. Dra. Carla Inês Tasca  
Co-Orientadora

---

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**Banca Examinadora**

---

**Prof. Dr. Luismar Marques Porto - Orientador**  
**Universidade Federal de Santa Catarina - EQA/CTC**

---

**Prof<sup>a</sup> Dra Carla Inês Tasca - Co-orientadora**  
**Universidade Federal de Santa Catarina - BQA/CCB**

---

**Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré**  
**Universidade Federal de Santa Catarina - CFS/CCB**

---

**Prof<sup>a</sup> Dra Angélica Francesca Maris**  
**Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC**

---

**Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto**  
**Universidade Federal de Santa Catarina - EQA/CTC**

Florianópolis, SC, Dezembro de 2006

Barbato, Ingrid T.

Avaliação de Estratégia Terapêutica pela Ingestão de um Conjunto de Aminoácidos em Portadores da Síndrome do X Frágil: Estudo Clínico e Neuroquímico

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1. Síndrome do X Frágil – 2. Transportadores de glutamato – 3. Ingestão de aminoácidos – 4. Amônia – 5. Teste psicométrico

Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia Genômica e foi desenvolvido no Laboratório Neurogene e no Laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica (BQA), da Universidade Federal de Santa Catarina.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ernesto Tremel e Sulamita B.Tremel (*in memorium*),  
Ao meu companheiro e incentivador Jorge H. Barbato Filho, e aos meus filhos amados Mariana  
e Jorge.

Obrigado pelo carinho e amor neste momento "diferente" de nossas vidas!

Dedico este trabalho também às famílias portadoras da Síndrome do X frágil, que foram a peça  
fundamental deste projeto! Obrigada à vocês pela confiança em mim depositada!

Amo vocês!

## Agradecimentos

*“A tarefa não consiste em ver o que ninguém até hoje viu, mas em pensar o que ninguém até agora pensou sobre aquilo que todos vêem”. Arthur Schopenhauer*

Agradeço ao Professor Luismar, meu orientador, parceiro e amigo por esta oportunidade! Obrigado por me receber com carinho, respeito e amizade, acreditando com muita sabedoria na multidisciplinariedade! Obrigada, Professor, por todo o conhecimento transmitido!

À minha Co-Orientadora e colaboradora Professora Dra. Carla Tasca, que me fez deslumbrar com tantos novos conhecimentos. Obrigada pela oportunidade de ter-me feito parte do Laboratório de Neuroquímica. Não posso deixar de agradecer ao Pedro, que cooperou conosco enquanto no seu ventre.

Agradecimento especial às minhas amigas e colaboradoras: Kátia, Maria João, Mariana, Pricila, Tânia, Lubna e Célia, do Laboratório Neurogene, que me proporcionaram tranqüilidade neste momento tão especial de minha vida! Desculpem as ausências!  
Um beijo especial em cada uma de vocês!

Agradeço em especial as amigas e colegas Maria Cristina, Pricila e Mariana que me ajudaram a complementar este trabalho.

A todos os colegas do laboratório InteLAB que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado, em especial: Gisele, Derce e Artiva. A ajuda de vocês me sentiu um pouco “engenheira química”. Vocês foram essenciais nesta jornada. Sempre lembrarei de vocês com muito carinho.

Aos novos amigos encontrados no Laboratório de Neuroquímica, tão gentis e amáveis comigo. Obrigada pela incansável ajuda, em especial à Cristiane, Ellen, Tarine, Sheila e Bruno, que me auxiliaram nos meus experimentos e na realização deste trabalho.

Ao Laboratório LBE, principalmente nas pessoas de José Guerra e Graça, obrigada por cada frasco fornecido aos nossos queridos pacientes X Frágil! Vocês foram os grandes responsáveis pela mudança destas vidas!!!

Aos meus pais, meu marido, meus filhos, minhas irmãs, por todo amor e carinho e pelo apoio. Vocês são a minha vida! A todas as pessoas que se envolveram direta e indiretamente com meus estudos, obrigada pelas palavras de incentivo e compreensão, em especial à Tânia, Helta, Rodrigo e Thayná, amo vocês!!!

***Em especial agradeço a Deus, e aos meus especiais “anjos” que sempre me acompanharam e iluminaram cada minuto de minha vida! Sem esta luz e força jamais poderia irradiar e vislumbrar esta inesquecível experiência!***

---

Resumo da Dissertação apresentada à UFSC como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

## **AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PELA INGESTÃO DE UM CONJUNTO DE AMINOÁCIDOS EM PORTADORES DA SÍNDROME DO X FRÁGIL: ESTUDO CLÍNICO E ESTUDO NEUROQUÍMICO PRÉ-CLÍNICO**

Ingrid Tremel Barbato

Dezembro/2006

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Área de Concentração: Processos Químicos e Biotecnológicos

Palavras-chave: Síndrome do X Frágil, Transportadores de glutamato, Ingestão de aminoácidos, Amônia, Testes psicométricos

Número de Páginas: 158

O presente trabalho aborda uma estratégia terapêutica através da ingestão de um conjunto de aminoácidos (Face®) na Síndrome do X Frágil (SXF). Esta dissertação se propôs a realizar o estudo clínico, randomizado, duplo cego, aplicação de testes psicométricos, e a realizar estudos neuroquímicos experimentais em ratos Wistar. Esta pesquisa objetivou exclusivamente estudar o conjunto de aminoácidos como um produto natural terapêutico sem, no entanto, considerar o efeito individual de seus componentes bioquímicos. O estudo clínico foi realizado através de questionário (antes e após intervenção) em 43 portadores da SXF, mostrando significância nos sintomas aprendido, comportamental e emocional em pacientes zona gray e afetados. Os pacientes pré-mutados não apresentaram diferenças estatísticas significantes. Os testes psicométricos aplicados foram: Teste Escala de Traços Autistas (ATA), Mini-Exame do Estado Mental e Escala de comportamento adaptativo de Vineland, em 13 sujeitos afetados (antes e pós-intervenção). Os resultados dos três testes foram significantes nos indivíduos afetados estudados, mostrando alterações positivas importantes na área cognitiva, aprendizado, comportamento social e, surpreendentemente, com melhoras em suas características autistas. Também foram realizados ensaios laboratoriais em animais (ratos Wistar) para avaliação da atividade dos transportadores de glutamato, determinação da concentração da amônia (verificação de toxicidade) e viabilidade celular, depois de tratados 60 dias oralmente com a mistura de aminoácidos (Face®) e com grupo controle. Alterações significantes foram encontradas nas atividades dos transportadores de glutamato dependente de  $\text{Na}^+$  e independente de  $\text{Na}^+$  no hipocampo, após 30 dias de administração dos aminoácidos. O Face® mostrou ser um produto não tóxico que ativa o sistema glutamatérgico, e com boa viabilidade celular, produzindo efeitos significativos no estado mental, no comportamento característico autista e no comportamento social, na aprendizagem, e no que tange às características emocionais dos indivíduos estudados.

---

Abstract of Dissertation presented to UFSC as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Chemical Engineering.

**EVALUATION OF THERAPEUTIC STRATEGY THROUGH INTAKE OF AN AMINOACID POOL BY FRAGILE X SYNDROME CARRIERS: CLINICAL AND NEUROCHEMICAL PRECLINICAL STUDY**

Ingrid Tremel Barbato

December/2006

Advisor: Prof. Luismar Marques Porto

Area of Concentration: Chemical and Biotechnological Processes.

Keywords: Fragile X Syndrome, Glutamate transporters, Aminoacids intake, Ammonia, Psicometric tests

Number of Pages: 158.

The current work approaches a therapeutic strategy for the Fragile X Syndrome (FXS) by the intake of a pool of aminoacids (Face®). This dissertation implemented a randomized, double blind, clinical study, application of psychometric tests and neurochemical experimental studies with Wistars rats. This research concerned exclusively to study the pool of aminoacids as a therapeutic natural product, without nonetheless considering the individual effect of its biochemical components. The clinical study was implemented through a questionnaire (before and after intervention) applied to 43 FXS patients, showing significance for the symptoms of learning, behavior and emotions of pre-mutation and affected patients. The gray zone patients did not present significant results. The following psychometric exams were applied (before and after intervention) to 13 affected individuals: Autistic traits evaluation (ATA Test), Mini-Exam of Mental State, and Vineland Adaptive Behavior Scales. The results for the three tests have been significant for the affected individuals under study, showing important positive changes in cognitive area, learning, social behavior and, surprisingly, with respect to their autistic characteristics. There have been also accomplished laboratorial experiments with animal models (Wistars rats) in order to evaluate the activity of glutamate transporters, to determinate the concentration of ammonia (toxicity) and cellular viability, after being treated for 60 days with oral intake of the aminoacid pool (Face®) and with saline control solution. Significant changes were found in the Na<sup>+</sup> dependent and Na<sup>+</sup> independent glutamate transporters, after 30 days of intake. Face® has shown to be a nontoxic product, which activates the glutamatergic system, with a good cellular viability. It produced significant effects on mental state, characteristic autistic and social behaviors, on learning, and on related emotional characteristics of the subjects studied.

## Sumário

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>7</b>
<b>RESUMO DA DISSERTAÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT OF DISSERTATION</b> .....	<b>9</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
1.1 MOTIVAÇÃO DO TRABALHO .....	25
1.2 OBJETIVOS .....	27
1.2.1 <i>Objetivos gerais</i> .....	27
1.2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	27
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
2.1 SÍNDROME DO X FRÁGIL.....	29
2.1.1 <i>Aspectos clínicos</i> .....	30
2.1.2 <i>Animais modelo</i> .....	32
2.1.3 <i>Proteína FMRP</i> .....	33
2.1.4 <i>Tratamento da SXF</i> .....	38
2.2 AMINOÁCIDOS .....	42
2.2.1 <i>Propriedades químicas dos aminoácidos</i> .....	42
2.2.2 <i>Metabolismo dos aminoácidos</i> .....	43
2.2.3 <i>Sistemas de transporte de aminoácidos</i> .....	45
2.2.4 <i>Utilização dos aminoácidos como terapia</i> .....	47
2.2.5 <i>O “pool” de aminoácidos Face®</i> .....	50
2.3 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.....	51
2.3.1 <i>Receptores de glutamato</i> .....	53
2.3.2 <i>Sistemas de transportadores de glutamato</i> .....	54
2.3.3 <i>Sistema de transporte dependente de Na<sup>+</sup></i> .....	59

2.3.4	<i>Sistema de transporte independente de Na<sup>+</sup></i> .....	61
2.4	AMÔNIA .....	66
2.4.1	<i>Condições fisiológicas da amônia</i> .....	66
2.4.2	<i>Amônia e seu metabolismo</i> .....	67
2.4.3	<i>O ciclo glutamato–glutamina</i> .....	69
2.4.4	<i>Interação da amônia com o sistema glutamatérgico no cérebro</i> .....	71
2.4.5	<i>O NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: via de transporte dos aminoácidos</i> .....	72
2.4.6	<i>Efeitos da amônia e transportadores de glutamato</i> .....	72
2.4.7	<i>Efeitos da amônia nos receptores de glutamato: AMPA e NMDA</i> .....	74
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>78</b>
3.1	ESTUDOS CLÍNICOS .....	78
3.1.1	<i>Aplicação de questionário para a avaliação clínica</i> .....	79
3.1.2	<i>Termo de consentimento esclarecido (TCLE)</i> .....	79
3.1.3	<i>Reagentes</i> .....	80
3.1.4	<i>Administração do Face®</i> .....	81
3.1.5	<i>Avaliação estatística</i> .....	82
3.2	TESTES PSICOMÉTRICOS.....	82
3.2.1	<i>Aplicação dos testes psicométricos</i> .....	83
3.2.2	<i>Avaliação estatística</i> .....	83
3.3	ESTUDO EXPERIMENTAL COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO .....	84
3.3.1	<i>Reagentes para a captação de glutamato</i> .....	84
3.3.2	<i>Reagentes para determinação da concentração de amônia</i> .....	84
3.3.3	<i>Equipamentos</i> .....	84
3.3.4	<i>Ensaio da captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato em fatias de hipocampo e córtex</i> ...	87
3.3.5	<i>Dosagem de proteína</i> .....	88
3.3.6	<i>Análise estatística dos ensaios de captação de glutamato</i> .....	89
3.4	VIABILIDADE CELULAR .....	89
3.5	DETERMINAÇÃO DA AMÔNIA NAS ESTRUTURAS DE HIPOCAMBO, CEREBELO E CÓRTEX	
	90	
3.5.1	<i>Análise estatística da amônia</i> .....	90
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>91</b>
4.1	ESTUDO CLÍNICO .....	91
4.2	TESTES PSICOMÉTRICOS.....	96

---

4.3	ESTUDOS EXPERIMENTAIS COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO .....	101
4.3.1	<i>Estudos da neurotransmissão glutamatérgica através da captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato em fatias de hipocampo.....</i>	<i>102</i>
4.3.2	<i>Estudos da neurotransmissão glutamatérgica através da captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato em fatias de córtex cerebral .....</i>	<i>105</i>
4.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIA EM HOMOGENATOS DE HIPOCAMPO, CÓRTEX E CEREBELO .....	108
4.4.1	<i>Homogenato de hipocampo.....</i>	<i>108</i>
4.4.2	<i>Homogenato de córtex cerebral.....</i>	<i>109</i>
4.4.3	<i>Homogenato de cerebelo.....</i>	<i>109</i>
4.5	ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR (MTT) EM FATIAS DE HIPOCAMPO.....	111
4.6	EVOLUÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS AO LONGO DOS EXPERIMENTOS .....	112
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>113</b>
5.1	EFEITO DO <i>POOL</i> DE AMINOÁCIDOS FACE® .....	113
5.2	ESTUDOS CLÍNICOS – TESTES PSICOMÉTRICOS .....	115
5.3	SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.....	116
5.3.1	<i>Captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato no hipocampo .....</i>	<i>116</i>
5.3.2	<i>Aumento da captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato independente de Na<sup>+</sup> no hipocampo</i> <i>118</i>	
5.3.3	<i>Atuação da captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato dependente e independente de Na<sup>+</sup> no</i> <i>córtex cerebral.....</i>	<i>119</i>
5.3.4	<i>Efeito do Face® no hipocampo.....</i>	<i>119</i>
5.3.5	<i>Efeito da amônia nas estruturas hipocampo, córtex cerebral e cerebelo.....</i>	<i>120</i>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>122</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>123</b>
	<b>ANEXO 1 – TABELA DE FENÓTIPOS PARA SXF (QUESTIONÁRIO) .....</b>	<b>141</b>
	<b>ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....</b>	<b>143</b>
	<b>ANEXO 3 – ESCALA DE COMPORTAMENTO ADAPTATIVO VINELAND</b> <b>(VINELAND ADAPTIVE BEHAVIOR SCALES).....</b>	<b>144</b>
	<b>ANEXO 4 – ESCALA DE TRAÇOS AUTÍSTICOS (ATA) .....</b>	<b>157</b>

## Lista de Figuras

- Figura 1. Modelo da função da Proteína do Retardo Mental na SXF (FMRP) no neurônio, de acordo com JIN e WARREN (2004)..... 35
- Figura 2. A origem dos aminoácidos no organismo ocorre através de três formas: a) proteínas da dieta: são degradadas pelas proteases do tubo digestivo e usadas no sistema de transportadores de aminoácidos nas células (co-transportadores específicos e ciclo do glutamato); b) a degradação de proteínas celulares através das proteases celulares (lisossomas, proteossomas, etc), c) a própria biossíntese dos aminoácidos que ocorre a partir de aminoácidos precursores não essenciais..... 43
- Figura 3. Esquema representativo da ingestão de proteína no homem. Adaptado de <http://www.unican.es>. Universidade Cantábria. Departamento de Biologia Molecular. Acesso em julho 2006. .... 45
- Figura 4. Sistema de transporte de aminoácidos. Diagrama do sistema de transporte dos aminoácidos no endotélio capilar cerebral, sua localização na capilaridade luminal (frente para o plasma) ou abluminal (frente para o cérebro). Os sistemas sombreados são sódio-dependentes, enquanto os não sombreados são sódio-independentes. Adaptado de SMITH (2000). .... 47
- Figura 5. O glutamato depois de liberado na fenda sináptica será removido do fluido extracelular pelos diversos tipos de transportadores de glutamato. Fonte: Danbolt, 2001. .... 60
- Figura 6. Estrutura química da cistina..... 63
- Figura 7. Estrutura química da glutathione ..... 64
- Figura 8. Modelo do ciclo cistina/cisteína. Adaptado de BANNAI et al. (1989), SATO et al. (2002) e GASOL et al. (2004). A cistina (CyS) é captada do fluido cérebro-espinhal através do sistema  $x_c^-$ , é reduzida a cisteína (CySH), e utilizada principalmente na síntese de glutathione (GSH). A cisteína deixa a célula através dos transportadores de aminoácidos neutros (sistema L). Mesmo que a cisteína seja oxidada rapidamente, a cistina do meio extracelular sistema  $x_c^-$  é encarregada de recuperá-la. .... 65
- Figura 9. Formação do glutamato e glutamina, sob ação das enzimas glutamina sintetase, (GS), desidrogenase de glutamato (GDH), e sintetase de glutamato (GOGAT). Fonte: LOUREIRO, 2005..... 69

---

Figura 10. Localização do GLT-1 da sinapse glutamatérgica na membrana do astrócito. Fonte: Butterworth, 2002.....	74
Figura 11. O receptor (NMDA-R) medeia a via de tradução do óxido nítrico (NO) e GMP cíclico. Da exposição aguda de amônia resultará estimulação da via levando um aumento de $Ca^{+}$ , aumentando a síntese de toda a via. O aumento do NO poderá causar danos na mitocôndria, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio e falha na energia. O NO deverá também difundir para os astrócitos onde inibirá a glutamina sintetase (GS) (Butterworth, 2001). .....	75
Figura 12. Metodologia empregada para os experimentos com animais (Ratos Wistar).....	87
Figura 13. Teste de escala de comportamento adaptativo Vineland em relação ao total de pontos, mostrando os resultados antes e depois do Face®. ....	98
Figura 14. Teste de escala de comportamento adaptativo Vineland em relação à idade social, mostrando os resultados antes e depois do Face®. ....	99
Figura 15. Teste de escala de comportamento adaptativo Vineland em relação ao quociente social, mostrando os resultados antes e depois do Face®. ....	99
Figura 16. Teste de escala ATA, mostrando os resultados antes e depois do Face®. ....	100
Figura 17. Teste MMSE, mostrando os resultados antes e depois do Face®. ....	100
Figura 18. Diagrama das avaliações e resultados experimentais. ....	101
Figura 19: Captação de glutamato total, independente de $Na^{+}$ e dependente de $Na^{+}$ em fatias de hipocampo, aos 15 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. Não houve diferença estatística. ....	103
Figura 20. Captação de glutamato total, independente de $Na^{+}$ e dependente de $Na^{+}$ em fatias de hipocampo, aos 30 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. Não houve diferença estatística. ....	103
Figura 21. Captação de glutamato total, independente de $Na^{+}$ e dependente de $Na^{+}$ em fatias de hipocampo, aos 45 dias. Os dados estão representados como média e seus respectivos desvios padrão. Não houve diferença estatística. ....	104
Figura 22. Captação de glutamato total, independente de $Na^{+}$ e dependente de $Na^{+}$ em fatias de hipocampo, aos 60 dias. Os dados estão representados como média e seus respectivos desvios padrão. Não houve diferença estatística. ....	105
Figura 23: Captação de glutamato total, independente de $Na^{+}$ e dependente de $Na^{+}$ em fatias de córtex, aos 15 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. Não houve diferença estatística. ....	106

---

Figura 24. Captação de glutamato total, independente de Na <sup>+</sup> e dependente de Na <sup>+</sup> em fatias de córtex, aos 30 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. Não houve diferença estatística. ....	107
Figura 25. Captação de glutamato total, independente de Na <sup>+</sup> e dependente de Na <sup>+</sup> em fatias de córtex, aos 45 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. Não houve diferença estatística. ....	107
Figura 26. Captação de glutamato total, independente de Na <sup>+</sup> e dependente de Na <sup>+</sup> em fatias de córtex, aos 60 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. ....	108
Figura 27. Determinação de amônia em homogenato de hipocampo aos 15, 30, 45, e 60 dias..	109
Figura 28. Determinação de amônia em homogenato de córtex aos 15, 30, 45, e 60 dias. ....	110
Figura 29. Determinação de amônia em homogenato de cerebelo aos 15, 30, 45, e 60 dias.....	110
Figura 30. Através do Método MTT, foi determinada a viabilidade celular. As fatias de hipocampo tratadas com salina e Face® durante 60 dias foram analisadas.....	111
Figura 31. Evolução do peso dos ratos em função do tempo.....	112

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Formulações comerciais vigentes em Novembro de 2005 .....	49
<b>Tabela 2.</b> Diferentes tipos de transporte e suas isoformas clonadas, com suas respectivas associações. As isoformas de um mesmo sistema variam pela afinidade e especificidade de substrato, ajustando-se à função do tecido, e no que se expressa o transportador (Original de Broer e Wagner, 2002). Fonte: Gasol, 2004.....	57
<b>Tabela 3.</b> Tabela mostrando algumas condições nutricionais associadas com dano oxidativo. ..	66
<b>Tabela 4.</b> Composição da mistura de aminoácidos Face®, determinado por HPLC pela Universidade Nacional da Colômbia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Toxicologia (Obs.: Cisteína não pode ser analisada). .....	81
<b>Tabela 5.</b> Grupo Placebo, distribuído em categorias, mostrando os sintomas presentes nos participantes. São apresentados o número de indivíduos sintomáticos (Antes), e o número de indivíduos que obtiveram melhoras (Depois) após intervenção.....	92
<b>Tabela 6.</b> Grupo Face®, distribuído em categorias, mostrando os sintomas presentes nos participantes. São apresentados o número de indivíduos sintomáticos (Antes), e o número de indivíduos que obtiveram melhoras (Depois) após intervenção.....	93
<b>Tabela 7.</b> Sinais específicos dos 29 indivíduos (afetados, pré-mutados e zona gray) antes (A) e depois (D) de medicados com Face®. São dados também os respectivos percentuais em relação ao total de indivíduos considerados em cada categoria. ....	94
<b>Tabela 8.</b> Pontuação dos Testes Psicométricos (Teste ATA, MMSE e Escala de Comportamento Adaptativo de Vineland) aplicados em 10 indivíduos afetados antes e após intervenção com Face®. Não existiu grupo controle.....	97

## Lista de Abreviaturas

5-HT	Serotonina
AAS	Aminoácidos
ADNPM	Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor
ADP	Adenosina-5'-difosfato
ALF	Falência Hepática Crônica e Aguda
AMP	Adenosina-5'-Monofosfato
AMPA	Ácido Alfa-amino-3-Hidróxi-5 Metil-4-Isoxazolepropiónio
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BBB	<i>Blood Brain Barrier</i> (Barreira Hemato-Encefálica)
BHE	Barreira Hematoencefálica
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CGG	Citosina, Guanina, Guanina
cGMP	Monofosfato Guanosina Cíclica
Cys	Cistina
CySH	Cisteína
DEM	Dietilmaleato
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Ácido Desoxiribonucleico
EAAT	Transportador de Aminoácido Excitatório
EDRF	Fator Relaxante Derivado do Endotélio
FMR1	Fragile X Mental Retardation 1
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
FXTAS	Fragile X Associated Tremor/Ataxia Syndrome, Síndrome de Tremor/Ataxia Associada ao X Frágil
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GDH	Glutamato Dehidrogenase
GLAST	Transportador Astrocitário de Glutamato e Aspartato
Gli	Glicina
Gln	Glutamina
GLT-1	Transportador Astrocitário de Glutamato-1
Glu	Glutamato
GLY-1	Glycine Transporter
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GS	Glutamina Sintetase
GSH	Glutationa
HE	Encefalopatia Hepática
HEPES	Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etanossulfônico
HSHAT	<i>Heavy Subunit Heteromeric Amino Acid Transporter</i>
KA	Cainato
LAC	L-acetilcarnetina
LBE	Laboratório de Biotecnologia para a Vida
LSHAT	<i>Light Subunit Heteromeric Amino Acid Transporter</i>
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
mGluR	Receptor metabotrópico

---

mGluR5	Receptor metabotrópico - tipo 5
mRNA	Messenger RNA, RNA mensageiro
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
NE	Nutrição Enteral
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
NP	Nutrição Parenteral
PAG	Glutaminase Fosfato Ativada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
POF	Falha Ovariana Precoce
RM	Retardo Mental
RNA	Ribonucleic Acid, Ácido Ribonucléico
RNP	Ribonucleoproteína
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Superóxido Dismutase
SXF	Síndrome do X Frágil
TDA-H	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UTR	<i>Untranslated Region</i> , Região Não Traduzida

---

# 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A síndrome do X Frágil (SXF) é a mais comum doença com retardo mental herdado. Sua causa é devida a um gene com mutação instável, localizado no cromossomo X, chamado “fragile X mental retardation-1” (FMR1) (VERKERK et al., 1991). Numerosos estudos mostram diferentes prevalências em relação à síndrome. A prevalência mais utilizada para indivíduos afetados é de aproximadamente 1/4000 homens e 1/8000 mulheres (HAGERMAN et al., 1992). A prevalência estimada em homens chamados pré-mutados é de 1/810, e de 1/257 mulheres na população normal (SHERMAN, 2002). A síndrome é causada por uma expansão de repetições de CGG (citosina-guanina-guanina) que estão localizadas na região promotora do gene FMR1. A classificação pela repetição de CGG irá diferenciar os portadores em categorias, ou seja, quando de 6 até 44 repetições são classificados como indivíduos normais; de 45 até 54 repetições, zona gray (zona limítrofe); de 55 até 200 repetições, indivíduos pré-mutados; e com 200 até milhares de repetições são chamados de afetados para a SXF (HAGERMAN e HAGERMAN, 2004). Testes de DNA são utilizados para diagnosticar a SXF. A análise de repetições de CGG do gene FMR1 através da Reação em Cadeia da Polimerase, PCR, (BROWN et al., 1993) é a técnica mais acessível, e é utilizada atualmente como um teste de triagem. Quando da necessidade de investigar o gene expandido e determinar o estado de metilação do DNA, utiliza-se a técnica de Southern Blotting (ROSSEAU et al., 1991b). Quando ocorre, a expansão dos trinucleotídeos CGG nos indivíduos afetados resultará em uma hipermetilação da repetição CGG na região

promotora adjacente do gene e, em consequência, a perda da proteína FMRP (Fragile Mental Retardation Protein) (FARZIN et al., 2006), expressa pelo gene FMR1.

A proteína FMRP é expressa com maior abundância no cérebro e testículo de tecidos fetais e adultos (DEVYS et al., 1993). É uma proteína ligante de RNA, a qual forma ribonucleoproteínas mensageiras complexas (mRNP) que estão associadas com a tradução de poliribossomos (JIN e WARREN, 2003). A proteína FMRP é importante no desenvolvimento e maturação dos dendritos e conexões sinápticas (WILLEMSEM et al., 2004 ; IRWIN, 2001) e sua ausência é responsável pelas deficiências cognitivas, físicas e comportamentais, características da SXF (TASSONE, 1999; LOESCH et al., 2004). Para melhor compreender a função da proteína FMRP foram projetados modelos usando-se camundongos KO (Knockout) *fmr1*, *Drosophila melanogaster* (mosca das frutas), gene *dmfr1*, (ABITBOL, 1993; HINDS 1993), e o nematóide *Caenorhabditis elegans* (SHTANG et al., 1999).

Tanto em estudos animais como em humanos, FENG (2002) constatou dois papéis importantes da FMRP nos neurônios: na formação e maturação das sinapses através do controle de sinais durante seu desenvolvimento, e na resposta da liberação dos neurotransmissores, controlando a localização e/ou a tradução dos mRNAs associados à região pós-sináptica. Estudos envolvendo a plasticidade sináptica no hipocampo do camundongo Knockout *fmr1* sugerem que quando os receptores de glutamato são ativados, em especial o estudo do receptor metabotrópico (mGluR), estes promovem melhorias em relação ao fenótipo da SXF. Foi sugerido que o papel da FMRP na plasticidade sináptica tem relação com o fato de que a FMRP é uma das

---

proteínas sintetizadas em resposta à ativação do mGluR (WEILER e GREENOUGH, 1999).

Clinicamente, a síndrome é bastante heterogênea. Fenotipicamente, pode-se encontrar: orelhas grandes e/ou abano, macroorquidismo, face alongada, e outras características físicas marcantes, além de características comportamentais como irritabilidade, dificuldade de atenção, pobreza de contato visual, fala repetitiva, sintomas autísticos, e estereotípias. Indivíduos com SXF podem apresentar também pobre coordenação motora e aumento de crises convulsivas (BEAR et al., 2004).

Diversos instrumentos foram desenvolvidos durante os últimos anos com o objetivo de auxiliar na investigação de possíveis déficits cognitivos em indivíduos de risco, como é o caso das doenças comportamentais, com alteração na cognição e em relação à deficiência mental. Pacientes com a SXF, como os de outras doenças de retardo mental, utilizam-se de testes psicométricos para a avaliação e compreensão do estado comportamental, cognitivo e emocional. Dependendo do conjunto de sintomas que o indivíduo apresenta, um teste específico será aplicado. Os testes escolhidos para a SXF são os que estão diretamente envolvidos com o comportamento, cognição e estado emocional. Um dos estudos bastante utilizados para analisar o estado mental é o MMSE (*Mini-mental state examination*) ou Mini-teste do estado mental (FOLSTEIN et al., 1975). É avaliado através de escores. Quando sua pontuação é acima de 24 é considerado efetivamente normal. Neste teste deve ser levado em conta o grau de escolaridade e a idade cronológica do indivíduo. Quando o teste relata uma baixa pontuação, o diagnóstico será de deficiência mental (FOLSTEIN et al., 1975).

Aproximadamente 20% de indivíduos com a SXF podem apresentar alterações autísticas, por manifestarem falhas na interação social, alteração na linguagem, estereotípias, olhar evasivo, etc. Por ser uma doença não fisiológica, intervenções com base em exame neurológico e psicológico podem auxiliar os indivíduos quanto à sua interação na sociedade. Testes psicométricos são então aplicados nestes indivíduos para determinação de seu diagnóstico.

A identificação de autismo é de fundamental importância, e as escalas de avaliação permitem mensurar as condutas apresentadas de maneira a se estabelecer um diagnóstico de maior confiabilidade. Apresentam-se estas sob a forma de questionários, de lista de sintomas ou de inventários. Essas escalas, inspiradas nas ciências exatas, embora utilizadas algumas vezes de maneira indiscriminada, podem ser aplicadas na criança para avaliação de aspectos específicos do comportamento. Dessa maneira, devem ser utilizadas para pesquisa ou para avaliação da evolução de determinados quadros. A escala de traços autísticos (ATA), elaborada por BALLABRIGA e colaboradores (1994), nasceu a partir da discussão dos aspectos mais significativos da síndrome e da experiência clínica dos autores, sendo, entretanto, embasada na classificação dos critérios para o retardo mental.

Alterações de comportamento são frequentemente observadas na maioria dos indivíduos com SXF. Testes como a escala de maturidade social de Vineland medem a competência social, habilidade da auto-ajuda, e comportamentos adaptativos na infância e nos indivíduos adultos. Este teste é utilizado em terapias de indivíduos com retardo mental e doenças emocionais.

Quando nos deparamos com indivíduos afetados, devemos ter em mente a melhora da qualidade de vida dos pacientes e de suas famílias. Intervenções multidisciplinares e tratamentos sintomáticos devem, portanto, ser utilizados. Geralmente, o tratamento para a SXF não é específico, e diferentes tipos de drogas sintomáticas já foram utilizados no sentido de amenizar os sintomas. Alguns produtos contendo aminoácidos são utilizados no tratamento de indivíduos para diferentes fins. Por exemplo, o composto GABALLON®, através de seu princípio ativo GABA I (Ácido aminobutírico + vitamina B<sub>6</sub>), atua como neurotransmissor inibitório em diferentes vias do sistema nervoso central (SNC); é indicado no tratamento de dificuldades de atenção e concentração, déficit de memória, dificuldades de aprendizagem, hiperatividade, agitação psicomotora e outras alterações secundárias em relação aos distúrbios da atividade cerebral, mas nunca foi testado especificamente para a Síndrome do X frágil. TORRIOLI (1999) e CALVANI (2001) apresentaram uma alternativa para pacientes SXF com comportamento hiperativo. Usando L-acetilcarnitina (molécula da família da metilamina) demonstraram em um pré-estudo clínico que a administração exógena de LAC (L-acetilcarnitina) pode alterar características cerebrais de pacientes com a SXF, diminuindo a hiperatividade após 12 meses de uso.

Estudos clínicos, em fase adiantada, estão sendo realizados com as ampaquinas (moduladoras do receptor AMPA). Este tratamento vem sendo testado pela Fundação FRAXA, de Chicago, e pelo Instituto MIND, da Califórnia, em humanos adultos com a SXF e autismo, sob o nome CX516 (BERRY-KRAVIS et al., 2006). Através do estudo duplo-cego, randomizado de Fase II, em 49 sujeitos com a SXF, resultados recentes mostraram que não houve significância como era esperado na cognição e no

comportamento. Esses resultados deixam dúvida sobre o papel da neurotransmissão mediada através do modulador AMPA como uma estratégia terapêutica para o tratamento da SXF.

O carbonato de lítio é uma droga de uso comum para o tratamento do transtorno bipolar e outras alterações psiquiátricas. É usado também para o aumento da cognição nos modelos de X Frágil de drosófilas *knockout* (McBRIDE et al., 2005). Um estudo multicêntrico em relação ao lítio está sendo realizado nos serviços da Universidade da Califórnia, em Davis, e em Los Angeles, e no Rush Medical Center, em Chicago, para avaliar seus benefícios na SXF (AMARIA et al., 2001). Novas drogas estão sendo desenhadas com intuito de modular especialmente o receptor metabotrópico de glutamato mGluR5, da família mGluR, através de seus respectivos antagonistas.

Sabe-se que alguns aminoácidos são considerados tratamento de suporte e alternativa terapêutica nutricional, principalmente em situações críticas como desnutrição, prematuridade, na recuperação do baixo peso, manutenção do metabolismo, catabolismo e anabolismo celular. Países de baixa renda, principalmente os da América do Sul, vêm produzindo trabalhos nesta área, já que as formulações de aminoácidos são mais acessíveis do que muitas medicações comerciais (<http://www.digemid.minsa.gob.pe>, acessado em 25/10/2006). Alguns aminoácidos tais como o glutamato, a glicina e o aspartato são também importantes para o abastecimento metabólico dos astrócitos e neurônios no nível do sistema nervoso central (SNC) (SMITH, 2000).

Um conjunto de aminoácidos denominado Face® é produzido pelo Laboratório LBE, no Município de São José, Estado de Santa Catarina. Este “pool” é sintetizado a

partir de produtos orgânicos, e tem sido utilizado como agente terapêutico em diversas doenças (GUERRA e AMAYA-FARFAN, 1995). O Face® é uma mistura de aminoácidos livres, de acordo com o fabricante. Trata-se de um produto de natureza orgânica, obtido por síntese, através de elevadas temperaturas e pressão controlada, com repasse de descarga elétrica. Durante o processo, é sintetizada uma gama de aminoácidos solúveis em água, conforme informações fornecidas pelo Laboratório LBE.

## 1.1 MOTIVAÇÃO DO TRABALHO

Em 2001, dois irmãos afetados pela SXF, moradores de Florianópolis, SC, realizaram de forma empírica um tratamento à base do conjunto de aminoácidos conhecido como Face®, apresentando excelentes resultados no ganho de aprendizagem, comportamento e emoção. Seus professores, terapeutas e familiares, constataram progressos significativos no desenvolvimento neurológico dos meninos afetados.

Com o propósito de testar esse produto como uma possível nova terapia medicamentosa para os portadores de SXF, foi submetido um projeto ao Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina. Inicialmente foi realizado um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado com placebo em 43 pacientes portadores (afetados, zona gray e pré-mutados).

Os resultados foram animadores e após este estudo inicial outro projeto foi realizado utilizando treze (13) novos sujeitos afetados. Estes sujeitos participaram de 3 diferentes testes psicométricos, antes e após a intervenção com a mistura de aminoácidos.

Um estudo posterior foi realizado devido à necessidade de se comprovar cientificamente as melhorias clínicas, principalmente em nível de aprendizagem e memória.

Sabendo-se que o aumento da concentração de glutamato durante a neurotransmissão glutamatérgica é altamente regulada por proteínas transportadoras localizadas na membrana plasmática dos neurônios e das células gliais, um estudo pré-clínico experimental com ratos Wistars foi realizado.

A partir desses estudos iniciais, o projeto foi direcionado ao estudo do comportamento dos transportadores de glutamato nas estruturas cerebrais de hipocampo e córtex em animais tratados e não tratados com o Face®. Uma preocupação inicial foi uma possível toxicidade pela amônia no tecido cerebral, já que os pacientes estariam ingerindo um *pool* de aminoácidos por um período de tempo elevado (60 dias). Estudos anteriores mostraram que o aumento extracelular da concentração de glutamato está significativamente correlacionado com o aumento da concentração de amônia. Tanto a hiperamonemia crônica como aguda, bem como as hiperamonemias adquiridas, causam um efeito deletério, dependendo da magnitude e a duração do tempo exposto pelos níveis de amônia no cérebro (FELIPO e BUTTERWORTH, 2002). Portanto, outro objetivo foi quantificar a amônia em tecidos cerebrais como no hipocampo, córtex e cerebelo, e ao final do tratamento realizar um estudo de viabilidade celular (MTT). Nosso trabalho objetivou exclusivamente estudar este *pool* de aminoácidos como um produto natural terapêutico sem, no entanto, identificar sua composição bioquímica detalhada.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 *Objetivos gerais*

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar um possível tratamento para os diversos sintomas da SXF, principalmente no que diz respeito à aprendizagem, o comportamento e os problemas emocionais causados pela síndrome, de forma a poder amenizar os sintomas e melhorar o relacionamento familiar e social dos indivíduos com SXF. Desta forma, os estudos deveriam mostrar o efeito do conjunto de aminoácidos denominado Face® (Laboratório LBE, São José, SC) com relação a seus possíveis efeitos terapêuticos.

### 1.2.2 *Objetivos específicos*

- ▣ Avaliar através de um questionário de sintomas os resultados do estudo clínico duplo-cego, randomizado, em 43 pacientes com a SXF.
- ▣ Aplicar testes psicométricos em 13 pacientes afetados pela SXF, utilizando-se de três testes: teste ATA – escala de avaliação autista; MMSE – Mini-Exame de Estado Mental, e o teste de escala de comportamento adaptativo de Vineland.
- ▣ Avaliar a atividade dos transportadores de glutamato em ratos tipo Wistars normais, através da captação de L<sup>[3H]</sup>-glutamato em fatias de hipocampo e córtex, aos 15, 30, 45 e 60 dias após ingestão do *pool* de aminoácidos Face® e de um grupo salina (controle).

- ❑ Determinar a concentração de amônia nos tecidos de hipocampo, córtex e cerebelo, por colorimetria.
- ❑ Determinar a viabilidade celular através da metodologia MTT.

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Síndrome do X Frágil

A síndrome do X Frágil (SXF) é a doença hereditária mais comum, e é considerada a segunda doença com retardo mental mais freqüente após a Síndrome de Down. É uma doença ocasionada pelo distúrbio do neurodesenvolvimento, devido a um gene com mutação instável, localizado no cromossomo X, chamado "Fragile X Mental Retardation-1 (FMR1) (VERKERK, 1991). Diversos estudos mostram a prevalência em relação à síndrome, sendo que a mais aceita para indivíduos afetados é de aproximadamente 1/4000 homens e 1/8000 mulheres (HAGERMAN et al., 1992). A prevalência estimada em homens chamados pré-mutados é de 1/810, e de 1/257 para mulheres, na população normal (SHERMAN, 2002).

A síndrome é causada devido a uma expansão de repetições de CGG (citosina-guanina-guanina) na região não traduzida (UTR) do gene FMR1 e uma hipermetilação das ilhas CpG à montante do gene (Região *upstream* 5') (VERKERK et al., 1991). As ilhas CpG (citosina-fosfato-guanina) ocorrem na maioria dos mamíferos, como um agrupamento de dinucleotídeos, formados de bases citosina e guanina adjacentes, nos quais a citosina poderá sofrer metilação. Estas regiões chamadas de ilhas CpG em células normais estão protegidas da adição de metila. As ilhas CpG são encontradas em

todos os genes em regiões ativas, os promotores, que são seqüências reguladoras presentes na extremidade 5' do DNA, logo antes do início do gene que será transcrito. Se ocorrer metilação, o promotor é silenciado, interrompendo a transcrição e, conseqüentemente, a expressão gênica (OBERLÉ et al., 1991).

Além da metilação do DNA, a modificação da estrutura das histonas também é considerada importante no silenciamento de genes. Uma vez adicionado o radical metila na citosina, ocorre a desacetilação das histonas, tornando a cromatina mais condensada e, portanto, inacessível aos processos de transcrição. Portanto, a metilação é um importante meio de regulação da expressão gênica.

A repetição de CGG é polimórfica, variando de 6 a 44 repetições para indivíduos normais, de 45 para 54 repetições para a chamada "zona gray" (zona limítrofe), de 55 a 200 repetições quando indivíduos são pré-mutados, e de 200 a milhares de repetições para os chamados de afetados para a SXF (HAGERMAN e HAGERMAN, 2004). Quando ocorre a expansão no afetado, isto resultará em uma hipermetilação da repetição do CGG, na região promotora adjacente do gene e, em conseqüência, a perda da proteína FMRP (Fragile Mental Retardation Protein) (FARZIN et al., 2006).

### **2.1.1 Aspectos clínicos**

Devido a diferenças de expansão, muitos são os fenótipos variantes dentro desta síndrome, evidenciando não somente o retardo mental mas também formas intermediárias, variando desde um distúrbio no aprendizado até um déficit cognitivo, problemas emocionais e comportamentais (TASSONE et al., 2000c; HANGERMAN,

1999a). Em relação aos homens afetados, existem fenótipos físicos clássicos como: orelhas grandes e ou proeminentes (abano); face alongada e macroorquidismo (ESCALANTE, 1971). Oitenta por cento dos indivíduos podem apresentar estas alterações físicas podendo ser mais evidenciadas quando na fase pré-puberal (VERMA e ELANGO, 1994). A deficiência intelectual, e o distúrbio de aprendizagem são considerados o fenótipo clínico mais proeminente na SXF (REISS et al., 1995). Formas de comportamento incluindo hiperatividade, ansiedade, convulsões e autismo intermediário são também observados (MAZZOCCO et al., 1997).

A proteína FMRP é importante no desenvolvimento e maturação dos dendritos e conexões sinápticas (WILLEMSEM, 2004; IRWIN, 2001), e sua ausência é responsável pelas deficiências cognitivas, físicas e comportamentais, características da SXF (TASSONE, 1999; LOESCH et al., 2004); sustentação da atenção, funções executivas, memória e a função social naqueles que não apresentam retardo mental são também associadas à SXF (BENNETTO et al., 2002).

Muitos indivíduos com pré-mutação são considerados não afetados cognitivamente (BENNETTO e PENNINGTON, 2002), mas estudos recentes mostraram déficits cognitivos e do comportamento neste subgrupo (CORNISH et al., 2004). Este quadro clínico até então só era relatado em indivíduos com ausência da FMRP (mutação completa ou afetado) (CORNISH et al., 2005).

Os testes de DNA são os métodos empregados para classificação das variantes na SXF. Tanto a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) bem como o Southern Blotting são os métodos de escolha para a classificação das variantes da SXF. No entanto, a análise de repetições de CGG do gene FMR1 através do PCR (BROWN et al., 1993) é a

técnica mais acessível e é utilizada nos dias de hoje como um teste de triagem. Quando da necessidade de investigar o gene expandido, e determinar seu estado de metilação, usa-se o Southern Blotting (ROSSEAU et al., 1991). A expansão no afetado facilita a hipermetilação da repetição do CGG na região promotora adjacente do gene, com conseqüente perda de expressão da proteína FMRP (FARZIN et al., 2006).

Outras síndromes possuem sintomas semelhantes à SXF e podem apresentar comorbidades. Quando este fato ocorre, é necessário utilizar-se dos testes corretos para o diagnóstico diferencial. Alguns exemplos de síndromes associadas e co-morbidades são: síndrome de Asperger, síndrome de Prader-Willi, síndrome de Pierre Robin; doenças cromossômicas incluem: Síndrome de Down, Síndrome de Klinefelter XXY, XO, XYY, XXX e microcromossomo extra (SUTHERLAND, 1985). Existem outras síndromes que possuem características físicas como a SXF, como é o caso da Síndrome de Coffin-Lowry (orelhas proeminentes, hipotonia), Síndrome de Lujan (com hábitos marfanóides e macroorquidismo), e a Síndrome de Atkin (orelhas grandes, baixa estatura e macroorquidismo) (ARENA e LUBS 1991).

### 2.1.2 *Animais modelo*

A chave do avanço para melhor compreensão da SXF foi o isolamento do gene FMR1 e, conseqüentemente, a criação do camungongo modelo *knockout* Fmr-1 (BAKKER et al., 1994). São muitos os fenótipos que podem ser reproduzidos em relação ao comportamento, atividade motora, e um aumento da susceptibilidade para crises convulsivas. Outro sintoma observado nesse animal é o déficit de aprendizagem (KONY, 2003). O camundongo Knockout Fmr1 também apresenta dendritos anormais, análogos aos humanos (IRWIN et al., 2002). Graças a estes avanços, novos

direcionamentos no estudo sobre as sinapses e dendritos foram realizados (BEAR et al., 2004). Outros modelos como a *Drosophila melanogaster* (mosca das frutas), gene *dmfr1*, (ABITBOL, 1993; HINDS, 1993), e o nematóide *Caenorhabditis elegans* (SHTANG et al., 1999) são também utilizados nas pesquisas com a SXF.

### 2.1.3 Proteína FMRP

A ausência da FMRP explica alguns sintomas da SXF como o retardo mental moderado ou severo, déficit de atenção, hiperatividade, ansiedade, instabilidade do humor, transtornos compulsivos depressivos, e comportamentos autistas. Indivíduos com SXF podem apresentar também pobre coordenação motora e aumento de crises convulsivas (BEAR et al., 2004).

A proteína FMRP é expressa com maior abundância no cérebro e testículo de tecidos fetais e adultos (DEVYS et al., 1993). É uma proteína ligante de RNA com o qual forma ribonucleoproteínas, chamadas de complexo de ribonucleoproteínas mensageiras (mRNP), e estão associadas com a tradução nos poliribossomos (JIN e WARREN, 2003). Alguns componentes protéicos do complexo chamado FMRP-mRNP foram determinados recentemente: FXR1P, FXR2P, nucleolina, YB1/p50, Pur e mStaufen (OHASHI, 2002).

A FMRP está envolvida no controle do processo de tradução. Está associada com os poliribossomos através de partículas ribonucleoproteicas (mRNP) e pode inibir a tradução das proteínas tanto *in vitro* como *in vivo* (LAGGERBAUER, 2001).

Pesquisas recentes sugerem que algumas proteínas aumentam sua expressão na ausência da FMRP; como exemplo, temos a Arc e a MAP1b (ZALFA et al., 2003), e outras aparecem com sua regulação diminuída ou desaparecem (CHEN et al., 2003). Estes achados sugerem a possibilidade da FMRP ser um repressor na tradução de certas proteínas (LAGGERBAUER et al., 2001 ; LI et al., 2001) não descartando-se a possibilidade de ela atuar em relação a mensagens específicas (CHEN et al., 2003; TODD et al., 2003).

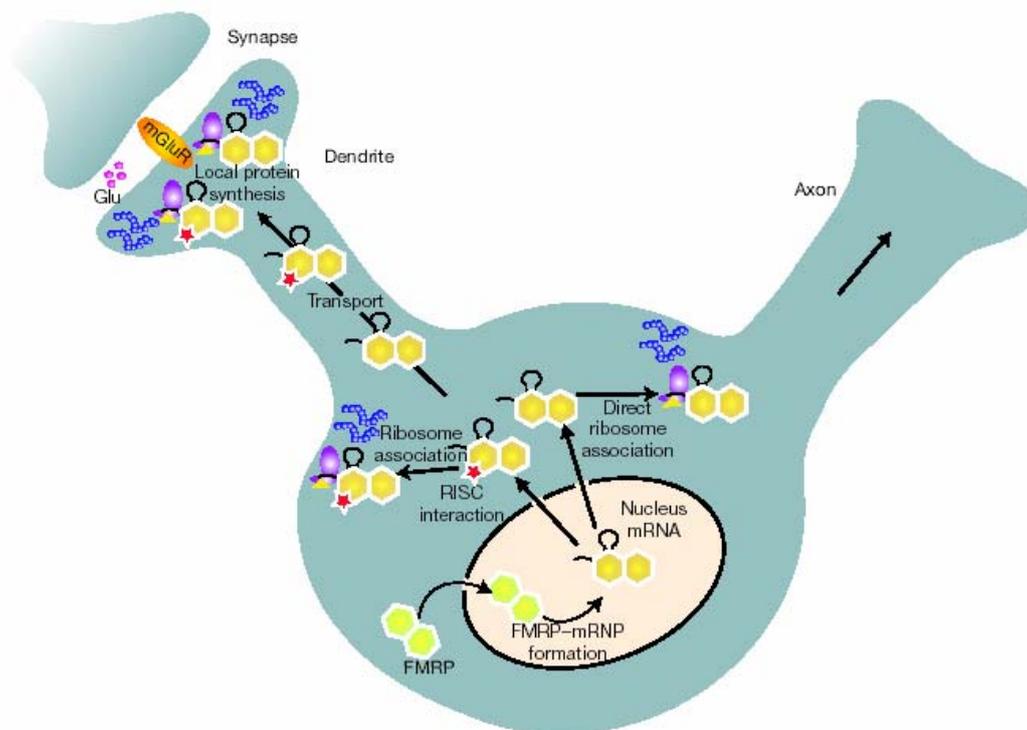
Embora a FMRP esteja localizada predominantemente no citoplasma, foi também demonstrado por microscopia eletrônica que a FMRP pode ser visualizada no núcleo (FENG et al., 1997).

Diversos estudos bioquímicos e patológicos levaram os pesquisadores a propor um modelo da função neuronal para a FMRP (Figura 1). De acordo com esse modelo, a FMRP dimeriza no citoplasma e é transportada para dentro do núcleo dos neurônios via sinal de localização nuclear, e lá forma um complexo mRNP (ribonucleoproteínas mensageiras), pela interação de RNAs específicos e de outras proteínas. Depois de formado, o complexo FMRP-mRNP é transportado para fora do núcleo via o NES (sinal de exportação nuclear). Uma vez no citoplasma, o complexo FMRP-mRNP poderá se associar diretamente com ribossomos no corpo da célula, ou interagir antes da associação com os ribossomos, com os membros de um complexo de RNA chamado RISC. Ambos complexos de FMRP-mRNP, com ou sem membros RISC, irão regular a síntese de proteínas no corpo celular do neurônio. Alternativamente, ambos os complexos poderão ser transportados dentro dos dendritos para regular a síntese de proteína local para RNAs específicos. A síntese destas proteínas dependerá dos sinais

de estimulação sináptica, especialmente da ativação do receptor metabotrópico mGluR (Figura 1).

Quando a FMRP está ausente, os mRNAs que deveriam estar associados ao complexo FMRP-mRNP terão sua tradução desregulada, podendo assim induzir a um enfraquecimento na plasticidade sináptica e do déficit cognitivo (JIN e WARREN, 2003).

Estudos envolvendo a plasticidade sináptica no hipocampo do comundongo Knockout *Fmr1* sugerem uma conexão entre receptores de glutamato metabotrópico (mGluR) em relação ao fenótipo da SXF. A interação do papel da FMRP com a plasticidade sináptica foi sugerida devido ao fato de a FMRP ser uma das proteínas sintetizadas em resposta à ativação do mGluR (WEILER, 1999).



**Figura 1.** Modelo da função da Proteína do Retardo Mental na SXF (FMRP) no neurônio, de acordo com JIN e WARREN (2004).

A atividade sináptica pode acionar consistentes trocas no cérebro, como a chamada Potenciação de Longa Duração (LTP) e Depressão de Longa Duração (LTD). Estes mecanismos contribuem no aprendizado e na memória pós-natal (BEAR et al., 1998).

Kimberly (2002) demonstrou que o mGluR dependente de LTD está significativamente aumentado em animais com ausência da proteína FMRP, sugerindo que a FMRP regula a LTD através de uma diminuição na regulação do mGluRs, bem como o nível da tradução do mRNA. Já existem duas formas bem estudadas de indução de LTD: o NMDAR-LTD e o mGluR-LTD (HUBER et al., 2000).

Os receptores AMPA são internalizados e diminuídos na SXF a partir da via mGluR5 através do processo via mGluR5-LTD. Também as ativações transientes do Gp1 mGluRs em fatias do hipocampo e em culturas estimuladas mostram a perda da expressão dos receptores AMPA e NMDA sinápticos (SNYDER et al., 2001;) e reduzem a liberação do glutamato pré-sináptico (ZAKHARENKO et al., 2002).

Para melhor investigação do papel do controle da tradução mediada pela FMRP, através da atividade neuronal, foi monitorado o camundongo Knockout Fmr1. Estes experimentos mostraram que o mGluR-LTD está aumentado no hipocampo desses camundongos (HUBER et al., 2002). Portanto, a hipótese é que o mGluR5 estimule a síntese de proteína local, e a FMRP parece inibir esta síntese. Na ausência da proteína FMRP, as mensagens serão estimuladas via mGluR5 e poderão ser mais traduzidas do que geralmente o são, em níveis normais (BEAR, 2004).

Devemos entender que a FMRP regula a síntese de muitas proteínas cerebrais, tornando-as fundamentais na transmissão sináptica, e que esta é somente uma das muitas proteínas que devem participar da regulação da síntese de proteínas nas proximidades sinápticas. A ausência da FMRP leva a uma desregulação de muitas proteínas e de suas vias.

A proteína ausente em indivíduos com a SXF (FMRP) é sintetizada *in vitro* em preparações de sinaptoneurossomos em resposta a estimulações glutamatérgicas (WEILER et al., 1997). Estudos neuroanatômicos demonstraram que pacientes com SXF apresentavam dendritos com morfologia e número de ramificações anormais (IRWIN et al., 2001), propondo assim teorias em que a FMRP é produzida *in vivo* nas sinapses em resposta à ativação aferente nos receptores de glutamato metabotrópicos, possivelmente dando suporte ao processo de plasticidade sináptica (IRWIN, 2000). Em outros experimentos, através de técnicas imunorreativas, animais que receberam luz após exposição a escuro profundo, tiveram seu nível de FMRP elevado. A síntese de FMRP foi ativada através das regiões envolvidas com atividade sinaptogênica, evidenciando estimulações somatossensoriais, motoras e de aprendizado (GABEL et al., 2004; IRWIN et al., 2000).

Tanto estudos em animais como em humanos, FENG (2002) sugeriu dois papéis importantes para a FMRP nos neurônios: na formação e maturação das sinapses, através do controle de sinais durante seu desenvolvimento, e na resposta pela liberação dos neurotransmissores, responsáveis pelo controle da localização e/ou da tradução dos mRNAs associados nos locais pós-sinápticos.

### 2.1.4 *Tratamento da SXF*

#### ▣ Terapias atualmente utilizadas

Apesar de não existir um tratamento medicamentoso específico para a SXF, muitas são as estratégias para aliviar seus problemas comportamentais e emocionais, a exemplo de hiperatividade, mudanças de humor, agressividade, impulsividade, ansiedade e crises obsessivas, depressão, e déficit emocional, entre outros.

As medicações estimulantes dos sistemas de neurotransmissores de dopamina e norepinefrina melhoram a coordenação visiomotora, e a atenção, e reduzem a hiperatividade. Exemplos destas medicações são o metilfenidato (Ritalina®), a dextroanfetamina (Aderall®) e a pemolina (Cylerte®). Estas medicações estimulantes ajudam 60 a 70% dos indivíduos em idade escolar, sendo menos efetivas em pacientes adolescentes e pré-escolares. Alguns destes estimulantes podem piorar “tics” motores e tornam os pacientes mais irritados. A clonidina e a imipramina são utilizadas nos transtornos de humor, e os anticonvulsivantes são também utilizados quando em crises convulsivas de uma forma geral ou EEG anormais. A Fluoxetina® é utilizada para reduzir a agressão, e transtornos de humor, e os benzodiazepínicos são efetivos para tratamento de ansiedade (HAGERMAN, 2001).

O Piracetam (Nootropil®) é um derivativo cíclico do GABA (ácido gama-aminobutírico) que atua na função cerebral para aumento da memória e sua integração. Este medicamento é liberado nos EUA e é utilizado algumas vezes na SXF (MONDADORI et al., 1994). O Aricep® (Donepezil) é outra medicação que atua trabalhando o sistema colinérgico. Esta medicação é um inibidor de colinesterase: aumenta o efeito da acetilcolina, e resulta no aumento do sistema glutamatérgico,

beneficiando crianças com a SXF. É também utilizada no Mal de Alzheimer, beneficiando a memória e o aprendizado em ratos envelhecidos (HAGERMAN e HAGERMAN, 2004).

CALVANI e colaboradores (2001) sugerem uma alternativa para pacientes SXF com comportamento hiperativo, através da L-acetil-carnitina (molécula da família da metilamina), demonstrando através de um pré-estudo clínico que a administração exógena de LAC (L-acetil-carnitina) pode alterar o cérebro de pacientes com a SXF, diminuindo a hiperatividade após 12 meses de uso.

Os estudos clínicos realizados com as ampaquinas (moduladoras do receptor AMPA) (BERRY-KRAVIS et al., 2006) deixam dúvida sobre o papel da neurotransmissão, mediada através do modulador AMPA, como uma estratégia terapêutica para o tratamento da SXF.

Embora antagonistas do mGluR5 ainda não estejam disponíveis para humanos, o tratamento com carbonato de lítio vem mostrando benefícios para problemas comportamentais, principalmente em agressividade na SXF. Também aumenta a cognição nos modelos de X Frágil como nas drosófilas (McBRIDE et al., 2005). Os estudos clínicos em relação ao carbonato de lítio já são utilizados nos serviços da UC Davis, UCLA e Rush Medical Center em Chicago (AMARIA et al., 2001).

#### ▣ Futuras terapias

Muitos avanços vêm acontecendo graças ao interesse dos pesquisadores em relação à proteína FMRP no fascinante campo da Neurobiologia. Também foi encontrado aumento da ativação do Gp1 mGluR - proteína síntese dependente de LTD

no hipocampo, graças à ausência da FMRP (BEAR et al., 2004). O aumento exagerado do GP1 mGluR dependente implica em conseqüências funcionais como a epilepsia, alteração na cognição, distúrbios no desenvolvimento, alongamento e imaturidade das ramificações dendríticas, e perda da coordenação motora, sintomas estes considerados chaves na SXF. Muitos experimentos foram realizados com proteínas específicas como os antagonistas do Gp1 mGluR. Os resultados mostraram que a ativação do Gp1 mGluR é um potente local de estímulo para a síntese de proteínas (TODD et al., 2003) e que muitas conseqüências funcionais da SXF são causadas devido à ativação desta via.

Uma revisão atual da literatura mostrou vários trabalhos sugerindo o tratamento da SXF através de antagonistas do mGluR5 como futuro potencial terapêutico (BEAR 2004); Portanto, uma possível perspectiva para a intervenção farmacológica na SXF seria a regulação da FMRP e do receptor mGluR5, com agentes que modulem vias de sinalização glutamatérgicas específicas que são desbalanceadas na SXF (ANTAR et al., 2004).

O protótipo do antagonista seletivo para atuar na via mGluR5 é o antagonista MPEP (SPOOREN et al., 2001). Quando da utilização deste antagonista em modelos animais, o MPEP mostrou ser um potente convulsivógeno e com ação ansiolítica sem causar efeitos na atividade locomotora como no caso do mGluR1. Estudo em modelo de drosófila (*dfmr1*) vem mostrando que o MPEP é utilizado para ajudar o aumento cognitivo em modelos de camundongos *Fmr1* (McBRIDE et al., 2005). O MPEP pode reverter inflamações nos mecanismos de indução de hiperalgesias; pode ainda reduzir a motilidade intestinal e atuar nos sintomas como epilepsia e ansiedade. Antagonistas do

mGluR5 deverão também minimizar os defeitos cognitivos vistos na SXF graças aos seus defeitos sinápticos.

HUBER et al. (2002), depois de demonstrar o aumento exagerado de LTD dependente do mGluR no hipocampo pela ausência de FMRP e devido a tradução normalmente negativa do FMRP (LAGGERBAUER, 2001), propõem que estes fatores poderão ser os responsáveis pelo fenótipo em relação aos aspectos comportamentais na SXF, e que antagonistas do mGluRs tipo 1 deveriam ser considerados como possíveis agentes terapêuticos no tratamento da SXF. Portanto, todos os dados levam à hipótese de que muitos sintomas da SXF são devidos ao aumento das sínteses de proteínas dependente de mGluRs aumentadas e/ou o aumento do LTD no cérebro, tanto no período de desenvolvimento como em adultos (HUBER et al., 2002). Estes autores mostraram também que o LTD eleva sua magnitude quando também é aumentada a ativação do mGluR5 (HUBER, 2001).

Normalmente a FMRP inibe a expressão das proteínas via mGluR5 mas quando a FMRP está ausente o LTD é dramaticamente aumentado, levando a um alongamento, afinamento e enfraquecimento das conexões sinápticas.

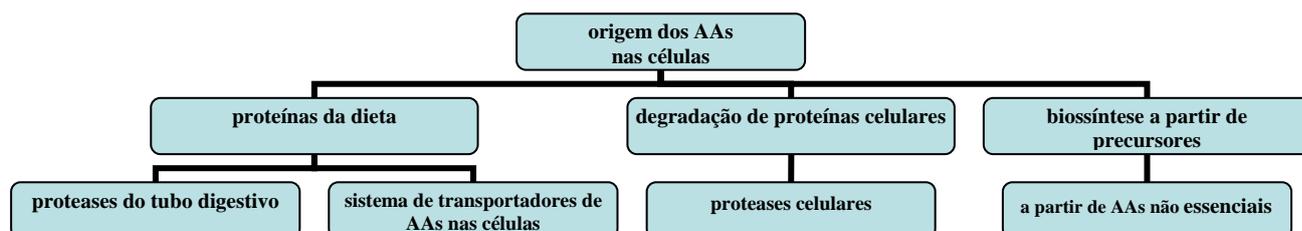
A grande chave da compreensão da SXF parece estar no entendimento de como as proteínas desreguladas afetam a síntese de proteínas prejudicando o funcionamento das sinapses; assim, muitas doenças com sintomas similares deverão ser compreendidas através desta via molecular (BEAR, 2004).

## 2.2 Aminoácidos

### 2.2.1 *Propriedades químicas dos aminoácidos*

Os aminoácidos são essenciais para a sobrevivência celular, intervindo na síntese das proteínas, na regulação do metabolismo, no crescimento celular, na regulação do volume celular e na produção de energia metabólica. Os aminoácidos são moléculas constituintes das proteínas e peptídeos em todos os organismos vivos, e contribuem, através da sua oxidação, para o fornecimento de 10 a 15% da energia total necessária para as células desempenharem adequadamente suas funções. Os aminoácidos se unem e formam dipeptídeos ou polipeptídios. Na natureza existem muitos aminoácidos, mas somente 20 formam parte na síntese de proteínas, sendo que nove deles são considerados essenciais: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina e histidina. Os não essenciais são: serina, prolina, alanina, tirosina, glutamina, asparagina, aspartato, glutamato, cisteína, arginina e glicina. Os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas, exceto a glicina, têm um carbono  $\alpha$  assimétrico, ligado a quatro grupos substituintes diferentes: o grupo carboxila, o grupo amino, um grupo R e um átomo de hidrogênio. Assim, o átomo de carbono  $\alpha$  torna-se um centro quiral. Quando diferem suas cadeias laterais ou grupo R, variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, e influenciam a solubilidade do aminoácido em água e outros meios. (VOET e VOET, 2005). Os aminoácidos podem ser classificados por sua polaridade, ou tendência para interagir com a água em pH fisiológico (hidrofóbico e hidrofílico). As características químicas dos aminoácidos são fundamentais na conformação espacial que a proteína assumirá. Uma alteração na seqüência dos aminoácidos poderá levar a uma modificação de função (em geral uma perda) na proteína correspondente. O

organismo não absorve proteínas, pois estas quando ingeridas sofrem ação de enzimas que transformam as proteínas em aminoácidos, que serão os únicos nutrientes a se integrarem à economia orgânica. A Figura 2 mostra como os aminoácidos são originados no organismo.



**Figura 2.** A origem dos aminoácidos no organismo ocorre através de três formas: a) proteínas da dieta: são degradadas pelas proteases do tubo digestivo e usadas no sistema de transportadores de aminoácidos nas células (co-transportadores específicos e ciclo do glutamato); b) a degradação de proteínas celulares através das proteases celulares (lisossomas, proteossomas, etc), c) a própria biossíntese dos aminoácidos que ocorre a partir de aminoácidos precursores não essenciais.

### 2.2.2 *Metabolismo dos aminoácidos*

O metabolismo dos aminoácidos ocorre no fígado, o qual dá suporte para todo organismo. Cada célula sintetiza suas próprias proteínas, em um sistema dinâmico, com contínuo metabolismo e anabolismo para recomposição das proteínas corporais.

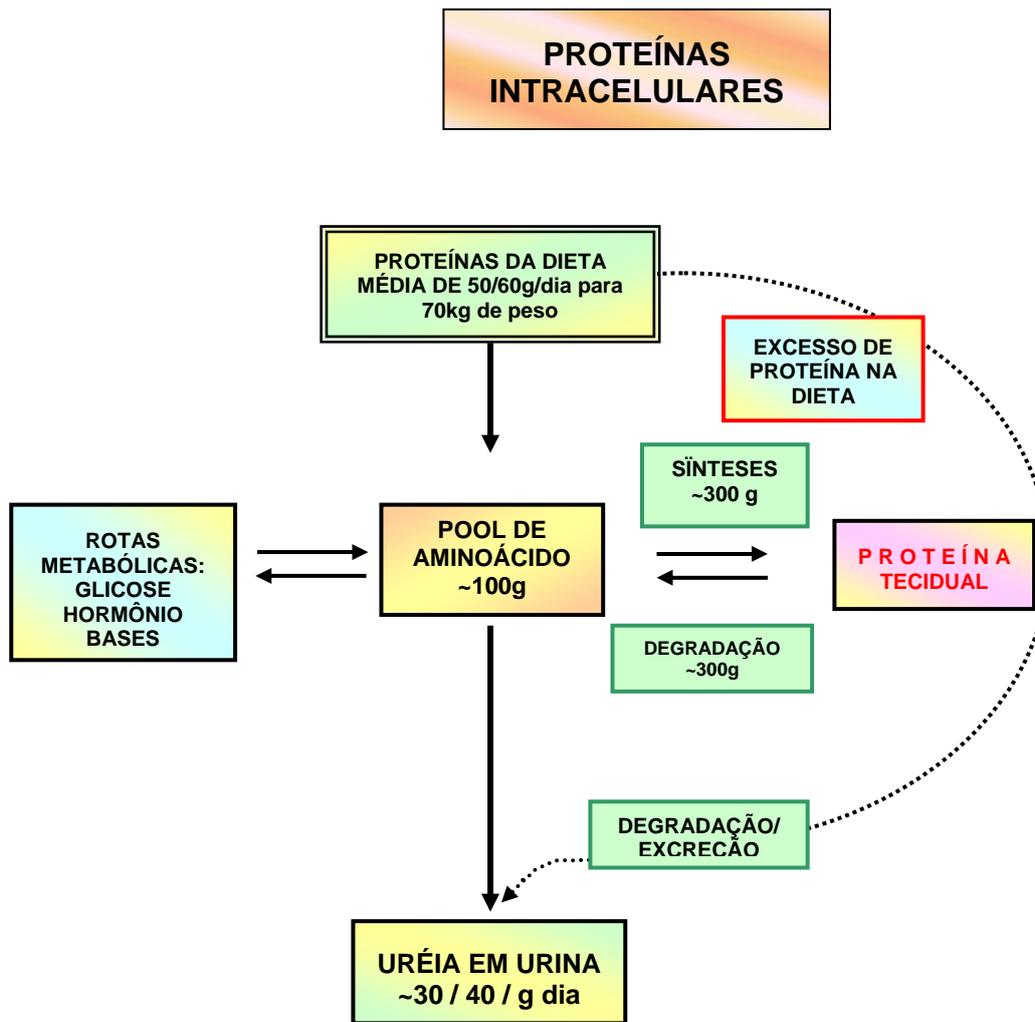
Quando uma dieta é realizada através de muitos aminoácidos, o seu excesso não é armazenado e nem excretado. A degradação oxidativa se dá principalmente durante a renovação, ativando as proteínas estruturais.

Os aminoácidos são também precursores da glucose, ácidos graxos e dos corpos cetônicos. Devido a esta função são também usados para produção de energia.

Outro metabólito produzido graças à ingestão excessiva de proteínas e aminoácidos é a amônia. Aminoácidos são primeiramente convertidos para ácidos orgânicos através do processo de desaminação, que é a eliminação do grupo amina. A amônia liberada por desaminação é utilizada na síntese de proteínas e ácidos nucleicos como fonte de nitrogênio, e como ácido orgânico que poderá ser oxidado para produção de energia (ATP). As causas da toxicidade da amônia não estão bem elucidadas, mas sabe-se que quando a concentração de amônia é muito alta, esta irá reagir com o glutamato para formar glutamina (Ver ciclo glutamato-glutamina) através de uma reação catalisada pela glutamina sintetase (ROSE, 1995). Para a reposição de glutamato, outros aminoácidos reagem com o alfa-cetoglutarato por transaminação. O resultado é o progressivo esgotamento das reservas de alfa-cetoglutarato e glutamato, com conseqüências lesivas a nível cerebral. A remoção da amônia deve ser realizada pelo fígado, órgão que transforma a amônia em uréia, composto que é solúvel, 40 vezes menos tóxica, e é excretada pela urina (FELIPO e BUTTERWORTH, 2002).

#### ■ Ação da arginina no ciclo da uréia:

No ciclo da uréia a arginina representa um processo metabólico decisivo, já que faz a remoção dos produtos de nitrogênio. Todas as enzimas necessárias se encontram no fígado fetal. Os complementos com arginina compensam os efeitos deste bloqueio metabólico. O benefício da arginina é maior devido à proteção contra o excesso de amônia, pelo efeito sobre o crescimento e pelo equilíbrio de compostos nitrogenados (BRUNTON et al., 2000). A Figura 3 mostra aspectos do metabolismo de proteínas no homem.



**Figura 3.** Esquema representativo da ingestão de proteína no homem. Adaptado de <http://www.unican.es>. Universidade Cantábria. Departamento de Biología Molecular. Acesso em julho 2006.

### 2.2.3 Sistemas de transporte de aminoácidos

O isolamento e proteção do cérebro acontecem graças à presença e função da barreira hematoencefálica (BBB, *Blood Brain Barrier*). A BBB é um sistema seletivo que atua nas células endoteliais vasculares do cérebro, nas células epiteliais do plexo coróide e nas membranas aracnóides; juntos, eles restringem e regulam o fluxo de substratos entre a circulação e o Sistema Nervoso Central (SNC) (PARDRIDGE, 1998).

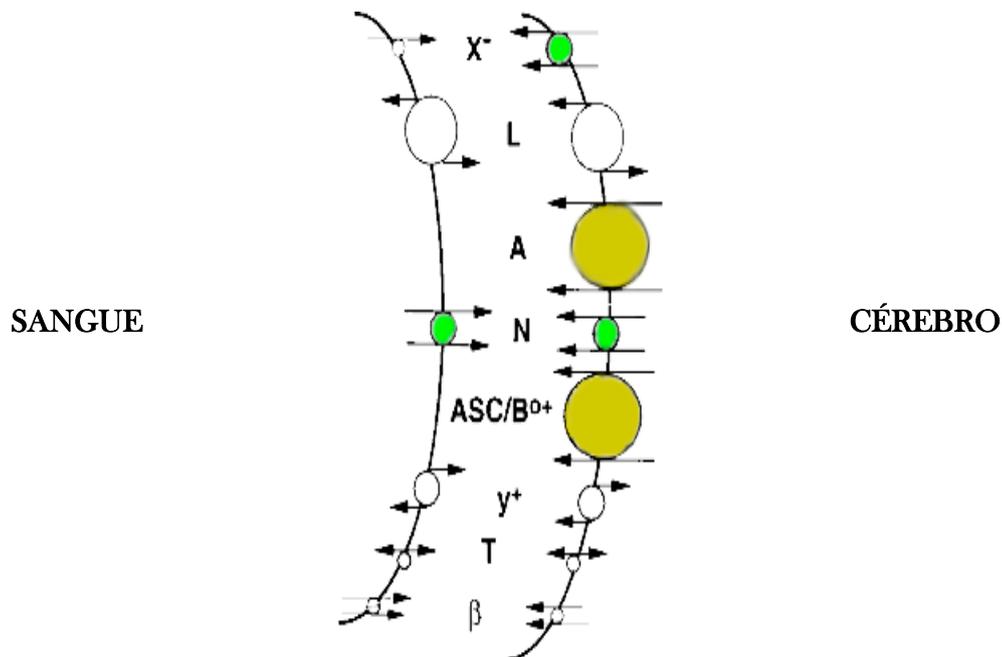
Para compensar o limite passivo desta troca das células na BBB são muitos os sistemas de transportes que irão regular o fluxo de solutos do sangue para o fluido intersticial cerebral e do fluido cérebro espinhal (FCS) e o seu próprio retorno (SMITH, 2000).

Os transportes de aminoácidos não sofrem mudanças durante o desenvolvimento. O transporte dos substratos nas células nervosas exige a existência de sistemas de transporte específicos que se desenvolvem independentemente. Nove sistemas de transportes para aminoácidos foram descritos (SMITH, 2000) e todos estão presentes no endotélio capilar cerebral da barreira hemato-encefálica (Figura 4).

Os sistemas básicos mais comuns de transporte de aminoácidos são: A, ASC e L. Estes sistemas são avaliados pelo seu caráter ácido, básico ou neutro. A maioria dos aminoácidos utiliza-se do sistema de transporte do tipo L, o único que é independente de íon sódio. Este sistema intervém no movimento bidirecional passivo dos aminoácidos mantendo o equilíbrio em ambos os lados da membrana. Assim, a alanina, serina, glicina e prolina entram muito lentamente e algumas apresentam uma leve inibição cruzada. Existem ainda dificuldades de demonstrar a competição entre eles pelos transportadores, como também a inibição por substrato, o que sugere a existência de distintos sistemas de transporte. Os aminoácidos utilizam um sistema de transporte de baixa atividade e alta afinidade, que está totalmente saturado aos níveis plasmáticos normais de aminoácidos.

Quanto ao L-glutamato, algumas áreas do cérebro não contêm a BBB, fazendo assim a captação rápida do L-glutamato da circulação (HAWKINS et al., 1995). Estes locais são chamados de órgãos circunventriculares, e captações de pequenos solutos

nesta área excedem a daquelas áreas normais do cérebro em 10 a 1000 vezes (GROSS, 1991; HAWKINS et al., 1995). Uma vez dentro do fluido extracelular do cérebro, o soluto pode mover-se dentro das áreas adjacentes do cérebro por difusão ou por fluxo ao longo do espaço.



**Figura 4.** Sistema de transporte de aminoácidos. Diagrama do sistema de transporte dos aminoácidos no endotélio capilar cerebral, sua localização na capilaridade luminal (frente para o plasma) ou abluminal (frente para o cérebro). Os sistemas sombreados são sódio-dependentes, enquanto os não sombreados são sódio-independentes. Adaptado de SMITH (2000).

#### 2.2.4 Utilização dos aminoácidos como terapia

Os aminoácidos são considerados tratamento de suporte e alternativa terapêutica na nutrição principalmente em situações críticas como desnutrição, prematuridade, na recuperação do baixo peso, manutenção do metabolismo, catabolismo e anabolismo celular. Países de baixa renda principalmente os da América do Sul vem produzindo trabalhos nesta área já que as formulações de aminoácidos

(AAs) são mais acessíveis do que muitas medicações comerciais. Uma revisão realizada pelo Ministério da Saúde da República do Perú - Direção Geral de Insumos de Medicamentos e Drogas, 2005 - mostrou os efeitos da utilização de aminoácidos em recém-nascidos prematuros, através de terapia nutricional parenteral e em recém-nascidos prematuros de baixo peso que estão indisponíveis pela via enteral (Disponível em: <http://www.digemid.minsa.gob.pe>). A Tabela 1 mostra as várias formulações de aminoácidos que estão comercialmente disponíveis.

Os aminoácidos comerciais são utilizados através de várias vias como: enteral, parenteral e oral. SNYDERMAN (2002) foi um dos primeiros pesquisadores a mostrar a existência de aminoácidos chamados condicionalmente essenciais em recém-nascidos. Quando alguns aminoácidos estão com sua função metabólica abaixo de sua demanda, alguns nutrientes podem requerer de maneira transitória os aminoácidos condicionalmente essenciais: cisteína, taurina, tirosina, arginina e os aminoácidos de cadeia ramificada. A nova visão sobre a utilização dos aminoácidos em recém-nascidos leva à possibilidade de proporcionar aminoácidos específicos para ajudar no crescimento, desenvolvimento das crianças em circunstâncias especiais como: prematuridade, estresse metabólico, sépsis, disfunção hepática (ASPEN BOARD OF DIRECTORS AND THE CLINICAL GUIDELINES TASK FORCE, 2002). Existe uma prescrição individualizada, e a tradução de uma quantidade em miligramas, específica para glucose, lipídios, aminoácidos, etc, que deverá ser respeitada (GOULET, 1997). As misturas destinadas aos adultos para nutrição parenteral (NP) podem produzir deficiência de cisteína e aumento de tirosina. As concentrações a nível plasmático são elevadas para metionina, serina, arginina e glicina, e baixas para cisteína. Deve-se ter

precaução com a administração de arginina, já que é o aminoácido precursor do óxido nítrico, um potente vasodilatador. O glutamato e o aspartato são neurotóxicos, e quando estão em excesso no plasma podem alterar também seus níveis teciduais. A diminuição de glutatona secundária e a baixa concentração plasmática de cisteína poderão aumentar o dano oxidativo no neonato enfermo (Informações disponíveis em: <http://www.digemid.minsa.gob.pe>).

**Tabela 1.** Formulações comerciais vigentes em Novembro de 2005

**COMPOSIÇÃO E FORMULAÇÕES PEDIÁTRICAS E FORMULAÇÕES NO ADULTO**

	TROPHAMINE	AMINOSTERIL PF	AMINOPLASMA	AMINOSTERIL	SORBAMIN	GLAVAMIN	POLIAMIN
L-isoleucina	820 mg	800 mg	510 mg	467 mg	502 mg	580 mg	690 mg
L-leucina	1400 mg	1300 mg	890 mg	706 mg	968 mg	790 mg	910 mg
Lisina	820 mg	820 mg	700 mg	746 mg	747 mg		
(añadida como acetato de L-lisina)	1200 mg	1200 mg	-	-		1270 mg	1023 mg
L-metionina	340 mg	312 mg	380 mg	410 mg	415 mg	560 mg	530 mg
L-fenilalanina	480 mg	375 mg	510 mg	482 mg	498 mg	585 mg	560 mg
L-treonina	420 mg	440 mg	410 mg	421 mg	528 mg	560 mg	400 mg
L-triptófano	200 mg	201 mg	180 mg	182 mg	142 mg	190 mg	150 mg
L-valina	780 mg	900 mg	480 mg	592 mg	749 mg	730 mg	660 mg
Cisteína	< 16 mg	70 mg	68 mg	-	82 mg	-	20 mg
(como HCl monohidratado de L-cisteína)	< 24 mg	-	-	-			
L-histidina	480 mg	476 mg	520 mg	288 mg	486 mg	680 mg	280 mg
L-tirosina	240 mg	517.60 mg	300 mg	-	50.2 mg	-	-
N-acetil-L-tirosina	240 mg	-	123 mg	-	-	-	-
Aminoácidos no esenciales:							
L-alanina	540 mg	930 mg	1370 mg	1500 mg	683 mg	2730 mg	710 mg
L-arginina	1200 mg	750 mg	920 mg	1064 mg	1061 mg	-	950 mg
L-prolina	680 mg	971 mg	890 mg	1500 mg	396 mg	680 mg	1120 mg

Fonte: Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas. <http://www.digemid.minsa.gob.pe>, acessado em 22/11/2006.

### ■ Aminoácidos e a Síndrome do X Frágil

Poucas são as opções no que diz respeito a terapias na SXF. Em relação às terapias com aminoácidos nesta enfermidade é descrito somente um estudo, que foi

realizado através da L-carnitina (TORRIOLI et al., 1999). O estudo clínico com a L-acetilcarnitina objetivou verificar seu desempenho na SXF, principalmente no que diz respeito ao ADHD (déficit de atenção e hiperatividade). Este estudo foi duplo-cego em 17 meninos com a síndrome, demonstrando que após o uso da L-carnitina no período de 12 meses houve uma redução no comportamento hiperativo destes pacientes.

### 2.2.5 O “pool” de aminoácidos Face®

De acordo com o fabricante, o Face® é um produto de natureza orgânica obtido por síntese, através de elevadas temperaturas e pressão controlada, com passe de descarga elétrica. Da reação, é sintetizada uma gama de aminoácidos, solúveis em água. A composição química do Face® foi analisada em 1995, pela Universidade Nacional da Colômbia, no departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Toxicologia (Tabela 4). Os efeitos dos aminoácidos sintetizados, compostos do Face®, foram testados quanto à sua atividade neurotrófica e neurosecretora de culturas *in vitro* em células neuronais (cultura de neuroblastos) de ratos. Foram avaliados perante os neuropeptídeos como a Somastotatina (SRIF), peptídeos intestinais vasoativos (VIP) e o fator de liberação de crescimento (GRF), em relação à estimulação da síntese destes neuropeptídeos (Resultados não publicados, informados à autora). A partir destes testes, o Face® mostrou ser um excelente e poderoso multiplicador de células corticais, conseguindo dar maior tempo de sobrevida às mesmas, e também um poderoso potenciador das secreções IR-SRIF, IR-VIP e IR-GRF (Laboratório LBE, comunicação pessoal).

Vários aminoácidos têm sido obtidos através de sínteses químicas específicas e comercializados sob proteção de patentes industriais, desde 1950, como os aminoácidos:

lisina, metionina, treonina, etc. O triptofano foi um dos últimos aminoácidos a serem produzidos por síntese química, devido ao alto custo de obtenção do grupo indólico.

GONZÁLES (2000), através de estudos na Faculdade de Engenharia de Alimentos do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da Universidade Estadual de Campinas, determinou algumas das características químicas composicionais de uma mistura de aminoácidas bruta (MAB) com o nome de AVE1, contendo aminoácidos livres sintetizados da mesma forma que o Face®. Análises bioquímicas sorológicas também foram feitas para albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina, e análises de integridade tecidual do intestino delgado dos ratos Wistars. Estes ensaios demonstraram que a substituição parcial da caseína pela mistura aminoácida não desencadeou qualquer processo catabólico nos animais. Concluíram que o seu uso resultou em valores normais ou próximos do normal para o desenvolvimento e manutenção do peso corporal, não causando nenhum efeito tóxico aparente nos ratos estudados (GONZÁLES, 2000).

### **2.3 Sistema Glutamatérgico**

Diferentes neurônios no SNC (Sistema Nervoso Central) liberam diferentes neurotransmissores. O glutamato é considerado o maior mediador do sinal excitatório no sistema nervoso central dos mamíferos. Está envolvido de várias formas na função normal cerebral, incluindo cognição, memória e aprendizado (OTTTERSEN e STORM-MATHISEN, 1984). O glutamato participa em diversos processos neuronais de plasticidade (BLISS e COLLINGRIDGE, 1993), epilepsia (ENGEL, 1989; WALTZ et al. 2002), media as reações de medo-ansiedade (SWANSON et al., 2005), e efeitos de

estresse no cérebro (SALPOSKY, 1996). Uma de suas grandes atuações é na apoptose, e também na excitotoxicidade neuronal (FRIEDLER, 2003). O glutamato também participa do sistema nervoso central, ativando as sinapses. O glutamato é responsável por sua própria eliminação, atuando na migração celular e na sua diferenciação (DANBOLT, 2001). O glutamato, além de participar como um neurotransmissor excitatório, participa também como um precursor do neurotransmissor inibitório GABA, sendo um componente essencial do metabolismo intermediário; ajuda também na construção das proteínas e, além disto, é um substrato energético para as células. Quando sintetizado no citosol do neurônio, o glutamato será estocado dentro das vesículas sinápticas localizadas na região terminal dos neurônios pré-sinápticos. Após despolarização da membrana, devido ao processo dependente de cálcio, o glutamato é liberado para a fenda sináptica dos terminais nervosos, por exocitose (UEDA, 1986). Desde a liberação do glutamato, da captura, e de sua própria síntese são muitos os processos complexos que participam deste ciclo. A mais alta concentração de glutamato é encontrada nas terminações nervosas, onde é transportado por transportadores dependentes de íon sódio ( $\text{Na}^+$ ) (OTTERSEN et al., 1992; STORM-MATHISEN et al., 1992).

Não existem evidências da efetiva metabolização extracelular de glutamato, ou seja, a sinalização estimulada por glutamato é finalizada quando este neurotransmissor é retirado da fenda sináptica por recaptação para o terminal pré-sináptico ou para as células glias (ROBINSON, 1999). O ciclo que envolve a síntese do glutamato é chamado Ciclo Glutamato-Glutamina. Outros fatores e fenômenos importantes como receptores do glutamato e transportadores de glutamato também fazem parte deste mecanismo complexo, hoje melhor esclarecido (BACK, 2006).

### 2.3.1 *Receptores de glutamato*

Muitos neurônios e células glia possuem receptores em suas membranas plasmáticas (HÖSLI e HÖSLI, 1993). Os receptores de glutamato estão localizados em diferentes sinapses do terminal pós-sináptico (LUJÁN et al., 1997), bem como nas células glia (PETRALIA e WENTHOLD, 1992). Quando o glutamato e outros neurotransmissores são liberados na fenda, ativam os neurônios pós-sinápticos, por se ligarem em proteínas receptoras específicas que estão embutidas na membrana pós-sináptica (BEAR, 2002). Os receptores de glutamato ou de outros neurotransmissores estão divididos em dois grandes grupos: 1) receptores de canais iônicos ativados: a) NMDA (N-metil-D-aspartato) com suas subunidades NR1, NR2A, NR2B, NR2C e NR2D; b) os receptores AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) com suas subunidades GluR1-GluR2-GluR3-GluR4; e c) pelos receptores de cainato (KA), com suas subunidades GluR5-GluR6-GluR7-GluR8-GluR9 (HOLLMANN e HEINEMANN, 1994; OZAWA et al., 1998; DINGLELINE et al., 1999), e 2) pelos receptores acoplados às proteínas G, chamados de receptores metabotrópicos (mGluR 1-8), sendo subdivididos em grupos: a) I (mGluR1 e mGluR5), b) II (mGluR2 e mGluR3), e c) III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8).

Aos receptores AMPA e KA são atribuídas a neurotransmissão excitatória rápida, e os canais formados por estes receptores são permeáveis primariamente por íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ). Os receptores NMDA respondem mais lentamente ao glutamato, contribuindo com o componente lento das correntes pós-sinápticas excitatórias, e são altamente permeáveis aos íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Devido a essas

propriedades, os receptores NMDA são implicados como responsáveis pelos processos que envolvem plasticidade, como aprendizado e memória.

O glutamato pode ser neurotóxico agindo em receptores NMDA, AMPA e também em seus receptores metabotrópicos (MELDRUM, 2000). A excitotoxicidade é um tipo de morte neuronal induzida pela superestimulação dos receptores de glutamato, particularmente o NMDA. Este receptor é permeável para cálcio, levando a um influxo maciço destes íons para dentro da célula. A lesão excitotóxica resulta deste excesso de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^{+}$  na célula através dos canais iônicos e pela ação suplementar da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos reservatórios intracelulares, o que provoca um aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (CHOI, 1987). Estes íons de cálcio irão ativar diversas rotas enzimáticas envolvidas com a morte neuronal tais como as de lipases, proteases, fosfatases nucleases, óxido nítrico, sintases ou endonucleases que contribuem para a morte celular (MELDRUM, 2000).

### 2.3.2 *Sistemas de transportadores de glutamato*

No organismo, o transporte de aminoácidos desempenha uma função integrada no fluxo nutricional entre os órgãos (CHRISTENSEN, 1990). Após a ingestão dos alimentos o epitélio intestinal capta os aminoácidos ingeridos na dieta, depois liberam para o sangue (plasma) e então são recapturados pelos órgãos e por tecidos diferentes como o fígado e o músculo esquelético, e finalmente são reabsorvidos na urina e levados para os rins. No SNC os transportadores de aminoácidos regulam a passagem dos próprios aminoácidos através da barreira hematoencefálica (BBB), e são importantes para o abastecimento metabólico dos astrócitos e neurônios. Também intervêm na recaptura da sinapse nervosa onde alguns aminoácidos como o glutamato,

a glicina e o aspartato atuam como neurotransmissores (GASOL, 2004). O aumento da concentração de glutamato durante a neurotransmissão glutamatérgica é altamente regulada por proteínas transportadoras específicas localizadas na membrana plasmática dos neurônios e das células gliais, reconhecendo, unindo e transportando estes aminoácidos desde o meio extracelular até o interior da célula (GASOL, 2004).

Os transportadores de glutamato estão envolvidos tanto na função normal como anormal da atividade cerebral. Quando existe um excesso de glutamato na fenda sináptica, este causa um fenômeno conhecido como excitotoxicidade, comum em vários distúrbios neurológicos, incluindo acidente vascular cerebral, esclerose lateral amiotrófica, esquizofrenia, hipoglicemia, isquemia cerebral, epilepsia, Mal de Alzheimer e traumatismo crânio encefálico (OBRENOVITCH e URENJAK, 1997).

O rápido mecanismo de remoção do glutamato do fluido extracelular na fenda sináptica é chamado de captação celular (JOHNSTON, 1981). A concentração de glutamato no espaço cerebral deve ser mantida baixa, apesar de o tecido cerebral ter uma grande habilidade para acumular glutamato. Estas proteínas carreadoras de glutamato são chamadas de transportadores de glutamato (DANBOLT, 2001). Estes transportadores representam não só o mecanismo de remoção do glutamato, mas também promovem a sua manutenção de baixa concentração (não tóxica) no fluido extracelular. Além destas, os transportadores possuem outras funções importantes como: modeladores da neurotransmissão, modificam o tempo do evento sináptico, a extensão e o padrão de ativação e a desintetização dos receptores na fenda sináptica; e fornecem glutamato para sínteses do GABA, glutatona e proteínas, além de atuarem produzindo energia.

A falha do transportador de glutamato induzirá uma elevação do glutamato extracelular, ocasionando uma superestimulação dos receptores de glutamato, levando a uma excitotoxicidade e, portanto, a lesão neuronal. O sistema de proteção cerebral é extremamente eficaz pois, se houver uma falha, desencadeará um aumento elevado de glutamato na fenda, estabelecendo uma toxicidade glutamatérgica no tecido cerebral (GARTTHWAITE et al., 1992; ROSENBERG et al., 1992; TANAKA et al., 1997b) (Figura 5). Os transportadores também atuam em órgãos periféricos como ossos, coração, intestino, rins, pâncreas e placenta. A captação de glutamato parece ser regulada também a nível de transcrição do DNA, na degradação e *splicing* do RNA, na síntese das proteínas, nas atividades dos transportes dos aminoácidos, e nos canais iônicos ativados associados (DANBOLT, 2001).

A classificação dos diferentes sistemas de transporte depende do tipo de aminoácido transportado e se é dependente do íon sódio. A nomenclatura utilizada depende da especificidade do substrato e coloca como "maiúsculas" os sistemas que são dependentes de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e com "minúsculas" os independentes de sódio (BANNAI et al., 1984). A exceção é o sistema L, que é independente de  $\text{Na}^+$  e, por razões próprias, é designada como maiúscula (BANNAI, 1984b; OXENDER e CHRISTENSEN, 1963). Em 1998 foi disponibilizada a sequência de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) e de vários genomas que permitiram a identificação de um grande número de transportadores de aminoácidos (GASOL, 2004).

**Tabela 2.** Diferentes tipos de transporte e suas isoformas clonadas, com suas respectivas associações. As isoformas de um mesmo sistema variam pela afinidade e especificidade de substrato, ajustando-se à função do tecido, e no que se expressa o transportador (Original de Broer e Wagner, 2002). Fonte: Gasol, 2004.

Sistema de transporte	Isoformas (cDNAs clonados)	Mecanismo	Sustratos
A	ATA1 ATA2 ATA3	Cotransporte 1Na <sup>+</sup> /AA	Gly, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Asn, Met
asc	asc-1/4F2hc asc-2/(?)	Antiporte	Gly, Ala, Ser, Cys, Thr (D y L) Gly, Ala, Ser, Thr
ASC	ASCT1 ASCT2	Antiporte Na <sup>+</sup> - dependiente	Ala, Ser, Cys Ala, Ser, Cys, Thr, Gln
b <sup>0,+</sup>	b <sup>0,+</sup> AT/rBAT	Antiporte	Lys, Arg, Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys <sup>-</sup>
B <sup>0</sup>	B <sup>0</sup> AT-1	Cotransporte 2Na <sup>+</sup> /AA	Leu, Ile, Gln, Phe, Ala, Pro, Cys, Val, Met, Ser, Asn, (His, Gly, Thr, Trp, Tyr)
B <sup>0,-</sup>	ATB <sup>0,+</sup>	Cotransporte 2Na <sup>+</sup> /1Cl <sup>-</sup> /AA	Ala, Ser, Cys, His, Met, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Trp, (Lys, Arg, Thr, Asn, Gln)
β (BETA)	GAT1 GAT2 GAT3 GAT4	Cotransporte 2-3Na <sup>+</sup> /1Cl <sup>-</sup> /AA	GABA GABA, betaína, Pro, β-Ala GABA, betaína, taurina GABA, betaína
Gly	GlyT1 GlyT2	Cotransporte 2-3Na <sup>+</sup> /1Cl <sup>-</sup> /AA	Gly Gly
IMINO	PAT1 PAT2 PAT3 (?)	Cotransporte 1H <sup>+</sup> /AA	Pro, Gly, Ala, β-Ala, AIB, GABA Pro, Gly, Ala, MeAIB ?
L	LAT-1/4F2hc LAT-2/4F2hc LAT-3	Antiporte	His, Met, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, (Gln) Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Leu, Ile, Val Leu, Ile, Val, Phe, Met
N	SN1 SN2	Cotransporte Na <sup>+</sup> /AA acoplado a H <sup>+</sup> -antiporte	Gln, Asn, His Gln, Asn, His, Ser, Gly
T	TAT1	Uniporte	Phe, Tyr, Trp,
X <sup>AG</sup>	EAT1 EAAT2 (GLT1) EAAT3 EAAT4 EAAT5	Cotransporte 3Na <sup>+</sup> /1H <sup>+</sup> /AA acoplado a K <sup>+</sup> -antiporte	Glu, Asp Glu, Asp Glu, Asp, Cys Glu, Asp Glu, Asp
x <sub>c</sub> <sup>-</sup>	xCT/4F2hc	Antiporte	Glu, Cys <sup>-</sup> , (Asp)
y <sup>+</sup>	CAT-1 CAT-2A/B CAT-3 CAT-4 (?)	Uniporte	Arg, Lys, His, O Arg, Lys, His, O Arg, Lys ?
y <sup>+L</sup>	y <sup>+</sup> LAT-1/4F2hc y <sup>+</sup> LAT-2/4F2hc	Antiporte 1Na <sup>+</sup> /AA	Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu, Ala, Cys

Podemos agrupar os transportadores de aminoácidos em: sistemas A, ASC, L,  $y^+$ ,  $X_{AG}^-$  e sistemas de transporte tecidos-específicos, sistemas  $B^{0,-}$ ,  $N^m$ ,  $b^{0,+}$  (BROER, 2002).

São classificados como:

a) Transportadores de alta capacidade de acumulação (EAAT, transportadores acoplados a  $Na^+$  e  $Cl^-$ ) (GASOL, 2004). Os astrócitos têm como missão a “limpeza” do glutamato liberado na fenda sináptica, e para que este mecanismo ocorra estas células expressam transportadores de glutamato com alta afinidade EAAT-1 e EAAT-2 no cérebro. Os EAAT-3 não estão localizados nos nervos terminais e não existem citações na sua participação no sistema de remoção do glutamato nas sinapses. Já o EAAT-4 é um transportador neuronal limitado à região do cerebelo, especificamente nas células de Purkinge e, finalmente, a expressão dos EAAT-5 fica confinada à retina (LIN et al., 1998; ARRIZA et al., 1997).

b) Transportadores com baixa capacidade de acumulação (ATA, SN, CAT, TAT): são transportadores associados ao co-transporte de  $Na^+$  ou  $H^+$ , ou também uniporters (GASOL, 2004). Estes transportadores parecem estar comprometidos na manutenção de altas concentrações citosólicas de aminoácidos não essenciais (sistema A, sistema N) para permitir posteriormente a entrada de aminoácidos essenciais por outros transportadores (intercambiadores). O sistema  $y^+$ , sistema T, sistemas uniporters, existem em poucas quantidades, talvez por ser um mecanismo que não protege a célula da perda de seus metabólitos, já que as trocas do conteúdo de aminoácidos no plasma se transladam ao conteúdo intracelular.

c) Antiporters ou intercambiadores (LAT,  $y^+$  LAT,  $xCT$ ,  $b^{0,+}AT$ ): formam a grande maioria dos transportadores de aminoácidos em mamíferos. Intercambiam

aminoácidos não essenciais por aminoácidos essenciais. A reabsorção dos aminoácidos no rim (sistema  $b^{0,+}$ , sistema L, sistema  $y^+L$ ) é um exemplo (GASOL, 2004). Sendo assim, parece que na maior parte do cérebro, são os transportadores os responsáveis pela manutenção do gradiente de concentração entre a terminação nervosa e a fenda sináptica.

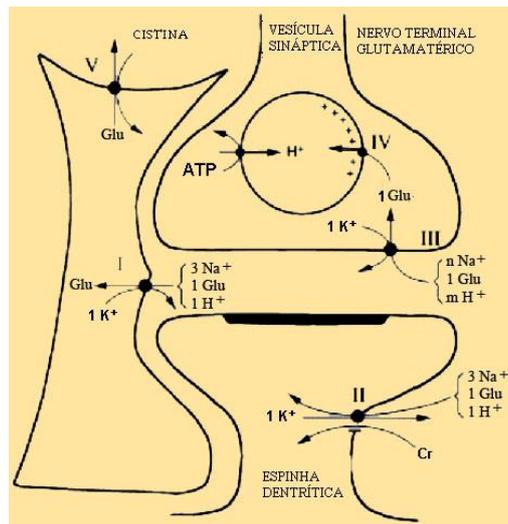
Mais de 100 transportadores já foram clonados e definidos. Esta dissertação se limitará a análise dos Transportadores Independentes de Sódio e aos Transportadores Dependentes de Sódio.

### 2.3.3 *Sistema de transporte dependente de $Na^+$*

Entre os vários tipos de transportadores localizados na membrana plasmática estão os transportadores de glutamato de “alta afinidade” e os de “baixa afinidade”.

Os de alta afinidade são chamados de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs). A captação celular de glutamato é acoplada ao transporte de  $Na^+$  e  $K^+$ , sendo que o transporte de uma molécula de glutamato para dentro da célula é vinculado à entrada de três íons  $Na^+$  e um próton, e à saída de um íon  $K$ , (NEDERGAARD et al., 2002). Quando na fenda, a limpeza do glutamato é feita primeiramente pelos transportadores astrocísticos com alta afinidade pela dependência do  $Na^+$ . Transportadores de alta afinidade presentes nos astrócitos são os responsáveis pela retirada do glutamato do espaço extracelular, encerrando sua ação sináptica, pois sua degradação na fenda sináptica não é eficiente, como ocorre para outros neurotransmissores (TAKAHASHI et al., 1997). Apenas uma pequena parte do glutamato é captado por transportadores conhecidos como Dependentes de Cloreto

(DANBOLT, 2001) (Figura 5). A captação é dependente de  $\text{Na}^+$ , e sua manutenção é realizada através da atividade de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e das ATPases. Uma grande quantidade de ATP gerada nos neurônios e astrócitos é utilizada para restabelecer o gradiente de  $\text{Na}^+$  após captação do glutamato.



**Figura 5.** O glutamato depois de liberado na fenda sináptica será removido do fluido extracelular pelos diversos tipos de transportadores de glutamato. Fonte: Danbolt, 2001.

Astrócitos e neurônios expressam um total de cinco isoformas de transportadores de aminoácidos excitatórios dependentes de  $\text{Na}^+$ : EAAT1 (GLAST - glutamate-aspartate transporter) (STORCK et al., 1992), EAAT2 (GLT - glutamate transporter) (PINES et al., 1992), EAAT3 (EAAC) (KANAI e HEDIGER, 1992), EAAT4 (FAIRMAN et al., 1995) e EAAT5 (ARRIZA et al., 1997).

GLT-1 e GLAST são amplamente distribuídos no cérebro. O transportador neuronal de glutamato mais amplamente distribuído no cérebro é o EAAC1 (homólogo humano, EAAT3). Ele é encontrado em regiões não-sinápticas. Outros subtipos

clonados incluem EAAT4, localizado nas células de Purkinje e os EAAT5, localizados nos neurônios retinianos (ANDERSON et al., 2001).

#### 2.3.4 *Sistema de transporte independente de Na<sup>+</sup>*

##### ■ Caracterização do sistema $x_c^-$

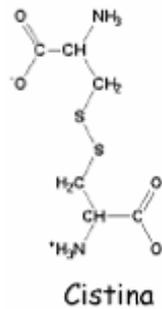
Este sistema foi caracterizado em 1980 por BANNAI e KITAMURA (BANNAI e KITAMURA, 1980) quando estes pesquisadores estudavam a captação de cistina em cultivo de fibroblastos diplóides humanos. O sistema de transporte foi comum tanto para L-cistina como para L-glutamato do tipo independente de sódio. BANNAI e colaboradores (1980, 1981, 1984b) descreveram o sistema como um sistema de transporte de aminoácido aniônico, sódio independente, que é altamente específico para cistina e glutamato. Logo se concluiu que o sistema  $x_c^-$  é um intercambiador e não eletrogênico (BANNAI, 1986; GASOL, 2004).

Tendo em conta o baixo conteúdo de cistina no interior das células, o intercâmbio é realizado a partir da saída do glutamato para favorecer a entrada de cistina. Quando entra a cistina, esta é reduzida a cisteína (BANNAI, 1986). A cisteína é o precursor limitante na síntese da glutathione em muitas linhas celulares de cultivo (BANNAI e TATEISHI, 1986). O transporte da cisteína está presente em muitos tipos de células nos organismos (BANNAI, 1984). O sistema  $x_c^-$  é chamado sistema tipo antiporter independente de Na<sup>+</sup>, responsável pela captação da cistina para dentro da célula, na proporção 1:1 (cistina por glutamato) através da membrana celular (BANNAI et al., 1986; WATANABE e BANNAI, 1987). Esta troca é mediada por um heterodímero

amplamente usado para o transporte de um aminoácido de cadeia pesada, 4F2hc, e um específico de cadeia leve, xCT.

Sob condições fisiológicas, o influxo de cistina e o efluxo de glutamato são devidos à baixa concentração de cistina no citosol. Quando a cistina é importada para dentro da célula, será rapidamente convertida em cisteína. De modo contrário, a concentração do glutamato dentro da célula é maior do que a de glutamato extracelular. Este fato irá inibir o aumento dos níveis de glutamato extracelular, evitando alterações importantes no sistema nervoso como crises convulsivas, e excitotoxicidade neuronal (CHOI, 1990). Quando na célula, a cisteína é usada para a síntese de proteína e do tripeptídeo antioxidante glutathione. A cisteína também pode entrar via neurônio pelo sistema L (BOADO et al., 1999). A sua concentração no plasma é 100 vezes inferior à de cistina (DROGE et al., 1991). A cistina (Ver Figura 6) está presente na circulação sanguínea em maior quantidade do que a cisteína (DROGE et al., 1991; WANG e CYNADER, 2000). Nestes casos a indução de xCT na BBB é essencial para garantir a entrada de cistina e manter as concentrações de GSH no cérebro (HOSOYA et al., 2002). A deficiência de glutathione no sistema nervoso central provoca disfunções cerebrais importantes (HERRERA et al., 2001; SKULLERUD et al., 1980).

A cisteína em condições aeróbicas é autooxidada para formar cistina (WANG e CYNADER, 2000). O sistema transportador de cistina, chamado sistema x<sub>c</sub><sup>-</sup>, é um dos principais sistemas de transporte do sistema nervoso central, e é responsável pela distribuição de cistina no cérebro e outras áreas do organismo (BURDO et al., 2006). Ambos, xCT e 4F2hc, foram localizados predominantemente em neurônios do cérebro de camundongos e em humanos e em algumas células gliais.



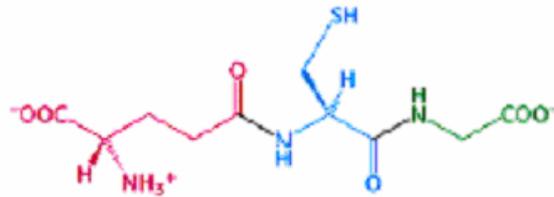
**Figura 6.** Estrutura química da cistina

As células vasculares endoteliais, as células ependimais, plexo coróide, e leptomeninges foram positivas para a presença dos componentes do sistema  $\alpha_c$ . Também foram localizadas na borda das membranas dos rins e do duodeno, órgãos estes mais críticos para a manutenção do nível de cistina no corpo. Através deste estudo os pesquisadores puderam observar que o sistema  $\alpha_c$  tem um papel crítico na manutenção do balanço cistina/glutamato entre o cérebro e órgãos periféricos (BURDO et al., 2006). No cérebro humano, entretanto, o transportador responsável pela maioria do transporte de cisteína é o ASC-1, que se localiza predominantemente nos neurônios (HELBOE et al., 2003).

#### ■ A glutathiona e o estresse oxidativo

A glutathiona (GSH- L-g-glutamyl-L-cistenylicina) é o maior antioxidante encontrado no sistema nervoso central (DRINGEN, 2000). O transporte de cistina para dentro das células é essencial para a produção de GSH e, portanto, possui um papel importante na função celular e na sua sobrevivência. Ela é formada de glutamato, glicina, e

cisteína, e é sintetizada através da enzima glutamato cisteína ligase e GSH peroxidase (Figura 7).

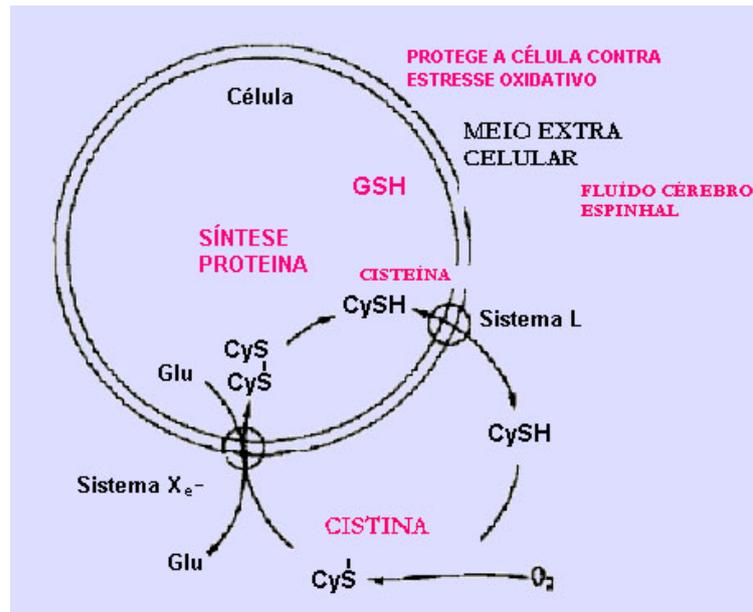


Glutationa

**Figura 7.** Estrutura química da glutathiona

O GSH possui a capacidade de ação antioxidante específica sobre um órgão ou estado do organismo, e variações de seus níveis irão afetar diretamente a síntese de proteínas e de DNA.

Baixos níveis de cistina ou elevados níveis de glutamato em meio de cultura têm efeito similar para a citotoxicidade. A inibição pelo glutamato, mediada pela captação da cistina dentro das células, leva à diminuição do GSH, a qual irá resultar em estresse oxidativo e uma forma de morte celular programada chamada de oxitose (TAN et al., 2001) (Figura 8).



**Figura 8.** Modelo do ciclo cistina/cisteína. Adaptado de BANNAI et al. (1989), SATO et al. (2002) e GASOL et al. (2004). A cistina (CyS) é captada do fluido cérebro-espinhal através do sistema  $x_c^-$ , é reduzida a cisteína (CySH), e utilizada principalmente na síntese de glutatona (GSH). A cisteína deixa a célula através dos transportadores de aminoácidos neutros (sistema L). Mesmo que a cisteína seja oxidada rapidamente, a cistina do meio extra celular sistema x é encarregada de recuperá-la.

Os níveis de GSH intracelular diminuem rapidamente com a inibição do transporte de cistina ou da depleção da cistina no meio extracelular (CHO e BANNAI, 1990). A deficiência de glutatona no sistema nervoso central provoca disfunções cerebrais importantes. As enfermidades neurodegenerativas como a doença de Parkinson, de Alzheimer, Corea de Huntington e a Esclerose Lateral Amiotrófica estão associadas a situações de estresse oxidativo no cérebro (HERRERA et al., 2001; KARELSON et al., 2001; MAKSIMOVIC et al., 2001; SERRA et al., 2001) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Tabela mostrando algumas condições nutricionais associadas com dano oxidativo.

Fonte: JORDÃO JÚNIOR et al., 1998.

Câncer	Alcoolismo
Pancreatite	Dermatite
Artrite	Consumo elevado de ácidos graxos
Doenças Inflamatórias	Hipertensão
Aterosclerose	Sobrecarga de Ferro
Diabetes	Deficiência de Selênio
Doença Renal	Isquemia e Reperfusão
Envelhecimento	<u>Deficiência de Vitamina E</u>

A detecção de 4F2hc e xCT em locais como o rim e intestino, levantam novos questionamentos em relação a doença cistinúria, que possui o defeito no transporte de cistina.

As aminoacidúrias hereditárias acontecem devido a falhas na reabsorção dos aminoácidos nos rins e intestino, e são conhecidas como cistinúria e lisinúria; ambas estão associadas à intolerância a proteínas (CHILLARÒN et al., 2001; PALACÍN et al., 2004).

## 2.4 Amônia

### 2.4.1 Condições fisiológicas da amônia

A amônia é uma molécula extremamente importante no cérebro. Possui muitas propriedades, como forte dependência do pH. Na forma de íon ( $\text{NH}_4^+$ ), possui propriedades similares ao  $\text{K}^+$ , podendo também estar na forma de gás ( $\text{NH}_3$ ) com acesso

livre para atravessar a membrana celular e subcelular. Entretanto, é estimado que acima de 25% da amônia deve entrar como  $\text{NH}_4^+$ , com valores do pH fisiológico. Ela é um importante substrato de diversas reações enzimáticas no cérebro, como produto de outros fatores. A amônia pode se comportar como ácido e como base, e sua concentração aumentada é tóxica para neurônios e astrócitos (neurotoxina) no Sistema Nervoso Central (SNC) (FELIPO e BUTTERWORTH, 2002). Em solução aquosa, a amônia ( $\text{NH}_3$ ) está em equilíbrio com o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Sob condições fisiológicas normais mais do que 98% da amônia está presente como  $\text{NH}_4^+$ . Grandes quantidades de amônia entram normalmente pela circulação sanguínea, através da digestão protéica no sistema gastrointestinal. A difusão da amônia dentro do cérebro é pH-dependente, sendo que o gradiente de pH entre o sangue e cérebro deve afetar a concentração de amônia cerebral (COOPER e PLUM, 1987). A baixa permeabilidade do  $\text{NH}_4^+$  implica que a transferência na barreira hemato-encefálica de amônia é dependente do pH do sangue arterial e da toxicidade amônica exacerbada (WARREN, 1958).

O amônio é liberado através de tecidos nervosos ativos (TSACOPOULOS et al., 1997). Em cérebro de ratos, o amônio exógeno é levado pelos astrócitos e incorporado principalmente na glutamina (COOPER et al., 1979). O amônio também estimula a fosfofrutoquinase, que é a chave reguladora enzimática na glicólise (LOWRY e PASSONEAU, 1966).

#### 2.4.2 *Amônia e seu metabolismo*

O excesso da amônia no sangue atravessa a barreira hemato-encefálica por difusão como  $\text{NH}_3$ , onde irá interagir com vários processos celulares que estão envolvidos no metabolismo energético cerebral e na sua neurotransmissão

(BUTTERWORTH, 2001). Estudos com  $\text{NH}_3$  mostram que a amônia proveniente do sangue é metabolizada quase sempre exclusivamente para glutamina no cérebro e que a enzima responsável, a glutamina sintetase (GS), possui uma localização exclusiva nos astrócitos. Sendo assim, o  $\text{NH}_3$  é um dos substratos responsáveis pelo ciclo glutamato-glutamina (Figura 9). São muitos os mecanismos propostos para explicar os mecanismos que envolvem a amônia. No mínimo 16 vias enzimáticas no cérebro resultam na formação de amônia. Uma das mais importantes é da glutamato desidrogenase (GDH), responsável pela deaminação oxidativa do glutamato. É também produzida em astrócitos, e este mecanismo deve dispor de um processo para remover o excesso de nitrogênio de certos aminoácidos (AAs) catabolisados (COOPER e PLUM, 1987). Outra via importante que está também incluída no ciclo glutamato-glutamina é a da L-glutaminase, que é amplamente distribuída no cérebro e está principalmente localizada nos nervos terminais glutamatérgicos nos quais a molécula de amônia é transferida de astrócitos para neurônios vizinhos. As enzimas do ciclo do nucleotídeo purina devem ser também responsáveis pela geração de uma fração significativa de amônia cerebral (SCHULTZ e LOWRNSTEIN, 1978).

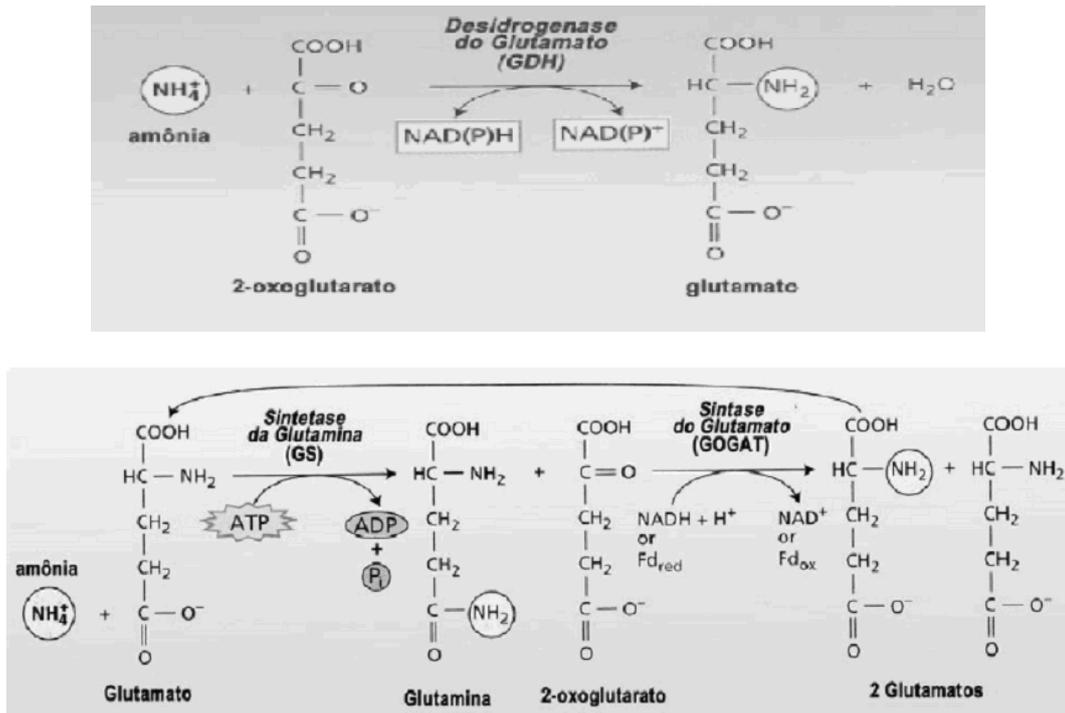


Figura 9. Formação do glutamato e glutamina, sob ação das enzimas glutamina sintetase, (GS), desidrogenase de glutamato (GDH), e sintetase de glutamato (GOGAT). Fonte: LOUREIRO, 2005.

### 2.4.3 O ciclo glutamato-glutamina

A amônia livre ( $\text{NH}_3$ ) tem papel fundamental nas sinapses glutamatérgicas. O glutamato liberado na fenda é levado para os astrócitos e transformado em glutamina pela glutamina sintetase (enzima exclusiva dos astrócitos). O glutamato, depois de liberado na fenda da sinapse glutamatérgica, é capturado na sua maioria pelos astrócitos. O glutamato nos astrócitos deverá ser metabolizado através de duas vias diferentes: transformação em glutamina (Gln), graças à reação de deamidação, ATP-dependente, e de uma enzima específica dos astrócitos chamada glutamina sintetase (GS), (NORENBERG e MARTINEZ-HERNANDEZ, 1979); ou também poderá ser metabolizado tanto nos neurônios como nos astrócitos, participando do ciclo dos ácidos

tricarboxílicos (TCA). O glutamato será convertido em alfa-cetoglutarato através da desaminação pela glutamato desidrogenase (GDH) ou pela transaminação por uma das transaminases. O alfa-cetoglutarato será metabolizado no ciclo TCA para succinato, fumarato e malato, sucessivamente. O malato continua sendo metabolizado no ciclo TCA ou deve ser descarboxilado para piruvato e reduzido para lactato. Ambos, glutamina e lactato, são exportados dos astrócitos para o fluido extracelular, e deverão entrar nos neurônios. Nos neurônios o glutamato e a amônia são novamente regenerados. Esta transformação se deve à desaminação e à participação da enzima glutaminase fosfato ativada (PAG), (KVAMME et al., 2001). A PAG está localizada exclusivamente nos nervos terminais. O glutamato formado é em parte exportado para a fenda e outra parte é acumulada nas vesículas dos neurônios. Este ciclo é essencial para a regulação das sinapses glutamatérgicas, e também resulta da compartimentalização do metabolismo de ambos, glutamato e amônia. O retorno do ciclo move uma molécula de amônia dos astrócitos para os neurônios (PATEL e BALAZS, 1970).

No cérebro de ratos, a amônia exógena é levada para os astrócitos e incorporada principalmente na glutamina (COOPER et al., 1979; NORENBURG e MARTINEZ-HERNANDEZ, 1979). A glutamina deverá deixar o cérebro, levando consigo a amônia, descartando assim o seu excesso (HAWKINS et al., 2002).

#### 2.4.4 *Interação da amônia com o sistema glutamatérgico no cérebro*

A sinalização dos neurônios para os astrócitos ou para outras células gliais inclui diferentes neurotransmissores (MUDRICK-DONNON et al., 1993; KULIK et al., 1999), entre eles estão o  $K^+$  (ROSE e DEITMER, 1995), e amônia (POITRY et al., 2000). A amônia em altas concentrações é neurotóxica e afeta a fisiologia celular e seu metabolismo (ROSE, 2006).

A captação de glutamato pelos astrócitos é uma via importante desde a remoção da amônia no cérebro pelo ciclo glutamato-glutamina; além disso, os astrócitos são também capazes de liberar glutamato via glutamato dependente de  $Ca^{2+}$ , um fenômeno que tem sido proposto e no qual o glutamato é liberado como sinal envolvido na comunicação neurônio-glia (VOLTERRA e MELDOLESI, 2005).

Diversas vias para o  $NH_4^+$  são descritas, mas seu mecanismo para sua acumulação nos neurônios ainda é pouco conhecido (MARCAGGI e COLES, 2001).

Estudos recentes revelam múltiplos efeitos da amônia na função glutamatérgica no SNC. Estes efeitos são devidos à ação pós-sináptica da amônia no AMPA, um efeito inibitório da amônia na expressão dos transportadores com alta afinidade, atuação da amônia na função e ativação de receptores de NMDA e, finalmente, a amônia atuando como tradutora de sinalização em algumas vias. Existem também evidências que sugerem que a perda de célula neuronal nas doenças hiperamônicas resulta de excitotoxicidade do receptor NMDA.

#### 2.4.5 O $\text{NH}_4^+$ : via de transporte dos aminoácidos

Tanto o  $\text{NH}_3$  como o  $\text{NH}_4^+$  e o  $\text{K}^+$  são liberados pelos neurônios ativos e levados para as células gliais, modificando o seu comportamento. A amônia pode exercer sua função por dois caminhos diferentes: por difusão do  $\text{NH}_3$  ou transportada como  $\text{NH}_4^+$ . O  $\text{NH}_4^+$  atravessa muitas membranas celulares via canal iônico (MARCAGGI e COLES, 2001) ou por transportadores de membrana.

Outro caminho da entrada da amônia nos neurônios e nos astrócitos são as vias de transporte de aminoácidos. Uma amônia gerada no neurônio é incorporada em um aminoácido não neuroreativo, levada para dentro do espaço extracelular junto ao aminoácido. Dois aminoácidos carreadores têm sido propostos para este caminho: a leucina (YUDKOFF et al., 1996; LIETH et al., 2001) e a alanina (WAAGEPETERSEN et al., 2000). Estes aminoácidos seguem a direção oposta a da glutamina, ou a direção neurônios para astrócitos. Nas sinapses glutamatérgicas ocorre nos neurônios o retorno da amônia, após o ciclo glutamato-glutamina.

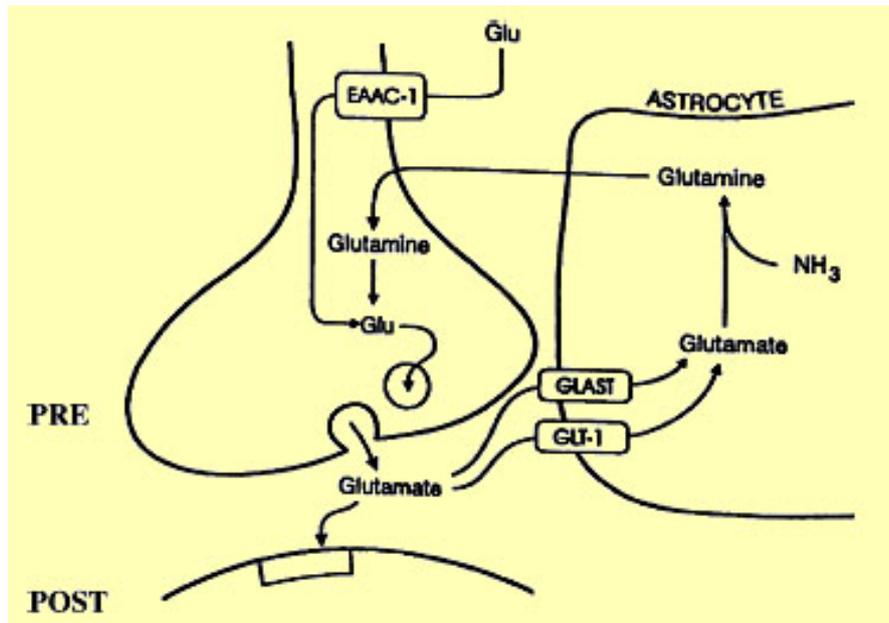
#### 2.4.6 Efeitos da amônia e transportadores de glutamato

A ação sináptica do glutamato é rápida e efetivamente finalizada pela alta afinidade do sistema de transportadores localizados predominantemente nos astrócitos perineuronal do cérebro. A exposição da amônia diante de preparações cerebrais *in vivo* e *in vitro* levam a alterações dos transportadores de glutamato. Existem evidências concretas sugerindo que um dos maiores mecanismos responsáveis pelo efeito deletério do aumento da amônia no cérebro são devidos às alterações dos transportadores de glutamato (BUTTERWORTH, 2002).

A exposição crônica de amônia em cultura de astrócitos induz uma redução na capacidade da captação de glutamato por alta afinidade. Entretanto, doenças como hiperamonemia crônica não parecem resultar em significativa perda dos transportadores de glutamato, com exceção do cerebelo (BUTTERWORTH, 2002). Já quando a exposição é aguda em cultura de astrócitos com baixas concentrações de amônia, resulta na diminuição da captação de glutamato, devido à perda da expressão do transportador GLAST (Figura 10).

O íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) exerce um efeito potencial inibitório na transmissão glutamatérgica (excitatória) em fatias de hipocampo pela interferência do efeito pós-sináptico na liberação de glutamato (SCHMIDT et al., 1990).

KNECHT et al. (1997) mostraram que a expressão do EAAT-2 (GLT-1) diminuiu em extratos cortical frontal de ratos com hiperamonemia aguda, resultando em uma desvascularização hepática. A perda de expressão destes transportadores é devida à exposição à amônia e é acompanhada, portanto, de um aumento extracelular na concentração de glutamato (MICHALAK et al., 1998), fenômeno este que vem sendo confirmado tanto em modelos animais como em humanos (HAZELL e NORENBURG, 1997). O aumento extracelular da concentração de glutamato foi significativamente correlacionado com o aumento da concentração da amônia arterial destes animais.



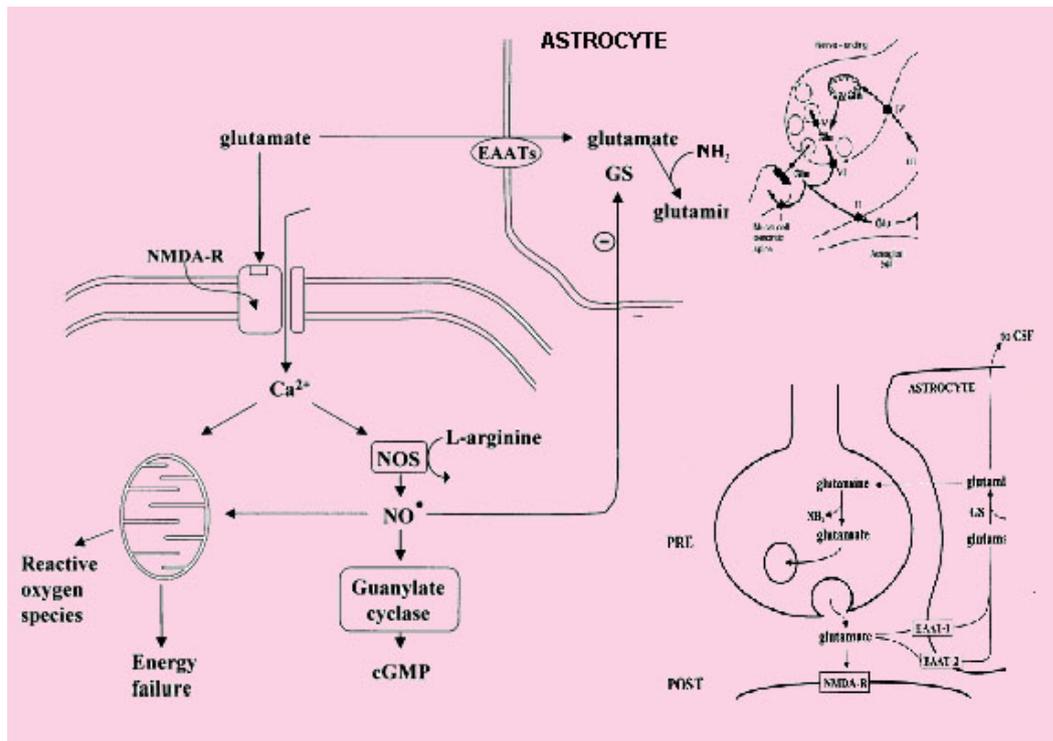
**Figura 10.** Localização do GLT-1 da sinapse glutamatérgica na membrana do astrócito. Fonte: Butterworth, 2002.

#### 2.4.7 Efeitos da amônia nos receptores de glutamato: AMPA e NMDA

Estudos em camundongos sugerem que a neurotoxicidade aguda determinada pela amônia é mediada pela excessiva ativação dos receptores de NMDA (HERMENEGILDO et al., 2000). Estes mecanismos foram demonstrados em diversos trabalhos relacionados ao receptor NMDA, através de antagonistas, mostrando sua potencialidade e impedindo a toxicidade da amônia no cérebro. Foi evidenciado que quando os receptores NMDA estão superativados, o sistema nervoso central se alterava, e através da administração de um agonista para o receptor NMDA chamado memantine, impedia-se o surgimento da encefalopatia nos animais (VOGELS et al., 1997).

HERMENEGILDO et al. (2000) mostraram o efeito do receptor NMDA em hiperamonemia aguda neuronal, via óxido nítrico (NO)-cGMP, usando microdiálise *in*

*in vivo*. Os resultados mostraram aumento na produção de cGMP após administração de amônia, mas quando utilizado o pré-tratamento com o antagonista do NMDA o efeito foi interrompido. Foi também observada no mesmo trabalho a correlação do aumento do cGMP com a severidade dos sintomas neurológicos (Figura 11).



**Figura 11.** O receptor (NMDA-R) medeia a via de tradução do óxido nítrico (NO) e GMP cíclico. Da exposição aguda de amônia resultará estimulação da via levando um aumento de  $\text{Ca}^+$ , aumentando a síntese de toda a via. O aumento do NO poderá causar danos na mitocôndria, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio e falha na energia. O NO deverá também difundir para os astrócitos onde inibirá a glutamina sintetase (GS) (Butterworth, 2001).

Quando nos experimentos é aumentado o NO, este poderá causar danos na mitocôndria, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio e falha na produção de energia. O NO deverá também difundir para os astrócitos onde inibirá a glutamina sintetase (GS) (BUTTERWORTH, 2002).

Em resumo, a hiperamonemia separa o ciclo glutamato-óxido nítrico da via GMP (HERMEGILDO et al., 1998), altera a fosforilação de diversas proteínas (KOSENKO et al., 1994), reprime o metabolismo oxidativo (JESSY et al., 1991) e induz a despolarização da membrana (RAABE, 1990).

Os receptores de NMDA não alteram os níveis de densidade ou de afinidade, quando em cérebro hiperamonêmico (MICHALAK et al., 1996). Entretanto, a densidade do receptor AMPA-cainato foi significativamente reduzida no cérebro em animais (MICHALAK e BUTTERWORTH, 1997).

Em contraste com a hiperamonemia aguda, a hiperamonemia crônica moderada resulta na diminuição da neurotransmissão excitatória pelo enfraquecimento da função do receptor NMDA.

Existe razão concreta para se afirmar que a função glutamatérgica central está alterada quando ocorre hiperamonemia. Existe uma dependência no sistema glutamatérgico em relação ao tempo de exposição, para que ocorra o aumento de concentração da amônia (agudo ou crônico). Da hiperamonemia irá resultar o enfraquecimento do metabolismo de energia cerebral, o acúmulo de lactato (CHATEAURET et al., 2001), o enfraquecimento direto da transmissão excitatória glutamatérgica, e quando ocorrer a hiperamonemia aguda e crônica resultará na perda da densidade do receptor NMDA.

Outras condições metabólicas como hipoglicemia e crises convulsivas são associadas ao aumento da amônia no cérebro e sangue (FELIPO e BUTTERWORTH, 2002). As doenças que ocorrem como consequência do aumento da amônia alterando seu metabolismo são doenças hereditárias ou doenças adquiridas, como o caso da

---

Síndrome de Reye, acidemias orgânicas, aminoacidopatias dibásicas, doenças do fígado agudas e crônicas, toxicidade através do valproato, e uma variedade de doenças convulsivas (COOPER e PLUM, 1987). Todas estas doenças levam a um enfraquecimento das funções do cérebro. As hiperamonemias adquiridas são aquelas que ocorrem devido à falência do fígado, devido à ingestão de toxinas, por infecção viral e devido aos resultados de doença autoimune. As hiperamonemias herdadas ocorrem devido à deficiência da *ornithine carbamonyl transferase* (OTC), enzima mitocondrial que catalisa a conversão ornitina-citrulina. Mais de 100 genes foram descritos para este tipo de hiperamonemia, e todos com mutações em uma simples substituição de uma base (TUCHMAN et al., 1996).

---

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Estudos Clínicos

Para os estudos clínicos considerados neste trabalho foi utilizada uma mistura de aminoácidos denominada Face®, para avaliação terapêutica em pacientes portadores da SXF. Este produto foi fornecido pela empresa LBE (Laboratório de Tecnologia para a Vida), São José, SC. Este projeto foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o nº 16/2004.

#### ■ Seleção do grupo

Os pacientes foram selecionados segundo sua classificação molecular.

- Zona gray ou limítrofe (45 a 54 repetições de CGG).
- Pré-mutados (55 a 200 repetições de CGG).
- Afetados com mais de 200 repetições de CGG.

O estudo molecular foi previamente realizado em todos os sujeitos da pesquisa, através de PCR e, quando necessário, por Southern Blotting. Os dados foram fornecidos pelo Laboratório Neurogene, Florianópolis, SC.

O estudo clínico foi duplo-cego, randomizado de Fase II. Quarenta e três participantes portadores da SXF participaram deste projeto. Devido à heterogeneidade da Síndrome, 3 grupos foram separados: 15 afetados (5 placebos, 10 Face®), 10 pré-mutados (6 placebos, 4 Face®), e 18 zona gray (3 placebos, 15 Face®).

### **3.1.1** *Aplicação de questionário para a avaliação clínica*

Foram aplicados questionários conforme tabela de fenótipos (Anexo 1), no qual constavam os sintomas mais comuns da Síndrome do X Frágil. O objetivo do questionário foi indentificar melhorias dos sintomas presentes. O questionário foi preenchido em um primeiro momento com “sim”, e “não”, constatando seus sintomas.

Os participantes receberam 2 frascos de Face® ou placebo, aleatoriamente, e após 60 dias eram reavaliados. Por ser um estudo duplo-cego, outro assistente, que não este pesquisador, colocou os nomes dos participantes da pesquisa nos frascos sem que o pesquisador principal nem a família soubessem do seu conteúdo.

Após intervenção, o mesmo questionário era preenchido, observando-se as melhorias e ou pioras ocorridas. Após o término da pesquisa, os participantes e esta pesquisadora interavam-se se haviam tomado a mistura de aminoácidos ou o placebo. Os participantes que tomaram placebo, após o término do estudo, optavam pela utilização do Face®.

### **3.1.2** *Termo de consentimento esclarecido (TCLE)*

Uma carta convite foi encaminhada aos responsáveis pelos participantes da pesquisa. Todos os integrantes da pesquisa foram suficientemente esclarecidos quanto aos objetivos e metodologia. Manifestaram seu desejo de participação como voluntários no projeto através do Termo de Consentimento Esclarecido (Anexo 2). No caso de qualquer intercorrência, os participantes foram orientados a entrar em contato, ficando este pesquisador à disposição para os devidos esclarecimentos. Em qualquer tempo, os

participantes tinham liberdade para interrupção de sua participação no estudo, caso assim o preferissem.

### 3.1.3 Reagentes

#### ■ O “pool” de aminoácidos Face®

Ingredientes ativos: mistura de aminoácidos

Propriedades químicas e físicas:

- Substância polar com radical amina
- Líquido e viscoso
- Transparente
- Aspecto da solução: límpida, com coloração topázio
- Odor: leve odor característico
- Densidade: 1,09
- pH: 2,2
- Solubilidade: solúvel em água

#### ■ Composição do Produto

A determinação do Face® foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), por separação em coluna de intercâmbio iônico e derivação pós coluna com OPA (ortophtaldialdeído). A composição foi determinada pela Universidade Nacional da Colômbia, Santa Fé de Bogotá, em setembro de 1995, e pelo Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Toxicologia (Tabela 4).

### 3.1.4 Administração do Face®

O Face® foi administrado na base de 15 gotas por paciente, duas vezes ao dia, atendendo recomendação do laboratório fornecedor (LBE). Por se tratar de um produto atóxico e, portanto, sem riscos para o paciente, o aminoácido foi administrado em seu próprio domicílio, durante o período de dois meses (2 frascos) com 50 ml cada.

**Tabela 4.** Composição da mistura de aminoácidos Face®, determinado por HPLC pela Universidade Nacional da Colômbia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Toxicologia (Obs.: Cisteína não pode ser analisada).

AMINOÁCIDO	Análise (mg/ml)
Ácido aspártico	10,20
Treonina	1,63
Hidroxiprolina	4,38
Prolina	7,73
Serina	2,46
Ácido glutâmico	2,22
Glicina	35,6
Alanina	14,3
Valina	0,79
Isoleucina	0,65
Leucina	2,26
Tirosina	0,60
Fenilalanina	3,48
Hidroxilisina	1,48
Ornitina	0,54
Etanolamina	0,30
Lisina	3,82
Histidina	0,24
Arginina	8,00
Metionina	0,10
<b>TOTAL</b>	<b>100,78</b>

Caso o paciente apresentasse qualquer reação adversa de difícil controle ou qualquer risco, o suplemento deveria ser imediatamente suspenso, e o indivíduo era retirado da pesquisa.

### 3.1.5 Avaliação estatística

Os parâmetros estatísticos foram demonstrados pela análise de  $\chi^2$ , pela frequência de sinais e através de tabelas. O programa estatístico utilizado foi o SPSS 14.0.

## 3.2 Testes Psicométricos

### ■ Seleção do grupo

Nesta etapa participaram 10 novos sujeitos afetados pela SXF, detectados por Southern blotting. Estes sujeitos não participaram da primeira etapa clínica. Foram selecionados para os testes psicométricos 10 meninos. Variaram de 10 a 25 anos de idade (média 17,5). Os testes foram aplicados e avaliados individualmente, por neuropsicóloga do Laboratório Neurogene (Florianópolis, SC), antes do tratamento e depois do tratamento com Face® sem grupo controle.

Foram administrados três frascos por sujeito, que tomavam 15 gotas duas vezes ao dia (dose sugerida pelo fabricante). Estes sujeitos participaram de três testes psicométricos diferentes, antes e após a intervenção com a mistura de aminoácidos.

Um segundo conjunto de testes foi realizado pela mesma profissional (neuropsicóloga), exatamente após o término dos três frascos. A mesma não teve nenhum contato com a avaliação anterior.

### 3.2.1 *Aplicação dos testes psicométricos*

Os tipos de testes escolhidos foram adaptados e validados no Brasil e abrangeram: cognição, comportamento e características autistas, conforme quesito da literatura internacional.

Os testes avaliados foram:

1. Escala de Comportamento Adaptativo Vineland (Vineland Adaptive Behavior Scales) (DOLL, 1940) (Anexo 3), prova que avalia a funcionabilidade e o grau de adaptação do comportamento. Contém subescalas para avaliação de comunicação, autoavaliação, socialização e motricidade.
2. Escala de Traços Autísticos (ATA) (BALLABRIGA, 1994) (Anexo 4).
3. Mini-Exame do Estado Mental (Mini-Mental State Examination (MMSE) (FOLSTEIN et al., 1975) (Anexo 5).

### 3.2.2 *Avaliação estatística*

Foi utilizada Análise de Variância, ANOVA, de medidas repetidas para comparar os resultados de ambas as aplicações dos testes com o objetivo de se conhecer o nível de significação das alterações obtidas. Os parâmetros estatísticos avaliados antes e após o uso do Face® foram avaliados pelo Teste *t*, e gráficos foram produzidos com auxílio do programa SPSS 14.0.

### 3.3 Estudo Experimental com Animais de Laboratório

#### 3.3.1 Reagentes para a captação de glutamato

Forma utilizados os seguintes reagentes: Ácido morfolino propanosulfônico (MOPS), albumina sérica bovina (BSA) 10 mg/mL, glicerol, beta mercaptoetanol, cloreto de colina, Folin, L-glutamato, ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA), e cloreto de sódio, todos da Sigma®; L-[<sup>3</sup>H] Glutamato (GE HealthCare); NaOH, SDS, Ditiotreitól (DTT) da Pharmacia Biotech®, TRIS-(hidroximetil)-aminometano e HEPES da USB®, ácido acético e formaldeído da Merck®; HBSS: CaCl<sub>2</sub> (1,29 mM desidratado); NaCl (136,9 mM); KCl (5,36 mM); MgSO<sub>4</sub> (0,65 mM); NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,27 mM); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(1,1 mM); Glicose (2 mM); Hepes (5 mM); Krebs-Ringer (KRB): KCl (30 mM); MgSO<sub>4</sub> (12 mM); Glicose (1 M); NaCl (1,22 M); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(4 mM); NaHCO<sub>3</sub> (250 mM); CaCl<sub>2</sub> (130 mM) e água.

Todos os outros reagentes utilizados foram de qualidade analítica e obtidos de fornecedores comerciais, como de praxe.

#### 3.3.2 Reagentes para determinação da concentração de amônia

Para determinação de amônia nas estruturas teciduais estudadas, utilizou-se um Kit colorimétrico proveniente da GOLD ANALISA, Kit uréia-PP (cat: 427).

#### 3.3.3 Equipamentos

Para os ensaios analíticos foram utilizados os seguintes equipamentos:

▣ Agitador de tubos, Phoenix®

▣ Cronômetro

- ▣ Analgesiômetro térmico, Ugo Basile®
- ▣ Banho-maria, Biomatic®
- ▣ Centrífuga Refrigerada, Himac CR20B2 – Hitachi®
- ▣ Centrífuga, 5804R – Eppendorf®
- ▣ Cintilador Tri-Carb 1600 TR – Packard®
- ▣ Potenciômetro – DM 20, Digimed®
- ▣ Pletismômetro - Ugo Basile®
- ▣ Espectrofotômetro (leitura em comprimento de onda de 600 nm)
- ▣ Chopper (para cortes histológicos)
- ▣ Balança analítica (Bioprecisa)

#### ▣ Seleção dos animais

O início do experimento ocorreu quando os ratos com linhagem Wistar-EPM-1 espécie Rato (*Rattus norvegicus*) tinham 21 dias de idade. Foram mantidas 12 horas com luminosidade e 12 horas no escuro, a 25°C, com ração e água. Os ratos foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Foram utilizados 24 animais machos de mesma idade, mantidos em 2 gaiolas diferentes, com 12 animais cada. O guia NIH para cuidados e uso de animais de laboratório (NIH Publications No. 85-23, revisado em 1985) foi seguido em todos os experimentos.

#### ▣ Administração dos aminoácidos

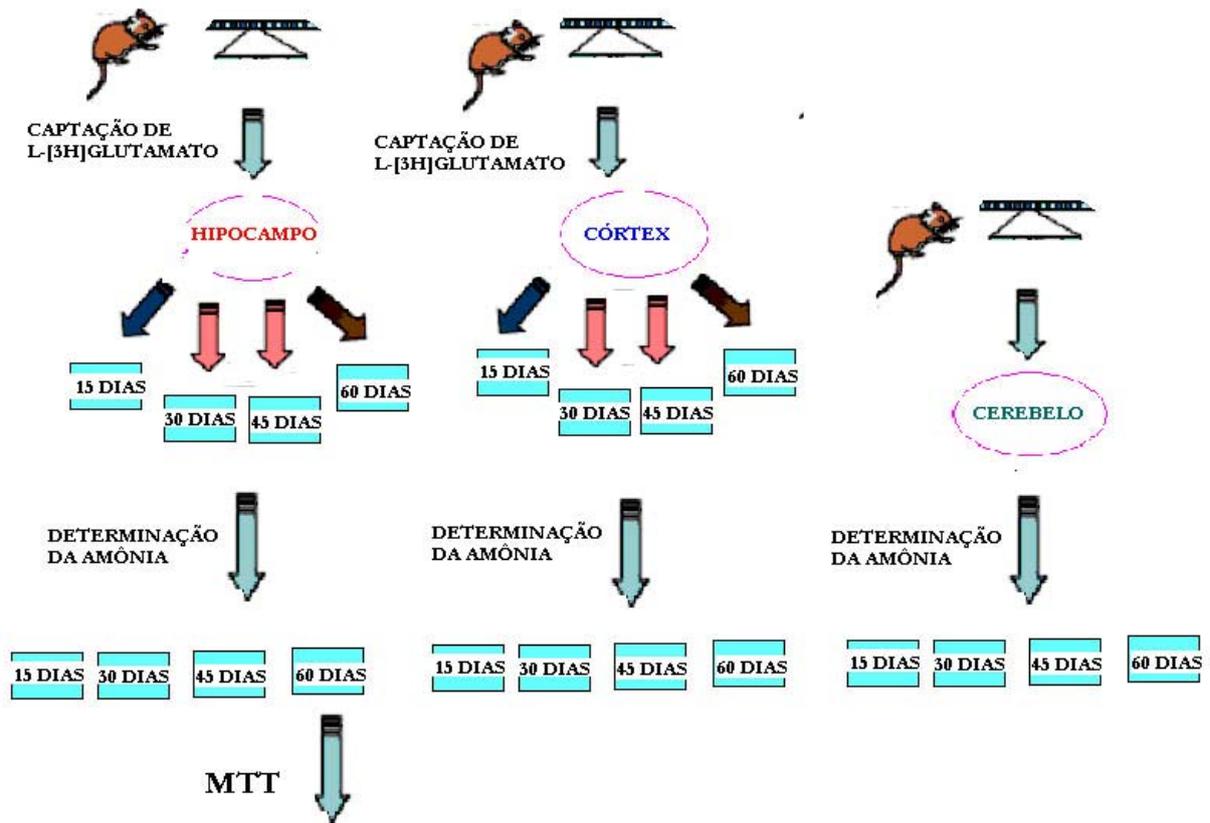
A dosagem do Face® foi determinada em relação à quantidade ingerida por humanos. Considerando que nos humanos foram utilizados 30 gotas/dia em relação ao peso médio (30 kg), foi feita uma relação volume por peso médio de ratos (peso médio

300g). Desta forma administrou-se 15  $\mu\text{L}$  de Face® diluído em 185  $\mu\text{L}$  de água, o que corresponde aproximadamente à dosagem de 50  $\mu\text{L}/\text{kg}$  (50 mg/kg da mistura) no animal. Todos eram machos, e receberam a mesma porção no tratamento: 200  $\mu\text{L}$  de Face® (pool de aminoácidos) e 200  $\mu\text{L}$  de solução salina, utilizada como controle. O tratamento foi administrado por via oral, através de gavagem durante 60 dias ininterruptos.

Doze animais foram alimentados uma vez ao dia com suplemento Face®, com concentração de aproximadamente 50  $\mu\text{L}/\text{kg}/\text{dia}$ , e 12 animais controle foram alimentados com solução salina a 9‰, uma vez ao dia, com a mesma quantidade.

Nos dias 15, 30, 45 e 60, 3 animais tratados com Face® e 3 animais “Controle” foram decapitados, para realização dos experimentos de captação de glutamato. Neste mesmo dia foram separadas e congeladas as estruturas de hipocampo, córtex e cerebelo para determinação da amônia. O teste de viabilidade celular foi realizado somente em hipocampo, aos 60 dias.

Quatro animais tratados com Face® e 4 controles foram pesados durante o tratamento nos dias 8, 21, 40 e 60.



**Figura 12.** Metodologia empregada para os experimentos com animais (Ratos Wistar).

### 3.3.4 Ensaio da captação de L-[3H]-glutamato em fatias de hipocampo e córtex

A captação de L-[3H]-glutamato foi avaliada como previamente descrita por MOLZ et al. (2005).

Vinte e quatro ratos Wistar foram mortos por decaptação, sendo o cérebro rapidamente removido, e as estruturas cerebrais como hipocampo e o córtex foram dissecados em uma placa de Petri a 4°C mantidas em gelo e umedecidas com tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB). O tampão foi borbulhado com 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> para atingir o pH 7,4.

Um hipocampo e um hemisfério do córtex cerebral de cada rato foram colocados sobre a superfície do Chopper para obtenção de fatias com espessuras de 0,4 mm. Uma fatia escolhida por tubo (tanto hipocampo como córtex) foi incubada por 15 min em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) a 37 °C para captação total. O HBSS é composto por CaCl<sub>2</sub>, 1,29 mM; NaCl, 136,9 mM; KCl, 5,36 mM; MgSO<sub>4</sub>, 0,65 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,27 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,1 mM; Glicose, 2 mM; e Hepes, 5 mM. A captação é iniciada adicionando-se 0,33 µCi/ml de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato marcado. A incubação foi interrompida após 7 min através de duas lavagens com 1 ml de HBSS gelado seguido imediatamente pela adição de 0,1N NaOH / 0,01% SDS por 15 min. Alíquotas dos lisados foram retiradas para a determinação do conteúdo intracelular de radioatividade de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato através do contador de cintilação líquida.

A captação específica e de alta afinidade de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato dependente de sódio foi calculada como a diferença entre a captação obtida com o meio de incubação descrito acima (captação total) e a captação obtida em ensaios realizados na ausência de íons sódio, utilizando cloreto de colina em substituição ao cloreto de sódio (captação independente de sódio). O HBSS-colina é composto pelos mesmos sais, com exceção do NaCl, incluindo então o cloreto de colina com concentração de 137 mM. Os resultados foram expressos em nmol de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato por miligrama de proteína por minuto.

### 3.3.5 *Dosagem de proteína*

As fatias dos experimentos foram separadas para determinação do conteúdo da proteína pelo método de LOWRY et al. (1951). A concentração de proteína foi determinada usando albumina bovina sérica como padrão.

### 3.3.6 *Análise estatística dos ensaios de captação de glutamato*

Os resultados obtidos foram avaliados por comparação entre os grupos controle e tratados com aminoácido Face® em função do tempo do experimento realizado (15, 30, 45 e 60 dias). O programa SPSS versão 14.0 foi utilizado para a análise dos dados. O teste ANOVA de uma via foi seguido pelo teste de Duncan com o teste Post Hoc.

## 3.4 Viabilidade Celular

A análise de viabilidade celular foi realizada pelo método descrito por MOSMANN (1983). O método MTT é amplamente utilizado para quantificar células com viabilidade celular. A redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimeiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) foi medida para determinar a viabilidade celular. O MTT é um sal de formazan convertido a um formazan púrpura insolúvel por desidrogenases mitocondriais e/ou agentes redutores celulares, e a taxa desta reação é proporcional à atividade de desidrogenases mitocondriais. Fatias de hipocampo foram incubadas com MTT (0,5 mg/ml) em KRB por 20 min a 37°C. O meio foi aspirado, e o precipitado formado foi solubilizado com dimetil sulfóxido, e a viabilidade foi quantificada espectrofotometricamente a 550 nm. Os dados foram apresentados através de porcentagem da sobrevivência em relação ao tratamento realizado. Todos os experimentos foram feitos em triplicata, utilizando-se suas médias.

### 3.5 Determinação da Amônia nas Estruturas de Hipocampo, Cerebelo e Córtex

A determinação da amônia foi realizada através de estruturas cerebrais: hipocampo, córtex e cerebelo. As estruturas: 1 hipocampo, 1/4 do córtex, e 1/3 do cerebelo foram congeladas em tubos Eppendorf, em freezer a -20°C. Quando usadas, as peças foram pesadas, e homogeneizadas com solução salina fisiológica 9%.

As estruturas foram homogeneizadas em 1ml de solução salina fisiológica quando cerebelo e córtex, e 600 µL de solução fisiológica quando hipocampo. Dez microlitros foram retirados do homogenato total e tratados de acordo com o protocolo do Kit Gold ANALISA. O aparelho foi calibrado em 600 nm, através do branco fornecido com o Kit.

Os cálculos foram realizados segundo as instruções do fabricante e a quantidade de amônia foi expressa por mg de tecido.

Os resultados finais, portanto, foram expressos em nmol/mg tecido.

#### 3.5.1 *Análise estatística da amônia*

Os resultados obtidos foram avaliados por comparação entre os grupos controle e Face® em função das estruturas e do tempo de experimento: 15, 30, 45 e 60 dias, utilizando o programa SPSS versão 14.0; os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a média da triplicata foi utilizada como resultado final. Os dados foram analisados pelo método estatístico ANOVA de uma via seguido do teste Duncan quando apropriado.

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Estudo Clínico

#### ▣ Avaliação da população com SXF

Foi realizada avaliação do estudo clínico em uma amostra com 43 participantes com a Síndrome do X Frágil. Os pacientes foram subdivididos em suas respectivas categorias: 15 Afetados (34,9%), 10 Pré-mutados (23,30%), e 18 Zona gray (41,9%).

Vinte e três participantes eram de sexo masculino (53,5%) e 20 de sexo feminino (46,5%). O estudo foi duplo-cego, randomizado, placebo-controlado e analisou 2 grupos:

- Grupo 1: Placebo (n=14) (32,6%), distribuídos em 5 afetados, 6 pré-mutados e 3 zona gray.
- Grupo 2: Face® (n=29) (67,4%), distribuídos em 10 afetados, 4 pré-mutados e 15 zona gray.

Os questionários foram respondidos antes e depois do tratamento.

Os sintomas foram variados, mas a maioria dos participantes apresentou, antes de começar o tratamento, problemas emocionais (100% dos pacientes), de aprendizado (97,7%) e comportamental (95,3%). O grupo Placebo e o grupo tratado com Face® foram avaliados isoladamente como segue:

### ▣ Grupos Placebo e Face®

Dos 43 participantes, 64% (26) melhoraram algum sintoma. Os efeitos colaterais mais encontrados foram: agitação e nervosismo (9,3%), problemas gástricos (4,7%) e alteração no apetite (2,3%). Do total dos participantes 31 (72,1%) apresentavam alterações físicas, 20 (46,5%) apresentavam retardo mental, 20 (46,5%) com problemas na fala, 8 (18,6%) com autismo, 42 (97,7%) com distúrbios no aprendizado, 41 (95,3%) com alteração comportamental, 43 (100%) apresentaram problemas emocionais e 4 (9,3%) apresentavam problemas motores.

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos com o Grupo Placebo; a Tabela 6 considera os resultados obtidos com o Grupo Face®.

**Tabela 5.** Grupo Placebo, distribuído em categorias, mostrando os sintomas presentes nos participantes. São apresentados o número de indivíduos sintomáticos (Antes), e o número de indivíduos que obtiveram melhoras (Depois) após intervenção.

SINTOMA	CATEGORIA			
	Afetados (n=5)	Pré-mutados (n=6)	Zona gray (n=3)	Total (n=14)
	Antes/depois	Antes/depois	Antes/depois	Antes/depois
Alteração física	5/0	2/0	2/0	9/0
Retardo mental	5/0	1/0	-	6/0
Fala	4/0	-	1/0	5/0
Autismo	1/0	-	-	1/0
Aprendizado	5/0	5/0	3/0	13/0
Comportamento	5/0	6/1	1/0	12/1
Emocional	5/0	6/1	3/0	14/1
Motor	1/0	-	-	1/0

Observa-se da Tabela 5 que o grupo placebo não apresentou significância.

**Tabela 6.** Grupo Face®, distribuído em categorias, mostrando os sintomas presentes nos participantes. São apresentados o número de indivíduos sintomáticos (Antes), e o número de indivíduos que obtiveram melhoras (Depois) após intervenção.

SINTOMA	CATEGORIA			
	Afetados (n=10)	Pré-mutados (n=4)	Zona gray (n=15)	Total (n=29)
	Antes/depois	Antes/depois	Antes/depois	Antes/depois
Alteração física	10/0	-	12/0	22/0
Retardo mental	8/0	-	6/0	14 /0
Fala	7/6	-	8/0	15 /6
Autismo	3/1	-	4/0	7 /1
Aprendizado	10/10*	4/3	15/6*	29/19*
Comportamento	10/10*	4/0	15/13*	29 /23*
Emocional	10/10*	4/2	15/13*	29/25*
Motor	-	-	3/0	3/0

\*A redução dos sintomas como aprendizado, comportamento, e emoção, foram obtidas após intervenção com Face® (P <0,001).

O efeito do Face® nos pacientes afetados e zona gray mostraram-se sensíveis, como mostra a tabela com sintomas e sinais específicos (Tabela 7).

É importante observar que 86% (25 dos 29 sujeitos) tratados melhoram com Face®. Ao contrário, os sujeitos que tomaram placebo conservaram suas características iniciais, mostrando que não houve modificações importantes pós-tratamento.

O efeito do Face® nos indivíduos tratados foi muito positivo. Dos 42 sinais clínicos apresentados na tabela de fenótipos (Questionário) submetidos aos participantes com a SXF afetados, os sinais que mais demonstraram melhoras foram: concentração, déficit de memória, repetição, auto-agressão, agitação, e timidez. Além

disso, observou-se que os indivíduos tratados passaram a resolver melhores as situações rotineiras, conforme detectado pelas entrevistas (Tabela 7).

**Tabela 7.** Sinais específicos dos 29 indivíduos (afetados, pré-mutados e zona gray) antes (A) e depois (D) de medicados com Face®. São dados também os respectivos percentuais em relação ao total de indivíduos considerados em cada categoria.

#	SINAIS	Código	SINAIS ESPECÍFICOS	CATEGORIAS											
				Afetados				Pré-mutados				Zona Gray			
				n = 8				n = 4				n = 17			
				A	%	D	%	A	%	D	%	A	%	D	%
1	Físico	1l	Distúrbio esfinteriano	3	37,5	2	25,0	0	0,0	0	0,0	2	11,8	2	11,8
		1p	Tremor	0	0,0	0	0,0	1	25,0	1	25,0	0	0,0	0	0,0
3	Fala	3a	Não fala	1	12,5	1	12,5	0	0,0	1	25,0	1	5,9	0	0,0
		3b	Não termina frase	5	62,5	2	25,0	0	0,0	0	0,0	6	35,3	2	11,8
		3c	Come palavras	4	50,0	2	25,0	0	0,0	0	0,0	4	23,5	1	5,9
		3d	Troca palavras	4	50,0	1	12,5	0	0,0	0	0,0	6	35,3	2	11,8
5	Aprendizado	5a	Problemas matemática	8	100,0	2	25,0	0	0,0	0	0,0	9	52,9	2	11,8
		5b	Problemas compreensão	6	75,0	4	50,0	0	0,0	0	0,0	11	64,7	5	29,4
		5c	Concentração	8	100,0	7	87,5	1	25,0	1	25,0	12	70,6	8	47,1
		5d	Déficit de memória	8	100,0	4	50,0	4	100,0	3	75,0	13	76,5	5	29,4
		5e	Escreve com dificuldade	5	62,5	4	50,0	0	0,0	0	0,0	6	35,3	2	11,8
		5f	Não escreve	3	37,5	1	12,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
6	Comportamental	6a	Agressividade	3	37,5	3	37,5	0	0,0	0	0,0	2	11,8	1	5,9
		6b	Repetitivo	8	100,0	3	37,5	0	0,0	0	0,0	12	70,6	5	29,4
		6c	Imitativo	5	62,5	1	12,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
		6d	Hiperativo	6	75,0	2	25,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
		6e	Maneirismos de mãos	5	62,5	3	37,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
		6f	Olhar evasivo	7	87,5	2	25,0	0	0,0	0	0,0	9	52,9	3	17,6
		6g	Isolamento social	3	37,5	2	25,0	0	0,0	0	0,0	9	52,9	4	23,5
		6h	Impulsivo	4	50,0	1	12,5	0	0,0	0	0,0	6	35,3	1	5,9
		6i	Instabilidade de humor	5	62,5	4	50,0	3	75,0	3	75,0	12	70,6	7	41,2
		6j	Tiques nervosos	6	75,0	3	37,5	0	0,0	0	0,0	5	29,4	1	5,9
		6k	Auto agressão	5	62,5	4	50,0	1	25,0	1	25,0	0	0,0	0	0,0
		6l	Agitado	7	87,5	4	50,0	0	0,0	0	0,0	7	41,2	3	17,6
		6m	Dependente	4	50,0	1	12,5	0	0,0	0	0,0	5	29,4	4	23,5
		6n	Sem iniciativa	1	12,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	17,6	1	5,9

	6o	Fixação	2	25,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	6p	Iritado	4	50,0	4	50,0	1	25,0	1	25,0	10	58,8	3	17,6	
	6r	Mudança na rotina	2	25,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	5,9	1	5,9	
	6s	Nervoso	3	37,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	6t	Devagar	3	37,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
7	Emocional	7a	Timidez	4	50,0	2	25,0	3	75,0	3	75,0	10	58,8	6	35,3
		7b	Depressão	0	0,0	0	0,0	4	100,0	4	100,0	5	29,4	3	17,6
		7c	Stress	4	50,0	1	12,5	3	75,0	3	75,0	5	29,4	2	11,8
		7d	Não resolve problemas	6	75,0	3	37,5	0	0,0	0	0,0	12	70,6	5	29,4
		7e	Ansioso	6	75,0	1	12,5	3	75,0	1	25,0	10	58,8	3	17,6
		7f	Triste	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	5,9	1	5,9
		7h	Autoestima baixa	2	25,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
		7i	Fantasia	2	25,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
		7j	Medo	3	37,5	1	12,5	1	25,0	1	25,0	2	11,8	1	5,9
		7k	Pavor noturno	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	5,9	1	5,9
		8	Motor	8a	Não caminha	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
8b	Caminha com dificuldade			0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	11,8	1	5,9

A = antes do tratamento; D = depois do tratamento.

É importante, no entanto, ressaltar que os indivíduos zona gray e os afetados apresentaram resultados estatisticamente significante ( $P < 0,001$ ). Em indivíduos zona gray, os sinais que responderam com melhoras foram: concentração, déficit de memória, escrita, agressividade, comportamento repetitivo, hiperatividade, isolamento social, impulsividade, tiques nervosos, aquisição de segurança, iniciativa, e irritação. Também apresentaram sintomas de menor ansiedade.

Os sujeitos pré-mutados que tomaram face®, apesar da pequena amostra (4 participantes), foram avaliados para 35 sinais clínicos, através do questionário. Destes, 23 sintomas (66%) obtiveram melhoras (tabela 7), mas não estatisticamente significativas.

## 4.2 Testes Psicométricos

Foram realizados três testes com objetivo de avaliar o desempenho cognitivo global, e disfunções específicas de atenção, memória, linguagem e funções executivas. Os testes escolhidos foram: o teste ATA (Escala de traços autistas), MMSE (Mini-Mental State Examination), e o teste de escala de comportamento adaptativo Vineland.

Os testes foram aplicados por uma profissional especializada, neuropsicóloga, em 10 novos pacientes, e somente para indivíduos do tipo “afetado”. Os testes foram executados antes e depois de tomarem o Face® ( Tabela 10). Não houve grupo controle.

O teste estatístico ANOVA (Teste *t*) mostrou em todos os testes utilizados benefícios após o uso do Face®.

O teste de Escala de Comportamento Adaptativo Vineland avaliou vários domínios da criança: vida cotidiana, socialização, hábitos, aspectos motores e ocupacionais. As médias foram avaliadas em relação aos seguintes parâmetros: total de pontos do grupo antes do tratamento, 68,5 pontos, e pós-tratamento, 71,94 pontos, com significância estatística ( $P < 0,001$ ); idade social antes do tratamento, 8,35 pontos, e pós-tratamento, 9,19 pontos, com significância estatística ( $P < 0,004$ ); e a média de pontos do quociente social antes do tratamento, 61,1 pontos, e pós-tratamento, 67,26 pontos, com ( $P < 0,001$ ) (Ver Figuras 13 a 15).

Os resultados do teste ATA (Escala de Traços Autistas) apresentaram médias de 16,1 pontos antes de começar o tratamento e após tratamento 13,3 pontos, e foram

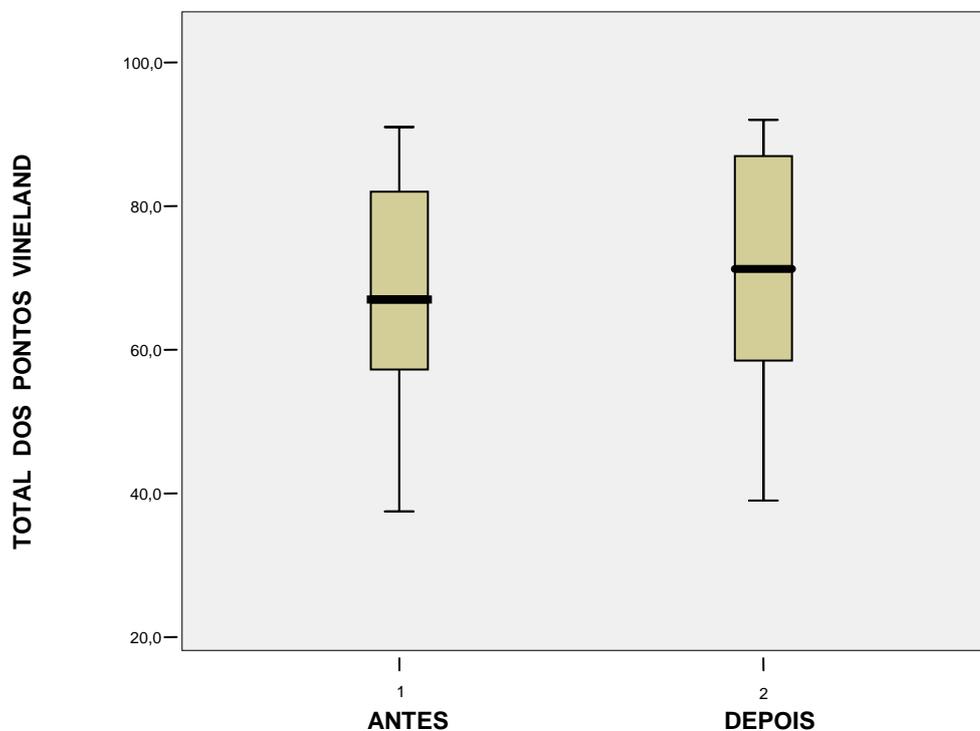
estatisticamente signativos ( $P < 0,001$ ) (Ver Figura 16). Mostraram melhoras nas questões: (II) manipulação do ambiente, (IV) resistência a mudança, (VI) falta de contato visual, (XIII) falta de atenção, (XIV) ausência de interesse pela aprendizagem, (XVI) alteração de linguagem e comunicação, (XVIII) reações inapropriadas ante a frustração.

**Tabela 8.** Pontuação dos Testes Psicométricos (Teste ATA, MMSE e Escala de Comportamento Adaptativo de Vineland) aplicados em 10 indivíduos afetados antes e após intervenção com Face®. Não existiu grupo controle.

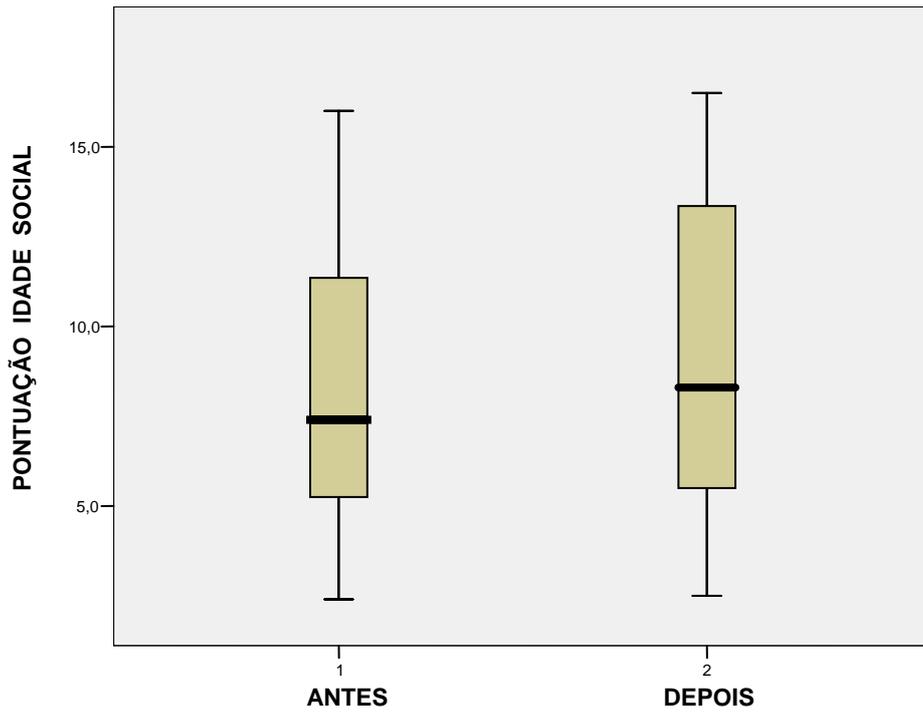
<b>TESTES PSICOMÉTRICOS</b>										
<b>afetados n=10</b>				<b>VINELAND</b>						
<b>Ind.</b>	<b>Teste ATA</b>		<b>MMSE</b>		<b>Total de pontos</b>		<b>Idade Social</b>		<b>Quociente social</b>	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
1	40	36	2	3	50,5	52,0	4,1	4,3	53,9	54,4
2	13	11	18	19	91,0	92,0	16	16,5	78,1	81,2
3	11	7	13	15	81,5	85,9	11,2	12,3	85,4	91,7
4	16	12	22	24	72,0	75,5	8,9	9,5	33,0	36,6
5	12	8	10	12	82,5	88,0	11,5	14,4	87,1	107,4
6	9	8	10	11	59,0	59,5	5,6	5,7	101,8	98,2
7	28	25	1	2	55,5	57,5	4,9	5,3	47,2	48,5
8	9	7	13	17	66,5	72,0	7,3	8,5	73,0	77,9
9	11	10	15	17	63,0	66,5	6,5	7,3	18,8	20,9
	<b>P&lt;0,001</b>		<b>P&lt;0,002</b>		<b>P&lt;0,001</b>		<b>P&lt;0,004</b>		<b>P&lt;0,001</b>	

O MMSE visa, através de escalas numéricas, atribuir pontuações para orientação temporal, memória, atenção e cálculo, evocação de palavras, e linguagem. O teste MMSE (Mini-Mental State Examination) também mostrou resultados positivos. A média apresentada antes do tratamento foi de 11,4 pontos, enquanto que após o tratamento foi de 13,5 pontos, com uma melhora significativa no desempenho mental das crianças ( $P<0,002$ ) (Figura 17). Dos resultados obtidos desprenderam-se importante

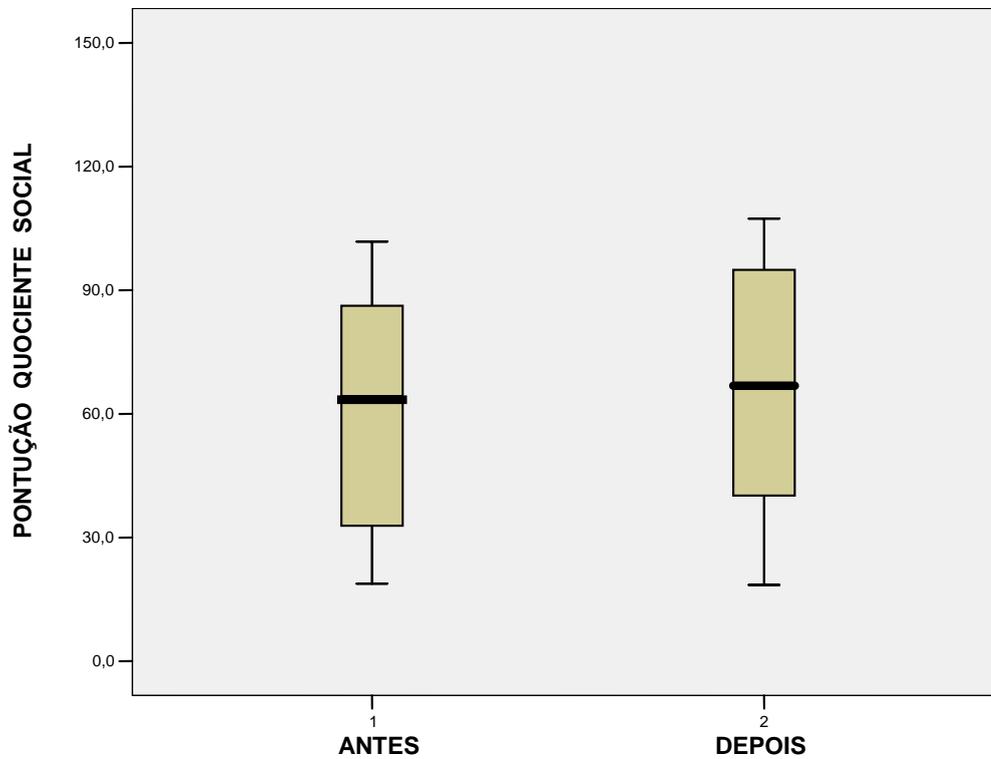
pontuação nas questões de orientação temporal, orientação espacial, memória de fixação e linguagem (Anexo 5), com melhoras após o tratamento com Face®.



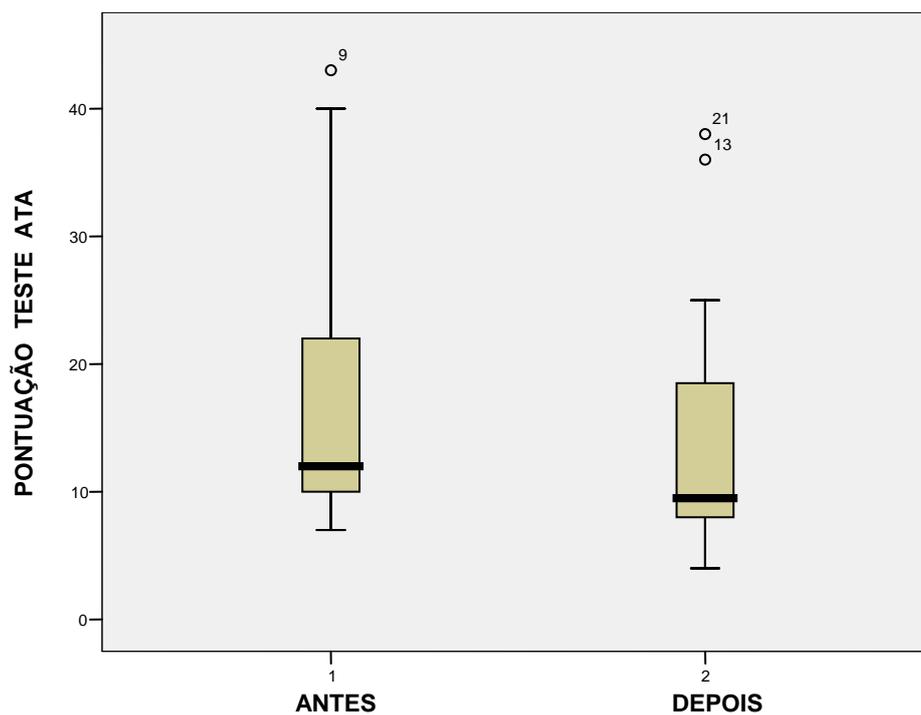
**Figura 13.** Teste de escala de comportamento adaptativo Vineland em relação ao total de pontos, mostrando os resultados antes e depois do Face®.



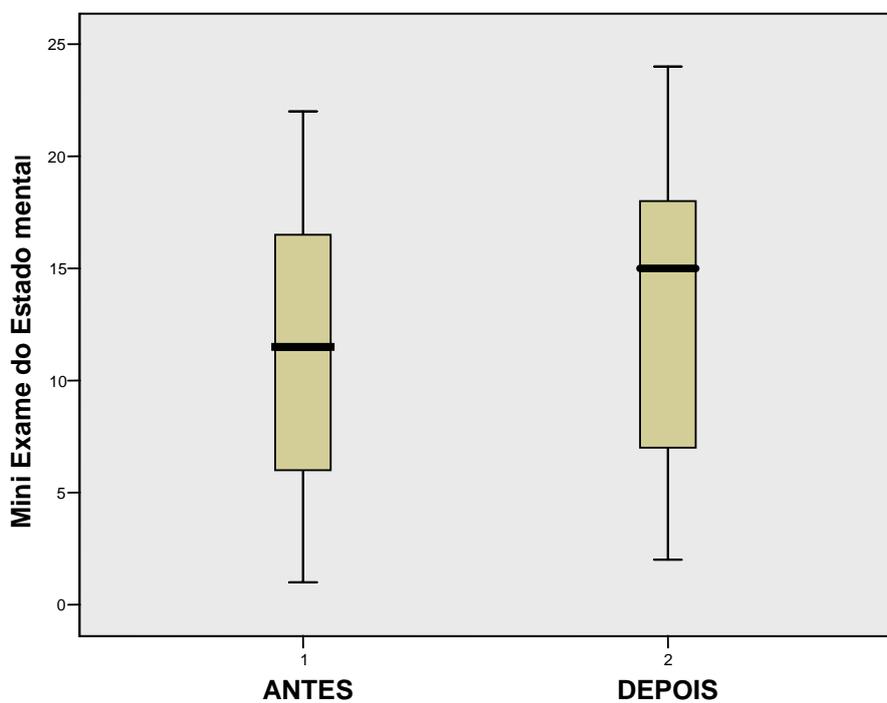
**Figura 14.** Teste de escala de comportamento adaptativo Vineland em relação à idade social, mostrando os resultados antes e depois do Face®.



**Figura 15.** Teste de escala de comportamento adaptativo Vineland em relação ao quociente social, mostrando os resultados antes e depois do Face®.



**Figura 16.** Teste de escala ATA, mostrando os resultados antes e depois do Face®.

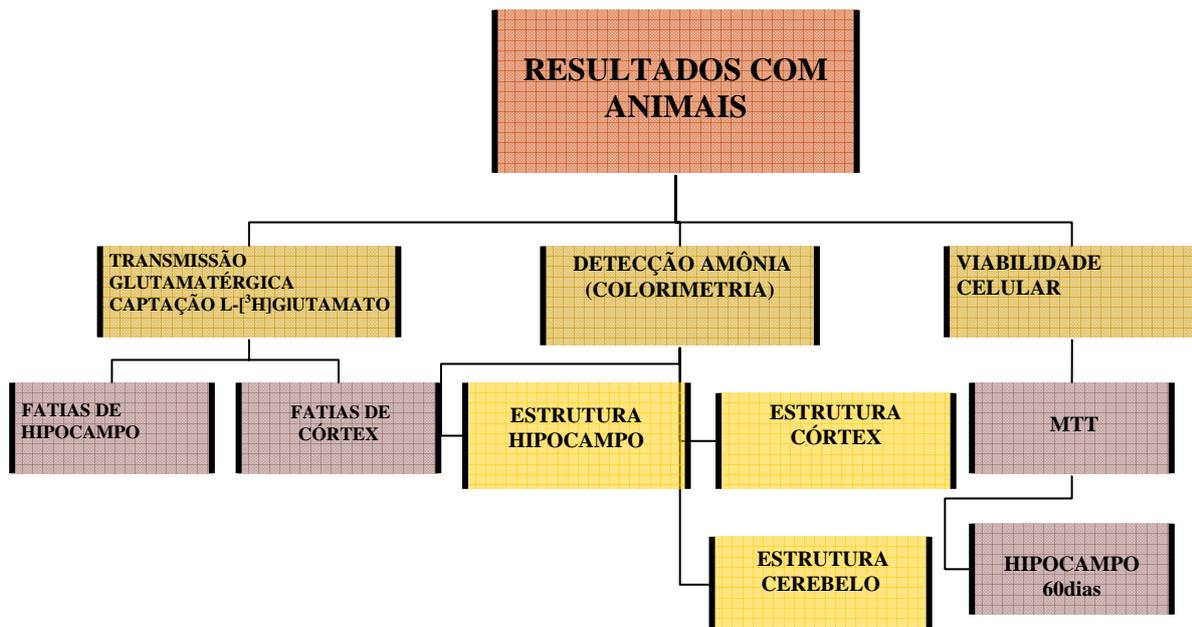


**Figura 17.** Teste MMSE, mostrando os resultados antes e depois do Face®.

### 4.3 Estudos Experimentais com Animais de Laboratório

Os resultados serão apresentados detalhadamente, conforme o diagrama mostrado na Figura 19.

O efeito do *pool* de aminoácidos Face® sobre a neurotransmissão glutamatérgica foi avaliado através da captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato nas preparações de estruturas cerebrais (fatias de hipocampo e fatias de córtex cerebral) em ratos Wistar em quatro diferentes tempos: 15, 30, 45 e 60 dias, após administração oral de solução salina e do *pool* de aminoácido Face® com concentração relativa à ministrada para humanos.



**Figura 18.** Diagrama das avaliações e resultados experimentais.

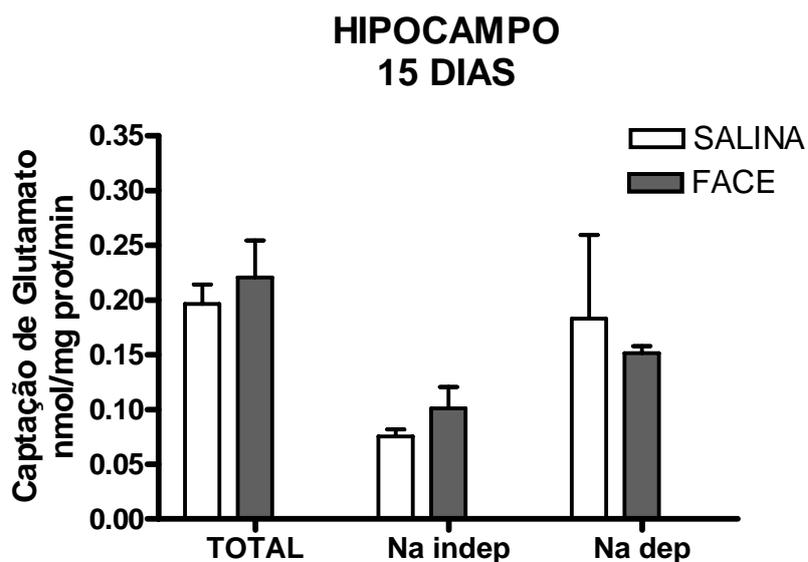
#### 4.3.1 *Estudos da neurotransmissão glutamatérgica através da captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato em fatias de hipocampo.*

Foi realizada avaliação da captação L-[<sup>3</sup>H]-glutamato em fatias de hipocampo em ratos de linhagem Wistar tratados com FACE® e solução salina. A captação total de glutamato (Total), independente de Na<sup>+</sup> (Na indep) e dependente de Na<sup>+</sup> (Na dep) foi realizada para quatro experimentos. Cada um dos experimentos foi realizado em triplicata nos tempos: 15, 30, 45 e 60 dias.

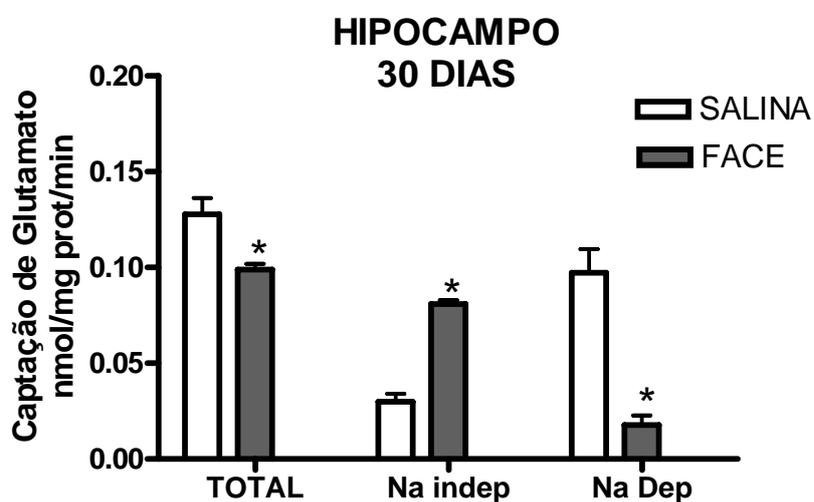
Em nosso estudo foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os ratos controle e os tratados com *pool* de aminoácidos-Face® em fatias de hipocampo aos 30 dias.

Aos 15 dias de tratamento não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os ratos controle e os tratados com Face®, quanto à captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato por fatias hipocampais: captação total (P=0,864), captação independente de Na<sup>+</sup> (P=1,00) e dependente de Na<sup>+</sup> (P=1,00) (Figura 19).

Aos 30 dias de tratamento, em fatias de hipocampo, a captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato mostrou significância através do teste estatístico ANOVA tanto na captação total (P=0,002) como na captação independente de Na<sup>+</sup> (P=0,000), bem como na captação dependente de Na<sup>+</sup> (P=0,000). Foi observada uma diminuição significativa na captação total, um aumento significativo na captação independente de Na<sup>+</sup>, e uma diminuição na captação dependente de Na<sup>+</sup> (Figura 20).



**Figura 19:** Captação de glutamato total, independente de  $\text{Na}^+$  e dependente de  $\text{Na}^+$  em fatias de hipocampo, aos 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. Não houve diferença estatística.

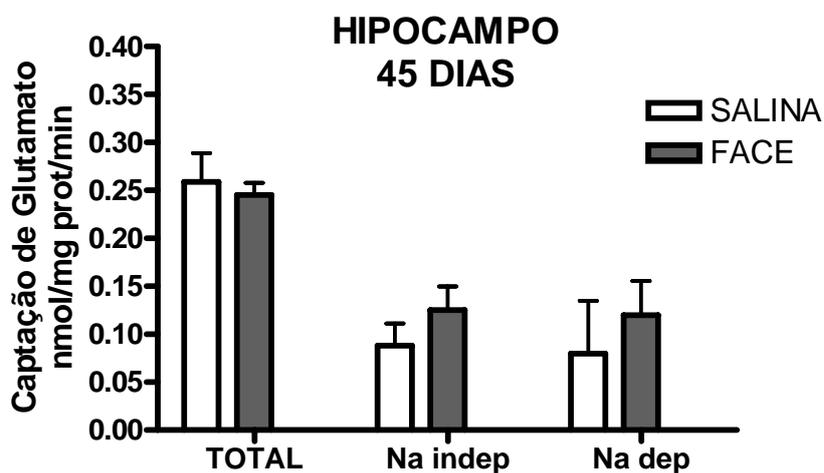


**Figura 20.** Captação de glutamato total, independente de  $\text{Na}^+$  e dependente de  $\text{Na}^+$  em fatias de hipocampo, aos 30 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. Não houve diferença estatística

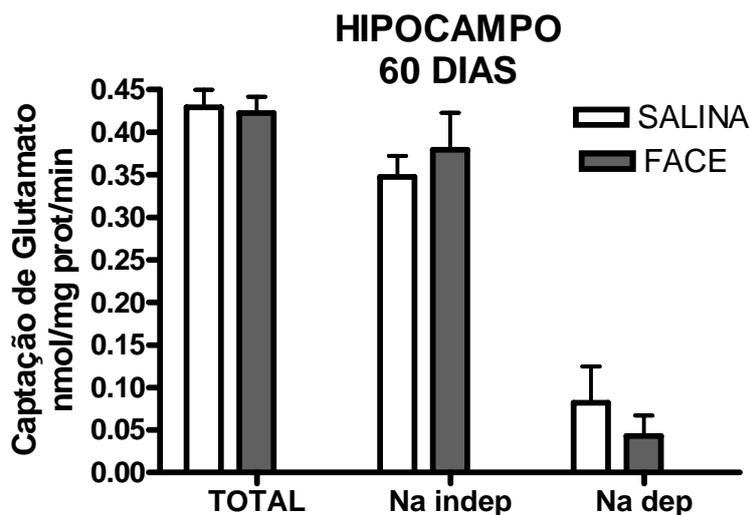
Aos 45 dias não se obteve nenhuma diferença significância: captação total ( $P=1,00$ ) captação independente de  $\text{Na}^+$  ( $P=0,571$ ), e captação dependente de  $\text{Na}^+$  ( $P=0,896$ ), aos 45 dias (Figura 21).

Aos 60 dias, novamente as fatias de hipocampo apresentaram: captação total ( $P=0,901$ ), captação independente de  $\text{Na}^+$  ( $P=0,725$ ), e captação independente de  $\text{Na}^+$  ( $P=0,999$ ) (Figura22).

Todos os resultados foram analisados através do programa SPSS 14, pela comparação entre os grupos: one-way ANOVA seguidos do teste Post Hoc, para Tukey HSD, sendo que a variável principal foi o total de captação em relação aos grupos. A captação de glutamato está expressa em  $\text{nmol/mg proteína/min}$ . Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes e de suas respectivas triplicatas.



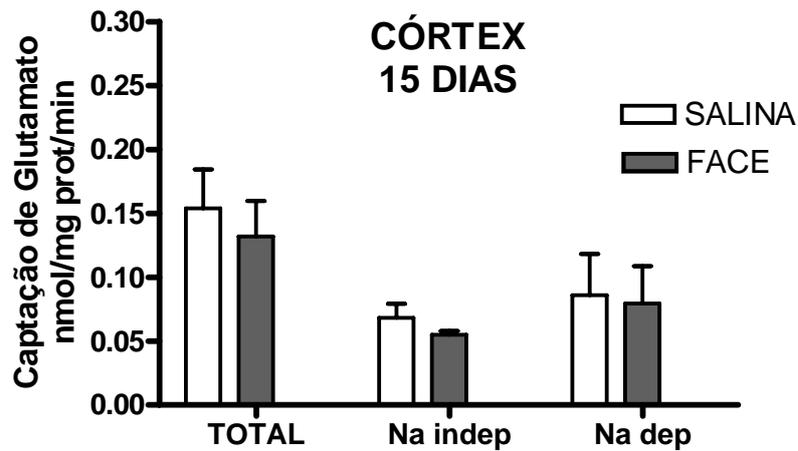
**Figura 21.** Captação de glutamato total, independente de  $\text{Na}^+$  e dependente de  $\text{Na}^+$  em fatias de hipocampo, aos 45 dias. Os dados estão representados como média e seus respectivos desvios padrão. Não houve diferença estatística.



**Figura 22.** Captação de glutamato total, independente de  $\text{Na}^+$  e dependente de  $\text{Na}^+$  em fatias de hipocampo, aos 60 dias. Os dados estão representados como média e seus respectivos desvios padrão. Não houve diferença estatística.

#### 4.3.2 *Estudos da neurotransmissão glutamatérgica através da captação de L-[ $^3\text{H}$ ]-glutamato em fatias de córtex cerebral*

Aos 15 dias, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os ratos controle e tratados com Face® quanto à captação L-[ $^3\text{H}$ ]-glutamato em fatias de córtex; captação total ( $P = 0,879$ ), captação independente de  $\text{Na}^+$  ( $P = 0,985$ ) e dependente de  $\text{Na}^+$  ( $P = 0,999$ ) (Figura 23).

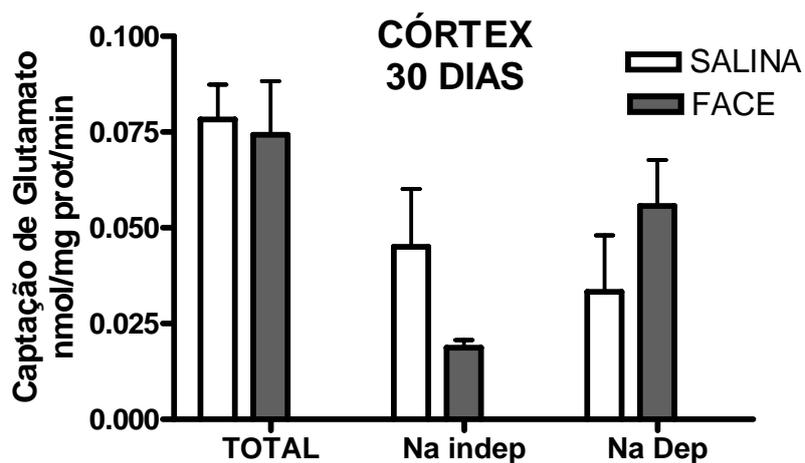


**Figura 23:** Captação de glutamato total, independente de  $\text{Na}^+$  e dependente de  $\text{Na}^+$  em fatias de córtex, aos 15 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. Não houve diferença estatística.

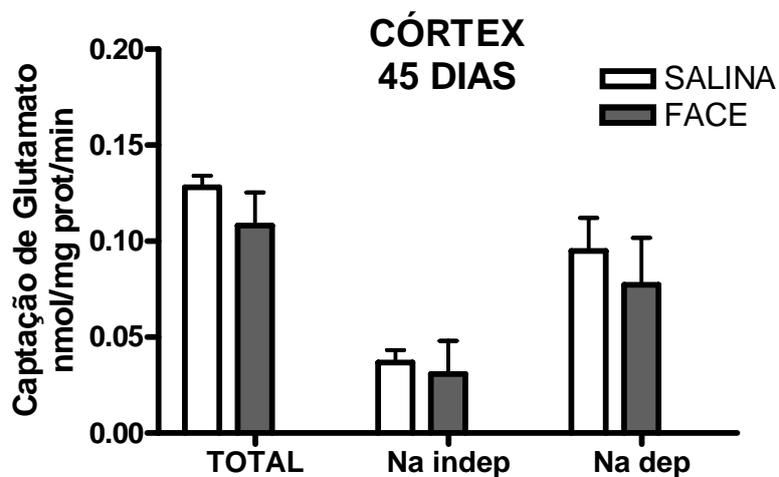
Aos 30 dias, a captação total apresentou ( $P = 0,998$ ), captação independente de  $\text{Na}^+$  ( $P = 0,154$ ) e captação dependente de  $\text{Na}^+$  ( $P = 0,280$ ) (Figura 24).

Aos 45 dias, a captação L- $^3\text{H}$ ]-glutamato mostrou: captação total ( $P=0,598$ ), captação independente de  $\text{Na}^+$  ( $P=0,996$ ) e captação dependente de  $\text{Na}^+$  ( $P=0,706$ ). (Figura 25).

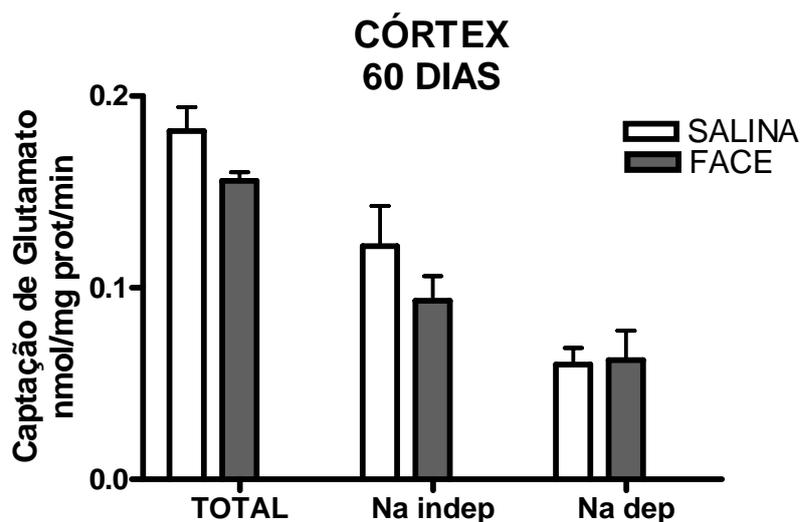
A análise estatística para 60 dias mostrou: captação total:  $P=0,242$ , captação independente de  $\text{Na}^+$  ( $P = 0,177$ ), e a captação dependente de  $\text{Na}^+$  ( $P = 1,00$ ). (Figura 26).



**Figura 24.** Captação de glutamato total, independente de  $\text{Na}^+$  e dependente de  $\text{Na}^+$  em fatias de córtex, aos 30 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. Não houve diferença estatística.



**Figura 25.** Captação de glutamato total, independente de  $\text{Na}^+$  e dependente de  $\text{Na}^+$  em fatias de córtex, aos 45 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. Não houve diferença estatística.



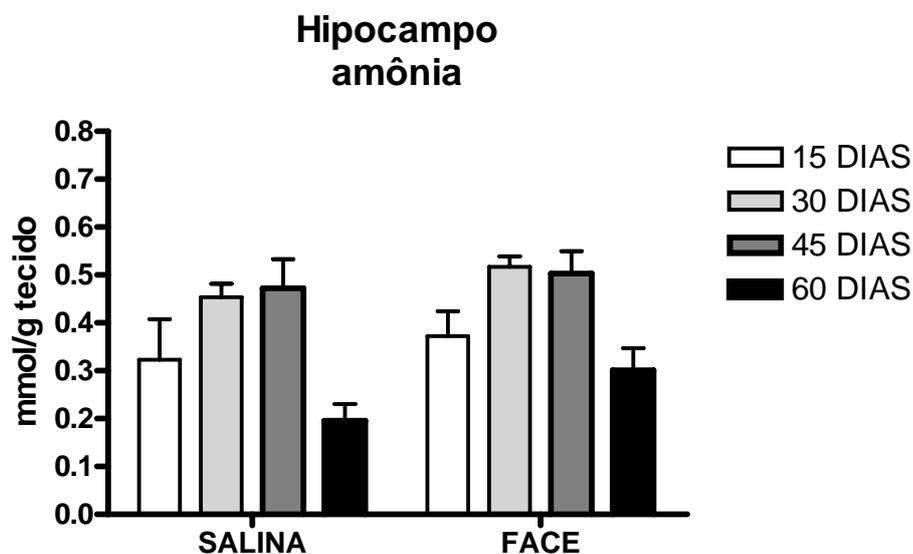
**Figura 26.** Captação de glutamato total, independente de  $\text{Na}^+$  e dependente de  $\text{Na}^+$  em fatias de córtex, aos 60 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata.

#### 4.4 Determinação da Concentração de Amônia em Homogenatos de Hipocampo, Córtex e Cerebelo

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as estruturas de hipocampo, córtex e cerebelo, quando determinados os níveis de amônia no cérebro dos ratos controle e tratados com Face®.

##### 4.4.1 Homogenato de hipocampo

O resultado do homogenato de hipocampo (congelado) de cérebro de rato Wistar, tratados durante 15, 30, 45 e 60 dias, não mostrou aumento significativo. Aos 15 dias ( $P = 0,998$ ), 30 dias ( $P = 0,999$ ), 45 dias ( $P = 1,00$ ) e 60 dias ( $P = 0,800$ ) (Figura 27).



**Figura 27.** Determinação de amônia em homogenato de hipocampo aos 15, 30, 45, e 60 dias.

#### 4.4.2 Homogenato de córtex cerebral

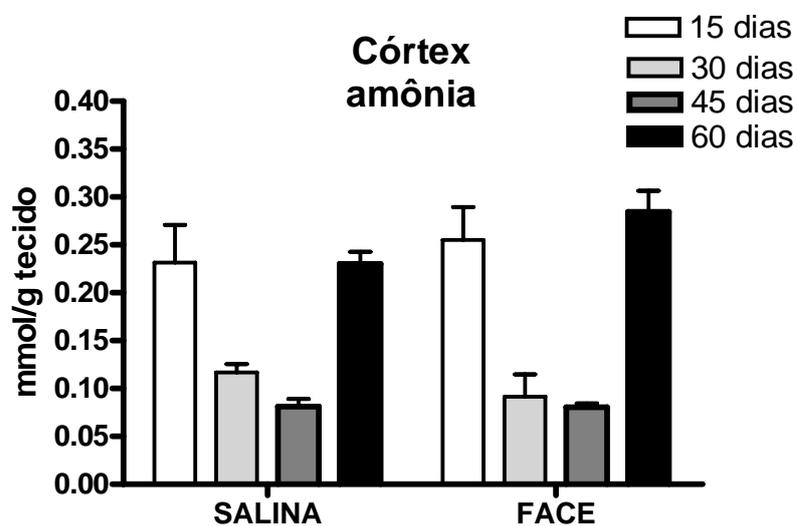
Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a estrutura do córtex, através do homogenato congelado de cérebro de rato tipo Wistar aos 15 dias ( $P = 0,895$ ); 30 dias ( $P = 0,856$ ); e 45 dias ( $P = 1,00$ ) e 60 dias ( $P = 0,123$ ).

Como mostram os dados estatísticos, através de análise utilizadno SPSS 14.0, não houve significância nas alterações (Figura 28).

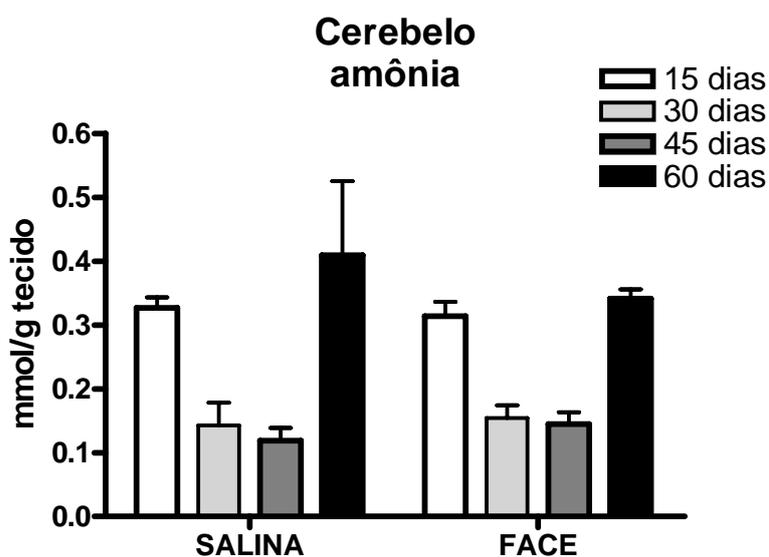
#### 4.4.3 Homogenato de cerebelo

Em homogenato de cerebelo congelado de cérebro de rato, não se evidenciou nenhuma significância nas diferenças obtidas. Os valores de P foram assim distribuídos:

15 dias ( $P = 1,00$ ); 30 dias ( $P = 0,834$ ); 45 dias ( $P = 1,00$ ) e 60 dias ( $P = 0,496$ ), em relação ao controle (Figura 29).



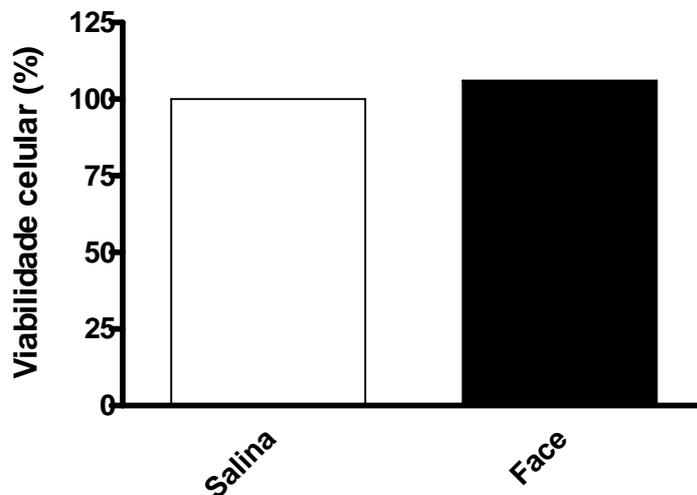
**Figura 28.** Determinação de amônia em homogenato de córtex aos 15, 30, 45, e 60 dias.



**Figura 29.** Determinação de amônia em homogenato de cerebelo aos 15, 30, 45, e 60 dias.

#### 4.5 Análise de Viabilidade Celular (MTT) em Fatias de Hipocampo

O método de MTT foi utilizado para determinar a viabilidade celular. As fatias de hipocampo dos ratos tratados com solução salina e fatias de hipocampo dos ratos tratados com Face® durante 60 dias foram avaliadas. Das médias executadas entre a triplicata das fatias de hipocampo de ratos tratados com solução salina, observou-se o valor 1,728 de absorbância, sendo este valor tomado como referência (100%). O mesmo foi executado para as fatias tratadas com Face®, resultando sua média final em 1,834 de absorbância. Estes resultados não mostraram nenhuma alteração mensurável em relação à viabilidade em tecido hipocampal.



**Figura 30.** Através do Método MTT, foi determinada a viabilidade celular. As fatias de hipocampo tratadas com salina e Face® durante 60 dias foram analisadas.

#### 4.6 Evolução do Peso dos Animais ao Longo dos Experimentos

O peso dos animais utilizados foi monitorado durante 60 dias de experimento através de balança analítica. Foram realizadas quatro medidas por rato: nos dias 9, 21, 40 e 60 após a administração dos tratamentos. A Figura 31 apresenta as médias da evolução de peso em função do tempo de administração de solução salina e de Face®. Observa-se para ambos os casos um comportamento similar de aumento de peso ao longo dos 60 dias de administração de salina e Face®. Observa-se também que os ratos tratados com Face® apresentaram um ganho de peso, com comportamento análogo aos ratos tratados com solução salina (Figura 31). A média de aumento de peso para os casos estudados foi de 497% para os ratos tratados com solução salina e 485% para os ratos tratados com Face®, respectivamente. Dentro do desvio da média obtido, pode-se afirmar que nos dois casos o aumento de peso foi semelhante.

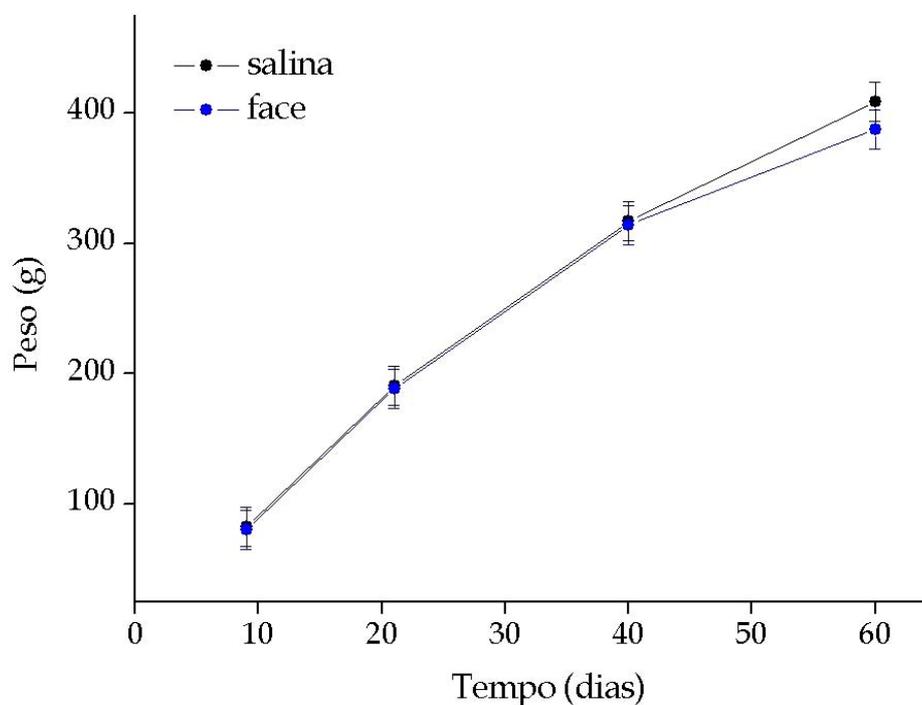


Figura 31. Evolução do peso dos ratos em função do tempo.

---

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito do *Pool* de Aminoácidos Face®

Os resultados desta dissertação evidenciaram a eficácia do *pool* de aminoácidos Face®, através de estudo clínico, duplo-cego, randomizado em 43 pacientes com a SXF (14 placebo e 29 Face®). Através das tabelas de fenótipos, Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7, podemos comparar uma evolução favorável quando do tratamento com Face®.

Sabe-se que os resultantes clínicos da SXF são devidos à redução e/ou ausência da proteína FMRP. Este fator é o principal elemento que pode levar a uma desorganização no circuito neuronal envolvendo problemas com as disfunções cognitivas, emocionais, e comportamentais, além de resultar em algumas características autísticas (REISS, 2003).

Através do estudo clínico realizado neste trabalho, foi demonstrado pela primeira vez o efeito do uso específico do conjunto de aminoácidos Face® em pacientes com a SXF. O Face® promoveu benefícios marcantes do ponto de vista clínico em pacientes com a SXF nos 3 diferentes grupos estudados. A intervenção com o Face®, comparada com outros tratamentos específicos para a SXF (HAGERMAN 1999a e CALVANI 2001), produziu melhorias clínicas importantes em um grande número de indivíduos produzindo um ganho observável nas suas habilidades intelectuais,

emocionais, comportamentais, e de aprendizagem, o que lhes permite melhor interação social, familiar e escolar.

Em relação ao tempo de administração do tratamento com Face®, nossos participantes evoluíram favoravelmente depois de aproximadamente dois meses de tratamento. É digno de nota que o tratamento com esse produto beneficiou não só os indivíduos portadores, como também suas famílias, através de uma melhor superação em relação aos problemas causados pela síndrome, principalmente no que diz respeito ao seu convívio social (escola, relações familiares, e interação com novas pessoas ou grupos). A melhoria dos sintomas clínicos dos participantes afetados e zona gray em seus ambientes social e familiar foram perceptíveis, conforme confirmado pelos professores e outros profissionais que os acompanhavam durante o tratamento (Tabela 7).

A preservação da memória recente, a compreensão, a concentração, o déficit de memória e a melhora na escrita foram fatos importantes, possibilitando aos participantes melhores resultados no aprendizado. Suspeita-se que as propriedades bioquímicas e fisiológicas do Face® poderiam estar ajudando a atividade cerebral através da interação a nível de sinais glutamatérgicos, a exemplo de outros trabalhos que vêm sendo realizados com outros aminoácidos. Um exemplo é o estudo com L-carnitina (LAC), que tem demonstrado melhoras na hiperatividade, aprendizagem e memória, e em funções sensitivas motoras (CALVANI et al., 2001; TORRIOLI 1999). Os pacientes com Mal de Alzheimer, em tratamento com este aminoácido, mostraram benefícios no sentido de diminuir a progressão da enfermidade e, mais especificamente, sobre o componente de atenção e da função cognitiva (THAL et al., 1996; SANO 1992).

## 5.2 Estudos Clínicos – Testes Psicométricos

Este é um estudo piloto que avaliou 10 indivíduos com SXF antes e após tratamento com Face® através de três instrumentos: Escala de Traços Autistas (Teste ATA), Escala de Comportamento Adaptativo Vineland, e o Mini-Exame do Estado Mental (MMSE). O estudo mostrou que todos os sujeitos que participaram desta avaliação evoluíram favoravelmente após três frascos de Face® (Tabela 8).

Frente às alterações cognitivas que causam problemas intelectuais, variando desde lentidão na aprendizagem até retardo mental mais severo, foi necessário montar um protocolo que as englobasse. O modelo de avaliação necessária para comparação com base quantitativa e qualitativa entre o período pré e pós-tratamento foi baseado em revisão da literatura, que sugere uma bateria composta de: (1) Avaliação cognitiva e (2) Avaliação comportamental.

Atualmente não existe tratamento curativo para a SXF e sim um manejo terapêutico dos indivíduos clinicamente afetados. Os manejos consistem nos tratamentos: farmacológico, principalmente nos problemas comportamentais que afetam a interação social, e intervenção educativa individualizada, dirigida para melhorar a capacidade de aprendizagem (REISS e DANT, 2003).

Quando foram aplicados os testes psicométricos, não foi utilizado um grupo controle (grupo sem tratamento). Devido a este desenho, somente se pode avaliar a variância individual dos 10 afetados, mas não se pode estimar os efeitos do desenvolvimento do grupo não tratado. Nesta situação em particular, não

consideramos nosso estudo comprometido, já que o tratamento e as aplicações dos testes foram realizados em um pequeno espaço de tempo (aproximadamente 3 meses), e indivíduos com a SXF não tratados não apresentariam melhoras espontaneamente.

Tratando-se de indivíduos autistas, a literatura reporta poucos resultados descrevendo melhoras terapêuticas alcançadas. Quando da análise de aplicação do teste ATA na população estudada, observaram-se melhorias inequívocas nos seguintes sinais: interação social, melhoria da atenção, controle esfinteriano e atenção ao perigo. Além desses sinais, observou-se maior responsabilidade dos indivíduos, que passaram também a ter mais iniciativa (Tabela 8).

A multiplicidade dos testes aqui utilizada visou dar consistência aos trabalhos e resultados obtidos por outros autores em relação à SXF (REISS e DANT, 2003).

### 5.3 Sistema Glutamatérgico

Os resultados clínicos deste estudo e dados reportados na literatura com animais onde foi suprimida a expressão da proteína FMRP (MACBRIDE, 2005) levaram a uma hipótese sugerindo que este *pool* de aminoácidos atue como um candidato em potencial nas modificações do sistema glutamatérgico, devido à alteração ocorrida na atividade dos seus transportadores.

Na indisponibilidade de camundongos que não expressam a proteína FMRP (*fmr1*), e nem de *Drosófila* *dmfr1*, utilizou-se ratos normais tratados com Face®, visando determinar o perfil da sinalização glutamatérgica.

#### 5.3.1 Captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato no hipocampo

Em relação ao estudo de captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato, os resultados mostraram alteração significativa na captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato por fatias de hipocampo de

ratos com 30 dias de tratamento, em relação aos ratos controle: diminuição da captação total de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato.

Em relação à diminuição da captação total L-[<sup>3</sup>H]-glutamato no experimento em fatias de hipocampo, aos 30 dias, há indícios de que esta alteração na redução da atividade dos transportadores poderia aumentar a concentração de glutamato extracelular, alterando a atividade glutamatérgica nos animais tratados com Face®.

Os transportadores de alta afinidade (dependentes de sódio) presentes nos astrócitos são apontados como os responsáveis pela retirada do glutamato do espaço extracelular (TAKAHASHI et al., 1997). Sua degradação na fenda sináptica não é eficiente, como ocorre para outros neurotransmissores. A falha do transportador de glutamato dependente de sódio induz a elevação dos níveis de glutamato extracelular, aumentando a estimulação dos receptores de glutamato, e levando à excitotoxicidade, fator este comum a vários distúrbios neurológicos (OBRENOVITCH e URENJAK, 1997).

Em concordância com a literatura, o aumento de glutamato na fenda sináptica, por um determinado período poderia ser de importância para os pacientes com alterações em determinadas vias metabólicas, atuando como um sinalizador celular, como é o caso da SXF.

Muitos são os trabalhos mostrando através de modelos animais (sem a FMRP) tanto *in vitro* como *in vivo*, que ao induzir o aumento do sinal glutamatérgico, em hipocampo, e não em córtex, existirá uma sinalização excitatória nos receptores metabotrópicos mGluR, sinalizando a via da proteína FMRP no dendrito, traduzindo ou inibindo proteínas ligantes. Este estímulo poderá aumentar o sinal sináptico, a LTD (hipocampo), o aprendizado e, finalmente, a memória em indivíduos afetados pela SXF (WEILER et al., 1997).

Esses estudos reforçaram a discussão sobre se a proteína FMRP é ou não sintetizada em resposta à ativação do mGluR pelo glutamato (WEILER et al., 1997). Como a proteína FMRP desempenha um papel importante tanto na expressão como na inibição de outras proteínas nos dendritos, estas ativações serão responsáveis pela formação e pela maturação das sinapses. Além disso, a proteína FMRP, em resposta à

liberação de neurotransmissores, controla a localização e/ou a tradução dos mRNAs associados em locais pós-sinápticos (FENG, 2002).

Estudos neuroanatômicos demonstraram que pacientes com SXF apresentam dendritos com morfologia e número de espinhas anormais (IRWIN et al., 2001). A partir destes achados estão sendo propostas teorias que defendem que a proteína FMRP é produzida *in vivo* nas sinapses em resposta aos receptores de glutamato metabotrópicos, possivelmente dando suporte ao processo de plasticidade sináptica (IRWIN, 2000).

### 5.3.2 Aumento da captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato independente de Na<sup>+</sup> no hipocampo

Em relação ao aumento da captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato independente de Na<sup>+</sup> verificado no presente trabalho, houve um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) aos 30 dias em fatias de hipocampo. Os dados mostram que houve aumento da captação independente de Na<sup>+</sup> devido à ingestão do *pool* de aminoácidos Face®. Esses resultados corroboram trabalhos da literatura que mostram que através do aumento da captação independente de Na<sup>+</sup>, o transportador dependente de Na<sup>+</sup> será inibido, aumentando assim a quantidade de glutamato na fenda sináptica (BUTTERWORTH, 2001; BUTTERWORTH, 2002). Portanto, esta é outra possibilidade que explicaria o aumento do glutamato no espaço extracelular.

O aumento da captação independente de Na<sup>+</sup> também nos conduz aos mecanismos de atuação do sistema  $x_c^-$ . Este é o sistema considerado como o mais abundante transportador celular de nutrientes nos mamíferos. O sistema  $x_c^-$  sempre estará alterado quando existir aumento na dieta protéica. BURDO (2006) mostrou que este sistema está presente principalmente nas áreas de contorno ou limítrofes do cérebro, e também nas regiões periféricas das células endoteliais, ependimais, plexo coróide, leptomeninges, rim e duodeno, mostrando assim sua facilidade de introduzir solutos para dentro da BBB. O sistema  $x_c^-$ , antiporter, importa cistina para dentro do neurônio e células gliais, e exporta glutamato à medida que o sistema independente de Na<sup>+</sup> é estimulado.

Outrossim, é importante lembrar que a entrada de cistina a nível neural e glial para o interior da célula é benéfica, pois manterá ou aumentará as concentrações de

GSH (glutathiona) no cérebro (HOSOYA et al., 2002). Este aumento de GSH irá resultar na maioria das vezes em diferentes mecanismos de ação, promovendo uma redução no dano celular, seja atuando como antioxidante, seja minimizando a ação dos produtos decorrentes da fase isquêmica.

### **5.3.3 Atuação da captação de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato dependente e independente de Na<sup>+</sup> no córtex cerebral**

Em fatias de córtex não se observou diferença estatística significativa. No entanto, houve indícios de que o Face® atuou de forma contrária à do hipocampo: com tendência a uma redução da captação independente de Na<sup>+</sup> nas fatias de córtex em relação ao controle.

LI et al. (2002) demonstraram a diminuição do receptor de glutamato da família AMPA, especificamente o GluR-1, nas sinapses corticais, mas não no hipocampo ou cerebelo de camundongo modelo para X Frágil. Demonstraram também uma diminuição da potencialização de longa duração (LTP) no córtex, mas não no hipocampo. De acordo com seus estudos, o AMPA é reduzido a nível cortical na SXF.

### **5.3.4 Efeito do Face® no hipocampo**

Em relação aos achados obtidos nos indivíduos estudados neste projeto, foi possível constatar que 76% dos portadores da SXF foram beneficiados com a intervenção do *pool* de aminoácidos Face® quando após 60 dias de tratamento. A análise da ativação dos transportadores de glutamato no tecido hipocampal de ratos foi significativa. Estes achados, à luz da observação clínica, estão relacionados às atividades nos processos cognitivos, bem como no aprendizado e memória. Outros ganhos não menos importantes dizem respeito às reações emocionais ( $p < 0,001$ ) e comportamentais ( $p < 0,001$ ).

O sistema glutamatérgico está envolvido em diversos processos no sistema nervoso, incluindo cognição, memória e aprendizado (OTTERSEN e STORM-MATHISEN, 1984); participam do processo de plasticidade neural, epilepsia, na excitotoxicidade neural, estimula indução de sinapses e sua eliminação, e muitas outras

funções. Sabe-se que o hipocampo é uma estrutura chave no cérebro, e especificamente na Síndrome do X frágil. REISS e DANT (2003) estudaram a relação gene-cérebro e suas relações comportamentais através de neuroimagem: Imagem de Ressonância Magnética (MRI). Mostraram também que o hipocampo dos pacientes com a SXF era aumentado em relação ao seu volume (KATES et al., 1997; REISS et al., 1994) quando comparado com grupo controle. As alterações encontradas na SXF em relação ao hipocampo estão associadas às falhas dos episódios de memória e falhas nas associações e na consolidação da linguagem e visão. Observam-se também alterações no que tange ao seu comportamento espaço-temporal (REISS e DANT, 2003).

Sinais e sintomas avaliados em nossos experimentos, tais como memória, cognição, aspectos emocionais e comportamentais, foram visivelmente incrementados nestes pacientes.

### 5.3.5 *Efeito da amônia nas estruturas hipocampo, córtex cerebral e cerebelo*

Os estudos aqui realizados não evidenciaram aumento significativo da amônia nas estruturas de hipocampo, cerebelo e córtex. Além disso, os dados não mostraram toxicidade no hipocampo, no córtex e nem no cerebelo, após administração do *pool* de aminoácidos.

Os resultados não evidenciaram aumento significativo da amônia nas estruturas de hipocampo, cerebelo e córtex.

A quantidade ingerida de aminoácidos nos experimentos com ratos, não pode ser considerada uma grande dose. Desde os 21 dias quando se iniciou o tratamento com os aminoácidos até os 60 dias as doses mantiveram-se iguais durante o período de desenvolvimento do animal. Não houve diferenças significantes em relação ao peso dos ratos.

Este tratamento não causou morte celular, mostrando que o aminoácido Face® não causou danos deletérios às células estudadas. Interessantemente, este fato pode ser mostrado através dos experimentos MTT aos 60 dias (Ver Figura 32), que mostraram um pequeno aumento (6,1%) da viabilidade celular nas fatias de hipocampo.

Como salientado anteriormente, não foi objetivo deste projeto avaliar o mecanismo de ação do Face®, mas sim sua atuação em nível terapêutico. Em resposta aos nossos objetivos, através do estudo clínico e estudo psicométrico em pacientes com a SXF, e estudo experimental com ratos Wistars, pode-se sugerir que o Face® atuou como um sinalizador cerebral, através da modulação do sistema glutamatérgico, sobretudo sobre a atividade dos transportadores glutamatérgicos.

Trabalhos futuros poderão investigar melhor a expressão dos transportadores e também a função e expressão dos receptores, e aprofundar os estudos clínicos.

---

## 6. CONCLUSÕES

### Estudo Pré-Clínico:

1 - O Face® atuou como um possível modulador do sistema glutamatérgico, graças a alteração na ativação dos transportadores de glutamato dependentes de Na<sup>+</sup>, bem como dos independentes de Na<sup>+</sup>, no hipocampo de ratos tratados por 30 dias .

2 - Não se evidenciou toxicidade do Face® nas estruturas cerebrais, hipocampo, cerebelo ou córtex dos animais estudados analisada pelos métodos de redução do MTT e dosagem dos níveis de amônia.

### Estudo Clínico:

Após 60 dias da utilização do *pool* de aminoácidos Face® em indivíduos com a SXF é possível concluir que:

1 - Na amostra de indivíduos tratados é possível afirmar que houve ganhos na memorização, na cognição, no aprendizado, no comportamento e no aspecto emocional principalmente nos afetados e zona gray.

2 - Em se tratando de autismo, obteve-se resposta positiva no aspecto social e comportamental. Este é um fato incomum nos relatos pesquisados.

3 - É importante aprofundar o estudo da composição química, e mecanismos de ação farmacocinéticos e farmacodinâmicos do produto Face®, tendo em vista os bons resultados obtidos.

4 - De forma análoga, e conhecendo mecanismos de outras doenças, por similaridade, novos estudos devem ser implementados para análises de benefícios do emprego do Face®, tais como o Mal de Alzheimer, doença de Parkinson, doenças causadas por estresse oxidativo, e doenças com alteração de atividade glutamatérgica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABI RAMIA, J.A. Aminoácidos. **Muscle In Form**, v. 6, n. 32, 2002. Disponível em: <<http://www.muscleinform.com.br/edicoes/index.htm>>. Acesso em: 30 set. 2006.

ABITBOL, M.; MENINI, C.; DELEZOIDE, A.L.; RHYNER, T.; VEKEMANS, M. e MALLET, J. Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of *FMR-1* expression in the human fetal brain. **Nat. Genet.** v. 4, p. 147-153, 1993.

ADAMS JR, J.D.; KLAIDMAN, L.K.; ODUNZE, I.N., SHEN, H.C., MILLER, C.A. et al. Alzheimer's and Parkinson's disease. Brain levels of glutathione, glutathione disulfide, and vitamin E. **Mol. Chem. Neuropathol.**, Clifton, v.14, n.3, p. 213–226, jun. 1991.

ALDRED, M.A.; FLINT, T.; VOSSEN, R.; WAKEFIELD, K.; FERGUSON-SMITH, M.A.; LUSH, M.; RUBINSZTEIN, D. ; KRUSE, T. ; LOIZEDDA, A. The EUROGEN map of human chromosome X. **Eur. J. Hum. Genet.**, Basel, v.2, n.3, p.248-9, 1994.

AMARIA, R. N.; BILLEISEN, L. L.; HAGERMAN, R. J. Medication use in fragile x syndrome. **Ment. Health Aspects Dev. Disabil.**, Bear Creek, v. 4, n.4, p. 143-147, 2001.

ANDERSON, C.M. ; BRIDGES, R.J.; CHAMBERLIN, R.; SHIMAMOTO, K.; YASUDA-KAMATANI, Y.; SWANSON, R.A. Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal. **J. Neurochem.**, BALTIMORE, V.79, N.6, P. 1207-1216, DEC. 2001.

ANTAR, L.N. et al. Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. **J. Neurosci.**, New York, v. 24, p. 2648–2655, 2004.

ANTONIO, J.; STREET, C. Glutamine: a potentially useful supplement for athletes. **Can. J. Appl. Physiol.**, Champaign, v.24, n.1, p.1-14, Feb. 1999.

ARENA, J.F.; LUBS, H.A. Computerized approach to X-linked mental retardation syndromes. **Am. J. Med. Genet.**, New York, v. 38, n. 2/3, p. 190-199, Feb./Mar. 1991.

ARRIZA, J.L. et al. Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 268, n.21, p. 15329–15332, June, 1993.

ARRIZA, J.L. et al. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 94, n.8, p. 4155–4160, Apr. 1997.

ASPEN BOARD OF DIRECTORS AND THE CLINICAL GUIDELINES TASK FORCE. Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients. **J PEN: J Parenter Enteral Nutr.**, Thorafare, v. 26, n. 1 Suppl., p.1SA-138SA, Jan-Feb. 2002.

AVERY, M. E. et al. Transient tyrosinemia of the newborn dietary and clinical aspects. **Pediatrics**, Springfield, v. 39, n.3, p.378-384, Mar. 1967.

BALLABRIGA ,M.C.J., Escudé RMC, Llaberia ED. Escala d'avaluació dels trests autistes (A.T.A.): validez y fiabilidad de una escala para el examen de las conductas autistas. **Rev Psiquiatria Infanto-Juvenil**; v.4 p.254-263. 1994

BAK, L.K.; SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H.S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 98, n.3, p. 641-653, Aug. 2006.

BANNAI, S. Exchange of cystine and glutamate across the plasma membrane of human fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.261, n.5, p.2256-2263, Feb. 1986.

BANNAI, S. Induction of cystine and glutamate transport activity in human fibroblasts by diethyl maleate and other electrophilic agents. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 259, p. 2435-2440, 1984a.

BANNAI, S. Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 779, n. 3, p. 289–306, Sep. 1984b.

BANNAI, S. et al. Amino acid transport systems. **Nature**, London, v.311, n. 5984, p.308, Sep.1984.

BANNAI, S. et al. Induction of cystine transport activity in human fibroblasts by oxygen. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 264, n. 31, p. 18480–18484, Nov. 1989.

BANNAI, S. et al. Induction of cystine transport activity in isolated rat hepatocytes by sulfobromophthalein and other electrophilic agents. **Hepatology**, Baltimore, v. 6, n.6, p.1361–1368, Nov-Dec. 1986.

BANNAI, S.; KITAMURA, E. Transport interaction of L cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 255, n.6, p. 2372–2376, Mar. 1980.

BANNAI, S.; TATEISHI, N. Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. **J. Membr. Biol.**, New York, v. 89, n.1, p. 1-8, 1986.

BASSIN, D.K. Neonatal requirements for aminoacids. In: CYNOBER, L. A. (Ed.). **Metabolic and therapeutic aspects of aminoacids in clinical nutrition**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. p.471-482.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociência**: desvendando o sistema nervoso. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

BEAR, M.F.; HUBER, K.M.; WARREN, S.T. The mGluR theory of fragile X mental retardation. **Trends Neurosci.**, Cambridge, v. 27, n.7, p. 370–377, July 2004.

BENDER, A.S.; NOREMBERG, M.D. Effects of ammonia on L-glutamate uptake in cultured astrocytes. **Neurochem. Res.**, New York, v. 21, n.5, p. 567–573, May 1996.

BENNETTO, L. et al. Profile of cognitive functioning in women with the fragile X mutation. **Neuropsychology**, Philadelphia, v.15, n.2, p. 290-299, Apr. 2001.

BENNETTO, L.; PENNINGTON, B.F. Neuropsychology. In: HAGERMAN, R. J.; HAGERMAN, P. J. (Ed.). **Fragile X Syndrome**: diagnosis, treatment, and research. 3. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2002. p. 206-248.

BERRY-KRAVIS, E. et al. Effect of CX516, an AMPA-modulating compound, on cognition and behavior in fragile X syndrome: a controlled trial. **J Child Adolesc Psychopharmacol.**; v. 16, n.5, p. 525-40, Oct 2006.

BLISS, T.V.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, Basingstoke, v. 361, n. 6403, p. 31–39, Jan. 1993.

BOADO, R.J. et al. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 96, n. 21, p. 12079-12084, Oct. 1999.

BORGHGRAEF, M. et al. Fragile (X) syndrome: A study of the psychological profile in 23 prepubertal patients. **Clin. Genet.**, Copenhagen, v.32, n. 3, 179–186, Sep. 1987.

BRADFORD, H.F.; WARD, H.K. On glutaminase activity in mammalian synaptosomes. **Brain Res.**, Amsterdam, v.110, n.1, p. 115–125, June 1976.

BRIDGES, R. J. et al. Conformationally defined neurotransmitter analogues. Selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine- 2,4-dicarboxylate diastereomer. **J. Med. Chem.** Easton, v. 34, n. 2, p. 717–725, Feb. 1991a

BRIDGES, R.J. et al. Increased excitotoxic vulnerability of cortical cultures with reduced levels of glutathione. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 192, n. 1, p.199-200, Jan. 1991b.

BROER, S. Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands. **Pflugers Arch.**, Berlin, v. 444, n. 4, p.457-466, July 2002.

BROWN, W. T. et al. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. **JAMA**, v.270, n.13, p.1569-1575, Oct. 1993.

BRUNTON, J.A.; BALL, R.O.; PENCHARZ, P.B. Current total parenteral nutrition solutions for the neonate are inadequate. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, London, v. 3, p. 299-304, 2000.

BULUS, N. et al. Physiologic importance of glutamine. **Metabolism.**, v. 38, n. 8 Suppl 1, p.1-5, Aug. 1989.

BURDO, J.; DARGUSCH, R.; SCHUBERT, D. Cystine/glutamate antiporter system xc- in the brain, kidney, and duodenum. **J. Histochem.Cytochem.**, Baltimore, v.54, n. 5, 549-557, May 2006.

BUTTERWORTH, R.F. Glutamate transporter and receptor function in disorders of ammonia metabolism – mental retardation and developmental disabilities **Res. Rev.**, Washington, v. 7, n. 4, p. 276-279, 2001.

BUTTERWORTH, R.F. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. **Metab. Brain Dis.**, New York, v. 17, n. 4, p. 221-227, 2002.

CALVANI, M., et al. L-Acetylcarnitine treatment on fragile X patients hyperactive behaviour. *Rev. Neurol.*, Paris, v.33, p. S65-70, Oct. 2001.

CAPRIOLI, A.; MARKOWSKA, A.L.; OLTON, D.S. Acetyl-L-Carnitine: chronic treatment improves spatial acquisition in a new environment in age drats. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** v. 50, n. 4, p.232-236, Jul 1995.

CHAN, H. et al. Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. **Neurochem. Int.**, Oxford, v. 37, n. 2/3, p. 243–248, Aug./Sep. 2000.

CHAN, H., BUTTERWORTH, R.F. Evidence for an astrocytic glutamate transporter deficit in hepatic encephalopathy. **Neurochem. Res.**, New York, v. 24, n. 11, p. 1397–1401, Nov. 1999.

CHEN, L. et al. The fragile X mental retardation protein binds and regulates a novel class of mRNAs containing U rich target sequences. **Neuroscience**, St. Louis, v. 120, n. 4, p. 1005–1017, 2003.

CHO, Y.; BANNAI, S. Uptake of glutamate and cysteine in C-6 glioma cells and in cultured astrocytes. **J. Neurochem.**, London, v. 55, n. 6, p. 2091-2097, Dec. 1990.

CHOI, D.W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **J. Neurosci.**, Baltimore, v. 7, n. 2, p. 369-379, Feb. 1987.

CHOI, D.W.; ROTHMAN, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Annu. Rev. Neurosci.**, Palo Alto, v. 13, p.71–182, 1990.

CHRISTENSEN, H.N. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. **Physiol Rev.**, Washington, v. 70, n.1, p. 43-77, Jan. 1990.

- COOPER, A.J. et al. The metabolic fate of <sup>13</sup>N-labeled ammonia in rat brain. **J. Biol. Chem.**, San Francisco, v. 254, n. 12, p. 4982–4992, June 1979.
- COOPER, A.J.L.; PLUM, P. Biochemistry and physiology of brain ammonia. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 67, n. 2, p. 440–519, Apr. 1987.
- CORNISH, K. et al. The emerging fragile X premutation phenotype: evidence from the domain of social cognition. **Brain Cogn.**, Boca Raton, v. 57, n. 1, p. 53-60, Feb. 2005.
- CORNISH, K.; SUDHALTER, V.; TURK, J. Attention and language in fragile X. **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.**, New York, v. 10, p. 11-16, 2004.
- DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.**, Washington, v. 65, n. 1, p. 1–105, Sep. 2001.
- DEVYS, D. et al. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. **Nat. Genet.**, New York, v. 4, p. 335–340, 1993.
- DINGLEDINE, R. et al. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v.51, n. 1, p. 7–61, Mar. 1999.
- DOLL, E.A. Vineland Social Maturity Scale. Manual of directions. Edu Test Bureau. Minn.USA. **J Consult. Psych.** v.4, p.123-132, 1940.
- DRINGEN, R. Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 267, n. 16, p. 4903, Aug. 2000.
- DROGE, W. et al. Modulation of lymphocyte functions and immune responses by cysteine and cysteine derivatives. **Am. J. Med.**, New York, v. 91, p. 140S-144S, Sep. 1991.
- ENGEL, J. J. Mechanisms of neuronal excitation and synchronization. In: ENGEL, J. J. (Ed.). **Seizures and epilepsy**. Philadelphia: F.A. Davis, 1989. p. 41–70.
- ENGELKE, T. et al. Identification and sequence analysis of the *Rhizobium meliloti* DctA gene encoding the C4-dicarboxylate carrier. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v.171, p. 5551–5560, 1989.
- ESCALANTE, J.A. Estudo genético da deficiência mental., **dissertação**, Ph.D Univ. of São Paulo 1971.
- FAIRMAN, W.A. et al. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. **Nature**, London, v. 375, n. 6532, p.599–603, June 1995.
- FARZIN, F. et al. Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X premutation. **J. Dev. Behav. Pediatr.**, Hagerstown, v. 27, n.2 Suppl., p.137-144, Apr. 2006.

FELIPO, V.; BUTTERWORTH, R.F. Neurobiology of ammonia. **Prog. Neurobiol.**, Washington, v. 67, n. 4, p.259-279, July 2002.

FENG, Y. Fragile X mental retardation: misregulation of protein synthesis in the developing brain? **Microsc. Res. Tech.**, New York, v. 57, n.3, p. 145–147, May 2002.

FENG, Y. et al. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. **Mol. Cell**, Cambridge, v.1, n.1, p. 109-118, 1997.

FOLSTEIN, M.; FOLSTEIN, S.; MCHUGH, P. Mini-Mental State. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **J Psych Res**; v. 12 p.189–198. 1975.

FORTE, J.A.E. **Estudo genético da deficiência mental**. 1971. 101f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1971.

FOX, S. Thermal polymerization of amino acids and production of formed micro particles on lava. **Nature**, London, v. 201, p.336-337, Jan. 1964.

FREITAS, J.J.S. Glutamina e sistema nervoso. In: CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. p.131-148.

FRIEDLANDER, R.M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. **N. Engl. J. Med.**, Massachusetts, v. 348, p. 1365–1375, Apr. 2003.

GARTHWAITE, G.; GOODWIN, D.; BATCHELOR, A.M.; LEEMING, K.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide toxicity in CNS white matter: an in vitro study using rat optic nerve. **Neuroscience**. V.109, n. 1, p. 145-155. 2002

GABEL, L.A.; WON, S.; KAWAI, H.; MCKINNEY, M.; TARTAKOFF, A.M.; FALLON, J.R. Visual experience regulates transient expression and dendritic localization of fragile X mental retardation protein. **J Neurosci**. v.24, p. 10579-10583, Nov 2004

GASOL, E. Transportador de aminoácidos heteromérico xCT: Identificación, caracterización funcional y topología. 2004. **Tese (Doutorado)** – Barcelona, 2004.

GASOL, E. et al. Membrane topology of system xc- light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restricted. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 279, n. 30, p. 31228–31236, July 2004.

GARCIA-VALDECASAS, J.C. et al. Subcostal incision versus midline laparotomy in gallstone surgery: a prospective and randomized trial. **Br. J. Surg.**, Chichester, v.75, n.5, p. 473-5, 1988.

GAULL, G.E.; STURMAN, J.A. Development of mammalian sulfur metabolism absence of cystathionase in human fetal tissues. **Pediatr. Res.**, Basel, v.6, n. 6, p.538-547, June 1972.

GONZÁLEZ, N.B.B. **Caracterização química parcial e avaliação nutricional de uma mistura de aminoácidos sintéticos**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

GOULET, O. Parenteral nutrition. In: GRACEY, M.; WALKER SMITH, J. A. (Ed.). **Diarrheal disease**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p. 317-338. (Nestlé Nutrition Workshop, 38).

GROSS, P.M. Morphology and physiology of capillary systems in subregions of the subfornical organ and area postrema. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v.69, n. 7, p.1010-1025, July 1991.

GUERRA, J.; AMAYA-FARFAN, J.A. Accelerated biotransformation of sugar -cane bagasse into high-quality organic fertilizer with potentiated *Lactobacillus acidophilus*. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 4., 1995, Recife.PE: UFPE, 1995. p. 50.

HAGERMAN, R.J. et al. Girls with fragile X syndrome: physical and neurocognitive behaviors of preschool-aged males with fragile X. Status and outcome. **Pediatrics**, Springfield, v. 89, n. 3, p. 395–400, Mar. 1992.

HAGERMAN, R.J.; HAGERMAN, P.J. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome(FXTAS). **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.**, New York, v.10, n. 1, p.25-30, 2004.

HAGERMAN, R.J. Fragile X syndrome. In: **Neurodevelopmental disorders: Diagnosis and treatment**. New York: Oxford Univ.Press,p. 61-132,1999a.

HAGERMAN, R.J. Fragile X syndrome: a model of gene-brain-behavior relationships. **Mol. Genet. Metab.**, Orlando, v.74, n. 1/2, p. 89-97, Sep/Oct. 2001.

HARADA, K.; FOX, S.W. Thermal synthesis of natural amino-acids form a postulated primitive terrestrial atmosphere. **Nature**, London, v. 201, p. 335-7, Jan. 1964.

HAWKINS, R.; DEJOSEPH, M. R. ; HAWKINS, P. A. Regional brain glutamate transport in rats at normal and raised concentrations of circulating glutamate. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 281, n.2, p. 207–214, Aug. 1995.

HAWKINS, R.A.; PETERSON, D.R.; VINA, J.R. The complementary membranes forming the blood–brain barrier. **IUBMB Life**, London, v. 54, n. 3, p. 101–107, Sep. 2002.

HAZELL, A.S.; NORENBURG, M.D. Manganese decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. **Neurochem. Res.**, New York, v. 22, n. 12, p. 1443–1447, Sep. 1997.

HELBOE, L. et al. Distribution and pharmacology of alanine-serine-cysteine transporter 1 (asc-1) in rodent brain. **Eur. J. Neurosci.**, Oxford, v. 18, p. 2227–2238, 2003.

HERMENEGILDO, C.; MONFORT, P.; FELIPO, V. Activation of NMDA receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication. Characterization by in vivo brain microdialysis. **Hepatology**, Heidelberg, v. 31, n. 3, p. 709–715, Mar. 2000.

HERRERA, F. et al. Glutamate induced oxidative stress not mediated by glutamate receptors or cystine transporters: protective effect of melatonin and other antioxidants. **J. Pineal Res.**, New York, v. 31, p. 356-362, 2001.

HINDS, H.L.; ASHLEY, C.T.; SUTCLIFFE, J.S.; NELSON, D.L.; WARREN, S.T.; HOUSMAN, D.E.; SCHALLING, M. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. **Nat Genet.**; v. 3, n. 1, p. 36-43, Jan 1993.

HOFMANN, K. et al. Human neutral amino acid transporter ASCT1: structure of the gene (SLC1a4) and localization to chromosome 2p13-p15. **Genomics**, San Diego, v. 24, n.1, p. 20–26, Nov. 1994.

HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annu. Rev. Neurosci.**, Palo Alto, v.17, p. 31–108, 1994.

HÖSLI, E.; HÖSLI, L. Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, New York, v. 40, n. 4, p. 477–506, Apr. 1993.

HOSOYA, K. et al. Enhancement of L-cystine transport activity and its relation to xCT gene induction at the blood-brain barrier by diethyl maleate treatment. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 302, n. 1, p. 225-231, July 2002.

HUBER, G.; LEVY, J. Development of verteporfin therapy: A collaboration between pharmaceutical companies, device manufacturers and clinical investigators. **Semin. Ophthalmol.**, Orlando, v. 16, n.4, p.213-217, Dec. 2001.

HUBER, K. et al. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 99, n. 11, p.7746–7750, May 2002.

HUBER, K.M.; KAYSER, M.S.; BEAR, M.F. Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. **Science**, Washington, v. 288, n. 5469, p.1254–1257, May 2000.

IRWIN, S.A. et al. Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. **Am. J. Med. Genet.**, New York, v.98, n. 2, p.161-167, Jan. 2001.

IRWIN, S.A. et al. Dendritic spine and dendritic field characteristics of layer V pyramidal neurons in the visual cortex of fragile-X knockout mice. **Am. J. Med. Genet.**, New York, v. 111, n. 2, p.140–146, Aug. 2002.

IRWIN, S.A. et al. Evidence for altered fragile-X mental retardation protein expression in response to behavioral stimulation. **Neurobiol. Learn. Mem.**, San Diego, v. 74, n.1, p. 38 – 93, July 2000.

JEAN, C. et al. Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 131, n.1, p. 91–98, Jan. 2001

JESSY, J.; DEJOSEPH, M.R.; HAWKINS, R, A. Hyperammonaemia depresses glucose consumption throughout the brain. **Biochem J.**, London, v. 277, n. Pt 3, p.693–696, Aug. 1991.

JIN, P. et al. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. **Nat. Neurosci.**, New York, v.7, n.2, p.113–117, Feb. 2004.

JIN, P.; WARREN, S.T. New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors. **Trends Biochem Sci.**, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 152-158, Mar. 2003.

JIN, P.; ALISCH, R.S.; WARREN, S.T. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. **Nat Cell Biol.** v. 6, n.11, p.1048-1053 Atlanta, Nov 2004.

JOHNSTON, G.A.R. Glutamate uptake and its possible role in neurotransmitter inactivation. In: ROBERTS, P. J.; STORM-MATHISEN, J.; JOHNSTON, G. A. R. (Ed.). **Glutamate: transmitter in the central nervous system.** Chichester: Wiley, 1981. p. 77–87.

JORDÃO JR, A.A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.31, p. 434-449, 1998.

KANAI, Y.; HEDIGER, M. A. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. **Nature**, London, v. 360, n. 6403, p. 467–471, Dec. 1992.

KATES, W.R. et al. Reliability and validity of MRI measurement of the amygdala and hippocampus in children with fragile X syndrome. **Psychiatry Res.**, Limerick, v.75, n. 1, p. 31-48, Aug. 1997.

KIMBERLY, M. Reevaluating repugnance: a critical analysis of Leon Kass' writings on genetic reproductive technologies. **Princet J Bioeth.**, Princeton, v.5, P. 8-24, Spring, 2002

KNECHT, K. et al. Decreased glutamate transport (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 229, n.3, p. 201–203, July 1997.

KONEY, E.B. Dermatophilosis in Ghana: effect on the livestock industry. **Trop Anim Health Prod.**, v. 28 n. 2 Suppl. p. 3S-8S; May 1996

KOYAMA, Y. et al. L-lactate inhibits L-cystine/L-glutamate exchange transport and decreases glutathione content in rat cultured astrocytes. **J. Neurosci Res.**, New York, v. 59, n.5, p. 685-691, Mar. 2000.

KOSENKO, E. et al. Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. **J. Neurochem.**, London, v. 63, n. 6, p. 2172–2178, Dec. 1994.

KULIK, A. et al. Neuron-glia signaling via alpha<sub>1</sub> adrenoceptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release in Bergmann glial cells in situ. **J. Neurosci.**, Washington, v. 19, n. 19, p. 8401-8408, Oct. 1999.

KVAMME, E.; TORGNER, I. A.; ROBERG, B. Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. **J. Neurosci. Res.**, New York, v. 66, n. 5, p. 951–958, Dec. 2001.

LAGGERBAUER, B. et al. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 329–338, Feb. 2001.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LI, Z. et al. The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 29, n. 11, p. 2276–2283, June 2001.

LIN, C.L. et al. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. **Neuron**, Cambridge, v. 20, n.3, p.589-602, 1998.

LIETH, E. et al. Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis. **J. Neurochem.**, London, v. 76, n. 6, p.1712–1723, Mar. 2001.

LOESCH, D.Z.; HUGGINS, R.M.; HAGERMAN, R.J. Phenotypic variation and FMRP levels in fragile X. **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.**, New York, v.10, n. 1, p.31-41, 2004.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, San Francisco, v.193, n.1, p. 265-75, 1951.

LOWRY, O.H.; PASSONNEAU, J.V. Kinetic evidence for multiple binding sites on phosphofructokinase. **J. Biol. Chem.**, San Francisco, v. 241, n. 10, p. 2268–2279, May 1966.

LUJAN, R.; ROBERTS, J.D.; SHIGEMOTO, R.; OHISHI, H.; SOMOGYI, P. Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. **J Chem Neuroanat.** v.13, n.4, p. 219-241, Oct 1997.

- MAKOWSKE, M.; CHRISTENSEN, H.N. Hepatic transport system interconverted by protonation from service for neutral to service for anionic amino acids. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.257, n.24, p.14635-14638, Dec. 1982.
- MAKSIMOVIC, I. D. et al. Oxidative damage and metabolic dysfunction in experimental Huntington's disease: selective vulnerability of the striatum and hippocampus. **Vojnosanit. Pregl.**, Belgrad, v. 58, p. 237-242, 2001.
- MONDADORI C. et al. Delayed emergence of effects of memory-enhancing drugs: implications for the dynamics of long-term memory. **Proc Natl Acad Sci U. S. A.** New York, v.91, n.6, p. 2041-2045, Mar. 1994.
- MARCAIDA, G. et al. Acute ammonia toxicity is mediated by NMDA type of glutamate receptors. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 296, n. 1, p. 67-68, Jan. 1992.
- MARCAGGI, P.; COLES, J. A. Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. **Prog. Neurobiol.**, Oxford, v. 64, n. 2, p.157-183, June 2001.
- MAZZOCCO, M.; REISS, A. Normal variation in of the FMR1 gene is not associated with variation in intellectual performance. **Intelligence**, v. 24, n. 2, p. 355- 366, 1997.
- MCBRIDE, S.M. et al. Pharmacological rescue of synaptic plasticity, courtship behavior, and mushroom body defects in a Drosophila model of fragile X syndrome. **Neuron**, v. 45, n.5, p. 753-764, Mar. 2005.
- MEDEIROS, S.H.L. et al. Avaliação da lesão isquêmica normotérmica do fígado: papel da oclusão do ducto biliar principal e da N-acetilcisteína. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 32, p.168-172, 2005.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 52, p. 711-760, 1983.
- MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 130, n. 4 Suppl., p.1007S-1015S, Apr. 2000.
- MICHALAK, A. et al. Evidence for altered central noradrenergic activity in experimental acute liver failure. **Hepatology**, Heidelberg, v. 27, n. 2, p. 362-368, Feb.1998.
- MICHALAK, A. et al. Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. **Hepatology**, Baltimore, v. 24, p. 908-914, 1996.
- MICHALAK, A.; BUTTERWORTH, R.F. Ornithine transcarbamylase deficiency: pathogenesis of the cerebral disorder and new prospects for therapy. **Metab. Brain Dis.**, New York, v.12, n.3, p.171-182, 1997
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 65, p.55-63, 1983.

MUDRICK-DONNON, L.A. et al. Postsynaptic potentials mediated by GABA and dopamine evoked in stellate glial cells of the pituitary pars intermedia. **J. Neurosci.**, Baltimore, v.13, n. 11, p. 4660-4668, Nov. 1993.

NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. **Nat. Rev. Neurosci.**, London, v. 3, n. 9, p. 748-755, Sep. 2002.

NOEL, R.A.; UDALL, J.N. Parenteral nutrition. In: WALKER, W.; WATKINS, J.B. (Ed.). **Nutrition in pediatrics. Basic science and clinical applications.** Hamilton: BC Decker, 1997. p. 734-746.

NORENBERG, M.D.; MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. **Brain Res.**, Amsterdam, v.161, n. 2, p. 303-310, Feb. 1979.

OBERLÉ, I., ROUSSEAU, F., HEITZ, D., et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. **Science** 1991;252:1097-1102

OBRENOVITCH, T.P.; URENJAK, J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. **Progr. Neurobiol.**, New York, v. 51, n. 1, p. 39-87, Jan. 1997.

OBRENOVITCH, T.P.; URENJAK, J. Is high extracellular glutamate the key to excitotoxicity in traumatic brain injury? **J. Neurotrauma**, New York, v. 14, p. 677-698, 1997a.

OHASHI, S. et al. Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 277, n. 40, p. 37804-37810, Oct. 2002.

OHNUMA, N. et al. Isolation of a new metabolite of vitamin D produced in vivo, 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-26,23-lactone. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.204, n.1, p.387-391, Oct. 1980.

OTTERSEN, O.P.; ZHANG, N.; WALBERG, F. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. **Neuroscience**, Oxford, v.46, n.3, p. 519-534, 1992.

OTTERSEN, O.P.; STORM-MATHISEN, J. Neurons containing or accumulating transmitter amino acids. In: BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T.; KUCHAR, M. J. (Ed.). **Handbook of chemical neuroanatomy.** Amsterdam: p. 141-246. 1984

OXENDER, D.L.; CHRISTENSEN, H.N. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 238, p. 3686-3698, 1963.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, New York, v. 54, n. 5, p. 581–618, Apr. 1998.

PAJOR, A. M. Molecular cloning and functional expression of a sodium-dicarboxylate cotransporter from human kidney. **Am. J. Physiol.**, Washington, v. 270, n. 4 Pt 2, p. F642–F648, Apr. 1996.

PALACÍN, M.; KANAI, Y. The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. **Pflugers Arch.**, Berlin, v. 447, p. 490-494, 2004.

PARDRIDGE, W.M. **Introduction to the Blood-Brain Barrier**. Cambridge: The Cambridge University Press, 1998.

PATEL, A.J.; BALAZS, R. Manifestations of metabolic compartmentation during the maturation of the rat brain. **J. Neurochem.**, London, v. 17, n.7, p. 955– 871, July 1970.

PATNEAU, D.K.; MAYER, M.L. Structure–activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. **J. Neurosci.**, v. 10, n. 7, p. 2385-99, 1999

PERÚ. Ministerio de Salud del Perú. **Base de datos de medicamentos**. Disponível em: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/>. Acesso em: 3. mar. 2005.

PETRALIA, R.S; WENTHOLD, R.J. Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. **J. Comp. Neurol.**, New York, v.318, n. 3, p.329-54, Apr. 1992.

PINES, G. et al. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. **Nature**, London, v. 360, n. 6403, p. 464–467, Dec. 1992.

POITRY, S. et al. Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Müller) cells. **J. Neurosci.**, Washington, v. 20, n. 5, p.1809-1821, Mar. 2000.

PRICE, M.T. et al. Uptake of exogenous glutamate and aspartate by circumventricular organs but not other regions of brain. **J. Neurochem.**, London, v. 36, n. 5, p. 1774–1780, May, 1981.

PUNTIS, J.W.L. Parenteral nutrition in infants. In: PREEDY, V.; GRIMBLE, G.; WATSON, R. (Ed.). **Nutrition in the infant. Problems and practical procedures**. London: Greenwich Medical Media, 2001. p.79-91.

RAABE, W. Effects of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> on reflexes in cat spinal cord. **J. Neurophysiol.**, Washington, v. 64, p. 565–574, 1990.

REISBERG, M.A.; ROSEEN, R.D. Advantages and limitations of staphylococcal protein A-Sepharose for isolating soluble immune complexes from goat, rabbit and human sera. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.46, n.2, p.443-452, Nov, 1981.

- REISS, A.L. et al. Contribution of the FMR1 gene mutation to human intellectual dysfunctions. **Nat. Genet.**, New York, v.11, n. 3, p. 331–334, Nov. 1995.
- REISS, A. L. et al. Frequency and stability of the fragile X premutation. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v.3, n.3, p.393-398, Mar. 1994.
- REISS, A.L.; DANT, C.C. The behavioral neurogenetics of fragile X syndrome: Analyzing gene brain- behavior relationships in child developmental psychopathologies. *Dev Psychopathol.*, v. 15, n.4, 927–968, Fall 2003.
- RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, Oxford, v.25, n.4, p. 835-853, 2001.
- ROBINSON, M.B.; WHITTEMORE, E.R.; MARKS, R.L., e KOERNER, J.F. Exposure of hippocampal slices to quisqualate sensitizes synaptic responses to phosphonate-containing analogues of glutamate. **Brain Res.** v. 381, p.187- 200, 1986.
- ROSE, C. Effect of ammonia on astrocytic glutamate uptake/ release mechanisms. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 97, p.11-15, Apr. 2006.
- ROSE, C.R.; DEITMER, J.W. Stimulus-evoked changes of extra and intracellular pH in the leech central nervous system. I. Bicarbonate dependence. **J. Neurophysiol.**, Washington, v.73, n. 1, p.125-131, Jan. 1995.
- ROUSSEAU, F., HEITZ, D., BIANCALANA, V., et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. **N Engl J Med** v. 325, p. 1673-1681, 1991.
- SAGARA, J.; MAKINO, N.; BANNAI, S. Glutathione efflux from cultured astrocytes. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 66, p. 1876-1881, 1996.
- SAPOLSKY, R. M. Stress, Glucocorticoids, and Damage to the Nervous System: The Current State of Confusion Stress. **Stress**, v. 1, p.1-19, Jul 1996
- SATO, H, M. et al. Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)- in the mouse brain. **J. Neurosci.**, Baltimore, v. 22, n. 18, p. 8028-8033, Sep. 2002.
- SCHMIDT, W. et al. Hepatic encephalopathy influences high-affinity uptake of transmitter glutamate and aspartate into the hippocampal formation. **Metab. Brain Dis.**, New York, v. 5, n. 1, p. 19–31, Mar. 1990.
- SCHULTZ, V.; LOWENSTEIN, J.M. The purine nucleotide cycle. Studies of ammonia production and interconversions of adenine and hypoxanthine nucleotides and nucleosides by rat brain in situ. **J. Biol. Chem.**, San Francisco, v. 253, n.6, p.1938-1943, 1978.
- SERRA, J.A. et al. Parkinson's disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients. **J. Neural Transm.**, Wien, v. 108, n. 10, p.1135-1148, 2001.

SHERMAN, S. Epidemiology. In: HAGERMAN, R. J.; HAGERMAN, P. J. (Ed.). **Fragile X syndrome: diagnosis, treatment and research**. 3. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2002. p. 136–168.

SHTANG, S., PERRY, M.D., PERCY, M.E. Search for a *Caenorhabditis elegans* FMR1 homologue: identification of a new putative RNA-binding protein (PRP-1) that hybridizes to the mouse FMR1 double K homology domain. **Am J Med Genet.** v.28, n.84, p.283- 285, May 1999.

SIAN, J. et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. **Ann. Neurol.**, Boston, v. 36, n.3, p. 348–355, Sep. 1994.

SILVA, P. A lógica química da degradação de aminoácidos e do ciclo da uréia. Disponível em: <http://www2.ufp.pt/~pedros/bq/ureia.htm>. Acesso em: 01. agosto 2006.

SKULLERUD, K.S. et al. The cerebral lesions in a patient with generalized glutathione deficiency and pyroglutamic aciduria (5-oxoprolinuria). **Acta Neuropathol.**, Berlin, v. 52, n.3, p. 235-238, 1980.

SMITH, Q.R. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.1016S-1022S Apr 2000.

SNYDER, E. M. et al. Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. **Nat. Neurosci.**, New York, v. 4, p.1079–1085, 2001.

SNYDERMAN R, WEIL AT. Integrative medicine: bringing medicine back to its roots. **Arch Intern Med.**, v.25, p. 395-397. Feb 2002.

SPOOREN, W.P. et al. Novel allosteric antagonists shed light on mglu(5) receptors and CNS disorders. **Trends Pharmacol Sci.**, Amsterdam, v.22, n.7, p. 331-7, Jul. 2001.

STORCK, T. et al. Structure, expression, and functional analysis of a Na<sup>+</sup>-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 89, n. 22, p. 10955–10959, Nov. 1992.

STORM-MATHISEN, J.; ZHANG, N.; OTTERSEN, O.P. Electron microscopic localization of glutamate, glutamine and GABA at putative glutamatergic and GABAergic synapses. **Mol. Neuropharmacol.** v. 2, p. 7–13, 1992.

SUTHERLAND, G. R. Heritable fragile sites on human chromosomes. XII. Population cytogenetics. **Ann. Human Genet.**, London, v. 49, p. 153–61, 1985.

SWANSON, C.J. et al. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. **Nat. Rev. Drug Discov.**, London, v. 4, p. 131–144, 2005.

SZERB, J.C.; BUTTERWORTH, R.F. Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, New York, v. 39, n. 2, p. 135–153, Aug. 1992.

- TAGLIALATELA, M., et al. Felbamate inhibits cloned voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels from human and rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v.3156, n.2/3, p. 373-7, Dec. 1996.
- TAKAGAKI, G. Properties of the uptake and release of glutamic acid by synaptosomes from rat cerebral cortex. *J. Neurochem.*, London, v. 27, n. 6, p.1417–1425, Dec. 1976.
- TAKAHASHI, M. et al. The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J. Exp. Biol.*, London, v. 200, n. Pt 2, p. 401-409, Jan. 1997.
- TAN, S.; SCHUBERT, D.; MAHER, P. Oxytosis: a novel form of programmed cell death. *Curr. Top. Med. Chem.*, Hilversum, v. 1, n. 6, p. 497–506, Dec. 2001.
- TANAKA, K. et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276: 1699–1702, 1997.
- TASSONE, F.; HAGERMAN, R. J.; TAYLOR, A. K.; MILLS, J. B.; HARRIS, S.W.; GANE, L.W.; HAGERMAN, P.J. Clinical involvement and protein expression in individuals with the FMR1 premutation. *Am. J. Med. Genet.*, New York v.91, p.144-152, 2000c.
- TASSONE, F. R. J. et al. FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, New York, v. 84, n. 3, p.250-261, May 1999.
- TOLNER, B. et al. Revised nucleotide sequence of the gltP gene, which encodes the proton glutamate aspartate transport protein of Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v. 174, n. 7, p. 2391–2393, Apr. 1992.
- TODD, P.K.; MACK, K.J.; MALTER, J.S. The fragile X mental retardation protein is required for type-I metabotropic glutamate receptor-dependent translation of PSD-95. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v. 100, n. 24, p. 14374–14378, Nov. 2003.
- TORRIOLI, M.G., et al. Double-blind, placebo-controlled study of L-acetylcarnitine for the treatment of hyperactive behavior in fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, Hoboken, v. 86, n. 4, p.366-8, Dec. 1999.
- TROTTI, D.; DANBOLT, N.C.; VOLTERRA, A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci.*, Amsterdam, v. 19, n.8, p. 328-334, 1998.
- TSACOPOULOS, M.; POITRY-YAMATE, C.L.; POITRY, S. Ammonium and glutamate released by neurons are signals regulating the nutritive function of a glial cell. *J. Neurosci.*, Washington, v. 17, N. 7, p.2383–2390, Apr. 1997.
- TUCHMAN, M. et al. Relative frequency of mutations causing ornithine transcarbamylase deficiency in 78 families. *Hum. Genet.*, Berlin, v. 97, n. 3, p. 274–276, Mar. 1996.

- UEDA, T. Glutamate transport in the synaptic vesicle. In: ROBERTS, P.; STORM-MATHISEN, J.; BRADFORD, H. F. (Ed.). **Excitatory amino acids**. London: Macmillan, 1986. p.173–195.
- UHLIG, S.; WENDEL, A. The physiological consequences of glutathione variations. **Life Sci.**, v. 51, n. 14, p.1083-1094, 1992.
- VENERO, J.L. et al. Changes in neurotransmitter levels associated with the deficiency of some essential amino acids in the diet. **Br. J. Nutr.**, London, v. 68, n.2, p. 409-20, Sep. 1992.
- VERKERK, A.J.M.H. et al. Identification of a gene (FMR1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell**, Cambridge, v.65, n. 5, p.905-914, May 1991.
- VERMA, I.C.; ELANGO, R. Variable expression of clinical features of Martin Bell syndrome in younger patients. **Indian Pediatr.**, New Delhi, v. 31, n. 4, p. 433-438, Apr. 1994.
- VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. 3.ed. New York: John Wiley, 2005.
- VOGELS, B.A. et al. Memantine, a noncompetitive NMDA receptor antagonist improves hyperammonemia-induced encephalopathy and acute hepatic encephalopathy in rats. **Hepatology**, Heidelberg, v. 25, n. 4, p. 820–827, Apr. 1997.
- VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nat. Rev. Neurosci.**, London, v. 6, n. 8, p. 626–640, Aug. 2005.
- WAAGEPETERSEN, H.S. et al. A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. **J. Neurochem.**, London, v. 75, n. 2, p. 471–479, Aug. 2000.
- WALZ, R. et al. Cellular prion protein: implications in seizures and epilepsy. **Cell. Mol. Neurobiol.**, New York, v. 22, n. 3, p. 249–257, June 2002.
- WANG, X. F.; CYNADER M. S. Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. **J. Neurochem.**, London, v. 74, n. 4, p.1434-1442, Apr. 2000.
- WARREN, J.M. The development of paw preference in cats and monkeys. **J.Gen. Psychol.**, Washington, v. 93, p. 229-236, 1958.
- WATANABE, H.; BANNAI, S. Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages. **J. Exp. Med.**, New York, v.165, n.3, p. 628-640, 1987.
- WEILER, I. J. et al. Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.**, Washington, v. 94, n. 10, 5395–5400, May 1997.

WEILER, I.J.; GREENOUGH, W.T. Synaptic synthesis of the Fragile X protein: Possible involvement in synapse maturation and elimination. **Am. J. Med. Genet.**, New York, v. 83, n. 4, p. 248–252, Apr. 1999.

WILLEMSSEN, R. et al. The fragile X syndrome: from molecular genetics to neurobiology. **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.**, New York, v.10, n. 1, p.60-67, 2004.

YUDKOFF, M. et al. Astrocyte leucine metabolism: significance of branched-chain amino acid transamination. **J. Neurochem**, London, v. 66, n. 1, p. 378–385, Jan. 1996.

ZAKHARENKO, S.S. ; ZABLOW, L. ; SIEGELBAUM, S.A. Altered presynaptic vesicle release and cycling during mGluR-dependent LTD. **Neuron**, Cambridge, 2002 Sep 12;35(6): 1099-110.

ZALFA, F. et al. The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. **Cell**, Cambridge, v. 112, n. 3, p. 317–327, Feb. 2003.

ZEEVALK, G.D. et al. Excitotoxicity and oxidative stress during inhibition of energy metabolism. **Dev. Neurosci.**, Basel, v. 20, n.4/5, p. 444–453, 1998.

ZWINGMANN, C. et al. Reduced expression of the astrocytic glycine transporter(Glyt-1) in acute liver failure. **Metab. Brain Dis.**, New York, 2002 Dec;17(4):263-73.

## ANEXO 1 - Tabela de Fenótipos para SXF (Questionário)

FICHA PARA AVALIAÇÃO DE PACIENTES ANTES E APÓS FACE			
Data:			
Nome:		Idade:	
Repetições de CGG:			
Fase Inicial – FASE 1 ( )		FASE 2 – Após a ingestão de 2 frascos ( )	
		FASE 1	FASE 2
		Data:	Data:
SIM/NÃO			
<b>MELHOROU</b>			
1. FÍSICO	1.a. testa proeminente		
	1.b. prognatismo		
	1.c. palato alto		
	1.d. estrabismo		
	1.e. convulsão		
	1.f. orelhas grandes		
	1.g. orelhas em abano		
	1.h. pés chatos		
	1.i. menopausa precoce		
	1.j. macroorquidismo		
	1.l.falta de controle do esfíncter		
	1.m. escoliose		
	1.n. dor no peito		
	1.o. acne		
	1.p. tremor		
1.q. pressão alta			
1.r. cardíaco			
2. RETARDO MENTAL	2.a. leve		
	2.b. moderado		
	2.c. grave		
	2.d. QI		
3. FALA	3.a. não fala		
	3.b. não termina frase		
	3.c. come palavras		
	3.d. troca palavras		
4. AUTISMO	4.a. autismo like		
	4.b. autismo verdadeiro		
5. APRENDIZADO	5.a. dificuldade em matemática		

	5.b. dificuldade na compreensão		
	5.c. concentração		
	5.d. déficit de memória		
	5.e. escreve com dificuldade		
	5.f. não escreve		
	5.g. vontade de estudar		
6. COMPORTAMENTAL	6.a. agressividade		
	6.b. repetitivo		
	6.c. imitativo		
	6.d. hiperativo		
	6.e. maneirismos de mão		
	6.f. falta de contato no olhar		
	6.g. isolamento social		
	6.h. impulsivo		
	6.i. instabilidade do humor		
	6.j. tiques nervosos		
	6.k. auto agressão		
	6.l. agitado		
	6.m. dependente		
	6.n. sem iniciativa		
	6.o. fixação		
	6.p. irritado		
	6.q. cisma		
	6.r. mudança de rotina		
	6.s. nervoso ou temperamental		
	6.t. devagar		
7. EMOCIONAL	7.a. timidez		
	7.b. depressão		
	7.c. stress		
	7.d. não resolve problemas		
	7.e. ansioso		
	7.f. triste		
	7.g. angustia		
	7.h. autoestima baixa		
	7.i. fantasia		
	7.j. medo		
	7.k. pavor noturno		
	7.l. pânico		
8. MOTOR	8.a. não caminha		
	8.b. caminha com dificuldade		

## ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Meu nome é Ingrid Tremel Barbato e estou desenvolvendo a pesquisa “Verificação da Eficácia do aminoácido Face” como suplemento alimentar em pacientes portadores da Síndrome do X Frágil.

O Face® é uma mistura de aminoácidos, produzido pelo Laboratório LBE, em São José-SC, de natureza orgânica, utilizado em outras patologias.

O objetivo desta pesquisa é avaliar se a substância trará ou não algum benefício (melhora da fala, aprendizado, comportamento) para os portadores da síndrome do X-frágil. A pesquisa será realizada de forma que você, seu filho (a) e esta pesquisadora, não saberão se estão tomando ou não a substância (estudo duplo-cego). A pesquisa será realizada através de um questionário com sintomas comuns da Síndrome, com respostas Sim e Não. Durante 60 dias você ou seu filho(a) deverão tomar 2 vezes ao dia 15 gotas do frasco que irão receber( 2 frascos). Ao final deste período os participantes deverão voltar para responder um novo questionário e sabermos quem realmente estava tomando o Face. Não se espera qualquer risco ou desconforto no uso da mistura dos aminoácidos. Esta pesquisa possui interesse científico, portanto a qualquer momento o senhor (a) ou seu filho(a) poderão desistir inclusive sem nenhum motivo.

Por ser voluntário(a) e sem interesse financeiro, o senhor(a) e ou seu filho(a) não terão direito a nenhuma remuneração.

As informações fornecidas serão privadas e sigilosas, e serão utilizadas cientificamente.

Eu: \_\_\_\_\_, representante legal de \_\_\_\_\_ aceito participar como voluntário(a) nesta pesquisa, , e fui suficientemente esclarecido(a) sobre a pesquisa “Verificação da eficácia do aminoácido Face em portadores da Síndrome do X frágil”.

Pesquisadora principal: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável \_\_\_\_\_

Florianópolis, de \_\_\_\_\_ 2004.

Assinatura:

RG:

## ANEXO 3 – Escala de Comportamento Adaptativo Vineland (Vineland Adaptive Behavior Scales)

F. I. C. L. – U.S.P.  
Dep. Psicol. Educacional

### ESCALA DE MATURIDADE SOCIAL DE VINELAND

Tradução revista por Lourenço van Kolck, do original de Doll, E.A., Vineland Maturity Scale Educ. test Bureau, Mineapolis, U.S. A, 1947.

#### Legenda:

C: Comunicação	AG: Auto-governo
L: locomoção	AGE: Auto-auxílio geral
O: Ocupação	AC: Auto-auxílio para comer
S: Socialização	AV: Auto-auxílio para vestir

#### NIVEIS DE IDADE

##### 0-1

#### C... 1. Resmunga, ri

Vocaliza inarticuladamente (além de chorar). Balbucia espontaneamente ou arrulha com animação evidente ou satisfação. Ri espontaneamente estimulado.

#### Age...2. Equilibra a cabeça

Conserva a cabeça erguida voluntariamente (sem auxílio) com tronco ereto por período indefinido (cerca de um minuto).

#### Age...3. Agarra objetos ao seu alcance.

Escolhe ou toma objetos dentro do alcance do seu braço.

#### S... 4. Procura por pessoas familiares.

Pede para ser pego ou mostra desejo de ser carregado pela mãe, pai, ou outra pessoa da família; ou de outro modo mostra claramente reconhecimento.

#### Age...5. Vira sobre si (rola).

Deitado de bruços, vira sobre si de costas ou vice-versa, sem auxílio.

#### Age...6. procura alcançar objetos próximos.

Esforça-se por obter objetos próximos, mas além do alcance.

#### O...7. Distrai-se sozinho (a)

Brinca com chocalhos ou outros objetos simples, ou distrai-se com outras atividades simples, por ¼ de hora ou mais, sem necessidade de atenção.

#### Age...8. Senta-se sem apoio.

Senta-se direto sobre superfície dura, plana, sem apoio, por período indefinido (cerca de um minuto). O equilíbrio pode ser inseguro, mas o corpo não cai da postura espinal reta.

#### Age...9. Ergue-se sozinho (a).

DOLL, E. A., Vineland Social Maturity Scale. Manual of Directions. Educ. Test Bureau, Minn., U.S.A. pags. 12-19 e J Consult Psych., 1940, 4, 123-132.

F.F.C.L. – U.S.P.

2

Dep. Psicol. Educacional

Chega a uma posição ereta segurando em algum objeto (não em uma pessoa), erguendo-se sozinho.

**C...10. "Fala", imita sons.**

Tagarela ou usa conversa inarticulada, que revela aparente tentativa de imitar ou expressar palavras, como algo mais do que o prazer de vocalização.

**AC..11. Bebe em xícara ou copo com auxílio.**

Usa xícara ou copo para beber, auxiliado por alguém para segurar ou ajudar a segurar a xícara ou o copo, e bebe sem derramar muito.

**L...12. Move-se pelo assoalho (engatinha)**

Movimenta-se pelo chão por rastejo ou engatinhando, mas pode ser observado enquanto faz isso.

**Age. 13. Agarra com polegar e o dedo.**

Opõe o polegar e o dedo, agarrando algo, ao contrário do agarrar com o punho ou a palma faz isso.

**S... 14. Solicita atenção pessoal.**

Demonstra desejo de ser abordado ou de ser posto em relação com outra pessoa de qualquer modo, tal como atraindo atenção para si ou para suas próprias atividades, além de mero manuseio ou cuidado das necessidades físicas.

**Age. 15. Fica de pé sozinho (a).**

Fica em pé sem auxílio numa superfície dura lisa, não segurando em objetos ou pessoa, por período indefinido (cerca de um minuto). Equilíbrio pode ser inseguro e pode apresentar-se movimentos dos pés, mas a postura total é mantida ereta.

**AC. 16. Não baba.**

Tem o controle da saliva, de modo que não requer comumente que enxugue a boca ou o queixo, exceto quando come.

**C...17. Obedece instruções simples.**

Vem quando chamado; anda pequenas distâncias até pontos determinados, conforme ordens; aponta para objetos especiais em figuras quando solicitado; faz pantominas de nené, a pedido em geral, coopera a pedidos verbais em atividades muito simples.

**I-II**

**L... 18. Anda pelo aposento sem auxílio.**

Anda pelo quarto, não meramente como um ato mecânico, mas como evidencia de responsabilidade pessoal crescente. Pode exigir observação ou cuidados ocasionais

**O ...19. Rabisca com lápis preto ou de cor.**

F.F.C.L. – U.S.P.

3

Dep. Psicol. Educacional

Distrai-se com crayon ou lápis durante curtos períodos, risca para cima e para baixo. De lado a lado, ou com movimentos circulares sem quebrar a ponta ou rasgar o papel. Faz isso espontaneamente ou a pedido como meio de se ocupar.

**AC... 20. Mastiga os alimentos.**

Mastiga os alimentos sólidos ou semi-sólidos antes de engolir.

**AV. 21. Tira as meias.**

Remove meias soquete, meias compridas ou sapatos sem auxílio, se desapertado, como um ato de se despir e não meramente com um significado de brinquedo.

**O ...22. Muda objetos de lugar.**

Deseja de um recipiente para outro sem derramar, remover, transfere, muda de lugar objetos de uma maneira um pouco intencional; arranja objetos em um padrão ou ordem.

**Age. 23. Transpõe obstáculos simples.**

Abre portas fechadas, sobe cadeiras, usa banco para alcançar algo, usa bastão como instrumento, remove simples impedimentos; usa cesto ou receptáculos para carregar coisas.

**O ...24. Vai buscar ou carregar objetos familiares.**

Desempenha recados a pedido, tais como: levar determinados objetos ou trazê-los de ou para lugares próximos, ou levar e trazer mensagens simples de ou para pessoas próximas.

**AC. 25. Bebe em uma xícara ou em copo sem auxílio,**

Usa xícara ou copo, sem auxílio para beber segurando na asa ou mantendo o copo com uma ou com as duas mãos, sem graves derramamentos.

**Age. 26. Abandona o carrinho de bebê.**

Não anda mais em carrinho de bebê. Caminha ou usa carrinho de andar quando sai.

**S ...27. brinca com outras crianças.**

Brinca independentemente, sem criar antagonismo em companhia de outros aproximadamente de mesma idade ou nível social. A atividade é mais individual do que cooperativa, mas ele se adapta com as outras crianças.

**AC. 28. Come com colher.**

Usa colher à mesa ou na cadeira alta para comer na tigela, xícara ou prato, e faz isto sem ajuda e sem derramar muito.

**L ...29. Anda pela casa ou quintal (ou jardim).**

Anda pela casa ou quintal somente com supervisão ocasional relacionadas ou lugares ou ações e a causa poucos problemas ao fazê-lo.

**AC. 30. Distingue substâncias alimentares.**

F.F.C.L. – U.S.P.

Dep. Psicol. Educacional

Evita comer lixo, e facilmente distingue entre substâncias comuns adequadas ou inadequadas para comer, sem necessidade de selecioná-las. Pode morder objetos duros mas não requer vigilância neste sentido.

**C...31. Usa nome de objetos familiares.**

Usa nomes de vários objetos familiares (não incluindo pessoas) para fins particulares; não só diz o nome desse objetos quando apresentados, mas os pede ou se refere a eles pelo seu nome espontaneamente. Nomes podem ser substituídos por corruptelas de palavras corretas, mas devem ser mais do que sons meramente reconhecíveis.

**L ...32. Sobe escadas sem auxílio.**

Sobe escadas sem ajuda, anda mais do que rasteja, pode se apoiar no corrimão ou muro (não em pessoas) e pode subir colocando os dois pés em cada degrau.

**AC . 33. Desembrulha balas.**

Recebendo balas ou alimentos embrulhados, remove o invólucro em sugestão ou ajuda antes de comer.

**C...34. Fala em frases curtas.**

Usa pequenas sentenças ou frases ou combinações. sujeito-objeto. com vocabulário de 25 palavras ou mais. A linguagem é praticamente útil dentro destes limites, e não mero papagaiamento.

**II-III**

Age, 35. Pede para ir ao banheiro.

Por atos ou palavras expressas a alguém o desejo de ir ao banheiro e raramente tem, durante o dia acidentes". Pode ser auxiliado no banheiro.

**O ...36. Inicia-se seus próprios jogos infantis.**

Ocupa-se com brincadeiras ou atividades semelhantes, de própria iniciativa ou por simples sugestões, tais como desenhar ou pintar com lápis ou crayon, construir com blocos, vestir bonecas, olhar livros ou desenhos. Pode fazê-lo com outros mas não exige supervisão.

**AV. 37. Tira o casaco ou a roupa.**

Tira o próprio casaco, roupa ou sobretudo sem auxílio quando o mesmo esta desabotoado.

**AC. 38. Come com garfo.**

Usa garfo sem derramar muito, para comer alimento sólido que não requer que se corte.

**AC. 39. Bebe água sem auxílio.**

Quando deseja beber é capaz de fazê-lo em circunstâncias comuns em ambientes familiares, sem auxílio obtendo xícaras ou copo se acessível, abrindo e fechando a torneira sem graves riscos ou desordens.

F.F.C.L. – U.S.P.

5

Dep. Psicol. Educacional

**AV. 40. Enxuga as próprias mãos.**

Enxuga as próprias mãos aceitavelmente sem auxílio. As mãos podem ser lavadas para ele.

**Age. 41. Evita perigos simples.**

Abriga-se da chuva, literal ou figuradamente falando. Mostra algumas precauções, a respeito de estranhos é cuidadoso evitando cair de escadas ou lugares altos; evita perigos de objetos tais como fósforos, utensílios afiados, vidros, não saia a rua é precavido com animais.

**AV. 42. Pões o casaco ou a roupa sem auxílio.**

Veste sem ajuda, o próprio casaco, roupa ou sobretudo, mas que não precisem ser abotoados.

**O ...43. Usa tesoura para cortar.**

Usa tesoura sem ponta ao cortar papel ou pano. Assim, o faz seguramente e sem perigo, sem fazer estragos, mas pode ser supervisionado.

**C ...44. Conta suas experiências.**

Da simples relatórios de experiências ou conta histórias (espontaneamente) com seqüência, conteúdo coerente e detalhes relevantes. A forma do vocabulário e da linguagem não são tão importantes.

### III-IV

**L...45. Desce escada com um pé em cada degrau.**

Desce escada um passo por andar sem ajuda.

**S ...46. brinca cooperativamente ao nível de jardim de infância.**

Participa de atividades coordenadas de grupo, tais como brincar de roda, brinquedos de imaginação de grupo, chás ou atividades onde é exigida mútua ou recíproca.

**AV..47. Abotoa casaco ou vestido.**

Veste seu próprio casaco, roupa ou sobretudo e abotoa os mesmos sem ajuda.

**O ...48. Ajuda em pequenos trabalhos caseiros.**

Ajuda em pequenas coisas pela casa, tais como: leva recados guardar coisas, por e tirar a mesa dar comida aos animais, tirar o pó.

**S ...49. Representa para os outros.**

Faz certas proezas de imaginação ou para entretenimento dos outros tais como: recitar, cantar, dançar de uma maneira suficientemente meritória para ser mais do que apenas engraçadinho.

**AV. 50. Lava as mãos sozinho.**

F.F.C.L. – U.S.P.  
Dep. Psicol. Educacional

6

Lava as próprias mãos aceitavelmente, sem auxílio e enxuga as mesmas sem sujar a toalha.

#### IV-V

**Age 51. Cuida-se no banheiro**

Vai ao banheiro só, sem ajuda. Tira e põe as próprias roupas (pode requerer ajuda para abotoar os botões das costas) e desempenha outras operações necessárias. Não há acidentes durante o dia.

**AV. 52. Lava o rosto sozinho.**

Lava seu próprio rosto (exceto orelhas) aceitavelmente e enxuga sem auxílio.

**L ...53. Anda pela vizinhança sozinho.**

Anda pela vizinhança imediata sem supervisão. Pode receber restrições quando a áreas ou limites, e pode ser requerido um conhecimento dos lugares freqüentados ou atividades mas no fundo, está sozinho é livre dentro destes limites.

**AV. 54. Veste-se mas Não amarra.**

Veste-se sozinho exceto os cordões, fitas ou laços. Abotoa de forma comum. As roupas são separadas ou designadas. Recebe ajuda para vestir cachecol, capa ou galochas quando vai sair e roupas especialmente difíceis tais como sobretudo ou macacão.

**O ...55. desenha com lápis ou crayon.**

Desenha com lápis ou crayon e produz formas simples mas reconhecíveis, tais como homem, casa, árvores, animal, paisagem. Utiliza colorações detalhadas ou diferenciais.

**S ...56. Brinca com jogos competitivos.**

Toma parte em jogo competitivo ativo em pequenos grupos de 3 ou 4 da mesma idade. Ex.: pegador, esconde-esconde, pião, pular, corda estátua.

#### V-VI

**O ...57. Usa patins, carrinhos.**

Toma conta de si mesmo, sem supervisão, fora do próprio quintal quando usa patins, trenó, carrinho, velocípede, patinete e brinquedos semelhantes que envolvam algum perigo.

**C ...58. escreve (letra de forma) palavras simples.**

Escreve legivelmente seu primeiro nome ou algumas palavras familiares de três ou quatro letras, sem copiar. Assim o faz de própria iniciativa ou por ditado. Não é essencial escrever certo.

**S ...59. brinca com jogos de mesa simples.**

Joga com os outros, jogos de mesa que requerem rodízio, observando regras, levando em conta as metas e o faz sem discussão (dominó, xadrez, etc.).

F.F.C.L. – U.S.P.

Dep. Psicol. Educacional

7

**AG ...60. Confiam-lhe dinheiro.**

É responsável por pequenas quantidades de dinheiro quando mandado á fazer pagamentos ou compras especificadas. É cuidadosos com a mesma e a usa como solicitado. Habilidade para fazer trocos não é necessária.

**L ...61. Vai a escola sozinho.**

Sai para a escola ou outro lugar familiar fora da vizinhança imediata sozinho. Pode ir em companhia de amigos, mas ninguém é diretamente responsável por ele.

**VI-VII****AC ...62. Usa faca para espalhar.**

Usa faca de mesa em circunstancias comuns para passar manteiga ou geleia no pão.

**C ...63. Usa lápis para escrever.**

Escreve (não letra de forma) legivelmente com lápis uma dúzia ou mais de palavras simples, com grafia correta. Assim o faz de própria iniciativa ou por ditado, mas não copiando.

**AV ...64. Toma banho com auxílio.**

Toma banho supervisionado. Pode ser ajudado ao preparar o banho, ao lavar e secar o cabelo e nos retoques.

**AV ...65. vai para a cama sozinho.**

Desempenha as operações para dormir sem ajuda, vai para o quarto sozinho: despe-se, vai ao banheiro, apaga a luz, etc., de acordo com a rotina familiar. Pode ser acompanhado ou pajeado por questões de sentimentalismo mas realmente não necessita nenhuma ajuda ou companhia.

**VII-VIII****AGE. .66. Vê as horas de 15 em 15 minutos.**

Lê os relógios comuns com aproximação ao quarto de hora mais próximo e realmente usa relógio com finalidade práticas.

**AC.. 67. Usa faca para cortar.**

Usa faca para cortar carne. Pode ser auxiliado ocasionalmente com carne dura ou difícil, tal como carne com ossos, ou de galinha.

**S ...68. Não acredita em papai-noel.**

Rejeita o conceito antropomórfico, mas pode reter o conceito emocional ou simbólico; também rejeita outros conceitos anímicos como fadas, coelhos da páscoa e personificação de objetos ou acontecimentos.

**S ...69. Participa de jogos pré-adolescentes.**

DOLL, E. A. Vineland Social Maturity Scale

F.F.C.L. – U.S.P.

8

Dep. Psicol. Educacional

**MENINOS:** participa de jogo cooperativo em grupo que não requer uma habilidade definida e tem apenas regras brandas, tais como futebol, bola ao cesto ou baseball desorganizado; brinquedos em fila, tais como: seguir o chefe, gato e rato e faz excursões ou passeios de bicicleta ou a pé.

**MENINAS:** Participa de representações dramáticas simbolizando situações domésticas ou sociais, tais como: brincar de casinha, escola, médico, enfermeira, loja.

**OBS:** nota a diferença de sexo em brinquedo nesse estágio e a mudança no brinquedo das meninas para um tipo mais sedentário. Entretanto dar crédito ao item sem considerar o sexo se esta diferenciação não foi ainda bem estabelecida.

**AV ...70. penteia-se e escova os cabelos.**

Escova o cabelo aceitavelmente sem ajuda ou correção quando se veste, sai ou recebe conhecidos.

**VIII-IX**

**O ...71. Usa ferramentas ou utensílios.**

Faz algum uso prático de instrumentos ou utensílios simples tais como martelo, serra, chave de fenda, utensílios domésticos ou de costura, ferramentas para jardim.

**O ...72. Faz trabalhos caseiros de rotina.**

Ajuda efetivamente em trabalhos simples em casa que são de rotina e pelos quais assume alguma responsabilidade contínua, tais como: tirar o pó, arrumar, limpar, lavar pratos, por ou tirar a mesa, fazer a cama.

**C ...73. Lê por sua própria iniciativa.**

Faz uso independente e eficiente do material simples de leitura (mais ou menos no quarto ano), tais como trechos cômicos, títulos de filme, histórias simples, notas, instruções simples, novos itens elementares, para o próprio entretenimento ou informação.

**AV ..74. Toma banho sozinho.**

Toma banho aceitavelmente sem ajuda, despe-se, prepara-se para a banheira ou chuveiro. Lava-se e enxuga-se sem necessidade de retoque, não incluindo lavar e enxugar o cabelo.

**IX-X**

**AC. 75. Cuida-se a mesa.**

Cuida de suas próprias necessidades à mesa; serve-se de acordo com suas necessidades, em geral sabe lidar com coisas como: batatas assadas, carnes difíceis, ovos cozidos, etc.

**AG ..76. Faz pequenas compras.**

Compra artigos úteis escolhendo ou selecionando e é responsável pela segurança dos artigos do dinheiro e do troco correto. O faz independentemente ou pode seguir ordens explícitas.

F.F.C.L. – U.S.P.  
Dep. Psicol. Educacional

9

**L ...77. Anda livremente pela cidade.**

Anda pela cidade sozinho ou com amigos, fora da vizinhança imediata indo a pontos específicos. Pode ser restringido a áreas ou limites, porém estes são mais remotos do que a vizinhança próxima.

**X-XI**

**C ...78. Escreve ocasionalmente cartas curtas.**

De vez em quando escreve cartas resumidas a amigos ou parentes por iniciativa própria ou seguindo algumas sugestões e o faz sem ajuda, com exceção quanto a grafia de palavras não comuns e do fornecimento de endereços desconhecidos. Subscrita envelopes e providencia o seu envio.

**C ...79. Faz chamadas telefônicas.**

Usa telefones locais para fins práticos, isto é procura os números, faz ligações e mantém de modo eficiente conversações úteis, não incluindo chamadas interurbanas, nem telefones automáticos ou de discos, com exceção de onde esse tipo for de uso comum.

**C...80. Faz pequenos trabalhos remunerados.**

Efetua trabalhos ocasionais ou intermitentes, de própria iniciativa, em casa ou vizinhança, pelos quais são –lhe pagas pequenas somas ou as quais merecem pagamento tais como: trabalhos avulsos, cuidar da casa, ajudar a cuidar de crianças, costurar, vender revistas, carregar jornais.

**O ...81. Responde a anúncios; faz compras pelo correio.**

Responde à revistas, rádio ou outra propaganda enviando cupons, pedindo amostras, solicitando literatura, fazendo compras por catálogos.

**XI-XII**

**O ...82. Realiza trabalhos criativos simples.**

Faz coisas úteis, consertos simples ou trabalho produtivo; cozinha, assa, ou costura um pouco de jardinagem; cuida de animais, escreve pequenas histórias ou poemas; faz desenhos ou pinturas simples.

**AG..83. É deixado à sós para cuidar de si ou de outros.**

É às vezes deixado sozinho, ou sua própria responsabilidade, por uma hora ou mais em casa ou no trabalho e é bem sucedido, tratando d suas necessidades imediatas ou das pessoas deixadas à seu cuidado.

**C...84.Gosta de livros, jornais e revistas.**

Lê para informações práticas ou para seu agrado pessoal, histórias ou notícias nos jornais, revistas de histórias, livros de biblioteca, histórias de aventuras ou romances.

**XII-XV****S...85. Entrega-se a jogos difíceis.**

Participa de jogos relativamente complexos e especializados e de esportes como jogos de cartas, beisebol, bola ao cesto, tênis, natação. Compreende as regras e os processos de contagem.

**AV..86. Cuida-se completamente quanto à roupa.**

Requer raramente auxílio quanto aos cuidados pessoais, incluindo lavagem e secagem de cabelos, cuidados das unhas, barbear-se (se tiver barba), escolha certa de roupa de acordo com a ocasião e o tempo. Amarra gravata, fitas e laços.

**AG. ..87. compra os próprios acessórios de vestuário.**

Escolhe e compra com cuidado de ver a utilidade, o preço e o tamanho, pequenos artigos de roupas pessoal, tais como fitas, gravatas, roupas de baixo, sapatos, etc., não incluindo ternos, vestidos, paletós, chapéus. Autoridade e dinheiro ou crédito pode ser fornecido por pessoas mais velhas.

**S ..88. Participa em atividades de grupos de adolescentes.**

É membro ativo de um grupo comunitário, time esportivo, clube, organização social ou literária. Planeja e participa de danças, festas, excursões, esportes ao ar livre, etc., em grupos representando um conjunto social de idades e interesses similares, sem liderança de adulto.

**O ..89. Realiza afazeres rotineiros de sua responsabilidade.**

É responsável para desenhar trabalhos periódicos e variáveis, tais como as tarefas familiares: servir à mesa, ajudar nos trabalhos caseiros, cuidar do jardim, limpar o carro, lavar janelas.

**XV-XVIII****C...90. Comunica-se por carta.**

Escreve cartas comerciais ou sociais que são mais que superficiais e que exigem comunicação de informações sérias, troca de notícias importantes, dando ou conhecendo instruções.

**C ..91. Acompanha acontecimentos correntes.**

Discute notícias gerais, esportes, acontecimentos sensacionais e segue tais coisas com alguma continuidade.

**L ..92. Vai sozinho a lugares próximos (fora dos limites da cidade).**

Sai dos limites da cidade natal e é pessoalmente responsável pelos próprios preparativos ao fazê-lo. É livre, não meramente seguido direções explícitas ou indo de um ponto conhecido a outro e voltando. A distancia percorrida não precisa ser grande, mas as áreas são relativamente não familiares.

**XX-XXV****AG. 102. Emprega providentemente o dinheiro.**

Vive dentro de um rendimento, quita suas obrigações financeiras prontamente, evita desperdício e extravagancias, dentro de um nível de vida prudentemente relacionados com rendimentos, receitas e obrigações. Os gastos são para projetos sérios mais do que para causas frívolas.

**S...103. Assume responsabilidade além do que lhe é necessário.**

Contribui para o sustento de outros; é um bom vizinho, participa da responsabilidade de outros.

**S...104. Contribui para o bem estar social.**

Participa do trabalho social local, ou atividades de natureza altruística e assim faz a iniciativa própria; da ajuda pessoal ou financeira para grupos sociais como igreja, escola e organizações de caridade. É membro ativo de clubes ou grupos sociais semi-profissionais como Associações de pai e Mestres, corporação religiosa, organização ocupacional ou política.

**AG. 105. É previdente quanto ao futuro.**

Mantém independência econômica (tolerância devendo ser feita e emergências foro do próprio controle). Prevê futuras necessidades ou vantagens, pondo de lado parte significativa do rendimento ou recursos em economias, seguro, investimento, etc. Compra a crédito a própria casa, mobília para a casa, faz previsão para o ensino superior dos filhos e outros gastos em investimentos que tenham valor moeda corrente ou que antecipa, o futuro bem estar, em oposição as necessidades imediatas de prazer. Adia satisfações imediatas, por benefícios remotos. O padrão de vida permite um superávit para emergências.

**XXV ou mais****O ...106. realiza trabalho especializado.**

Esta empregado como diarista em ocupações habilidosas (técnicos ou escritório) ou de supervisão, tais como escriturário, artesão. Enfermeira, sitiante, pequeno comerciante, capataz, empregado doméstico. Ou continua os estudos no nível superior.

**O ...107. Emprega-se a recreações benéficas.**

Faz uso aproveitável do tempo vago ou melhora o bem estar mental e físico com leituras, jogos e esportes, hobbies, jardinagem, música, arte, teatro. (Recreações meramente passivas, distrações de baixo nível mental ou ocupações para matar o tempo não devem ser creditadas).

**S ...108. Sistematiza o próprio trabalho.**

Trabalha com iniciativa própria com o sistema capaz de promover um uso mais eficiente de habilidades e oportunidades. Faz seu programa de trabalho de maneira que possa ter despesas imprevistas, e o segue tendo em vista aumentar a quantidade, qualidade e a variedade de trabalho. Usa novos engenhos e métodos para aumentar a eficácia do trabalho.

F.F.C.L. – U.S.P.  
Dep. Psicol. Educacional

13

**S ..109. Inspira confiança.**

É apoio em tempos de aflição ou necessidade, ajuda em tempo de emergência., é consultado em assuntos que requerem liderança ou bom julgamento. Ocupa posição de confiança na sociedade.

**S ...110. promove o progresso cívico.**

Toma parte ativa no melhoramento de movimentos cívicos, comerciais, sociais, industriais, educacionais além da rotina ocupacional imediata. É membro proeminente de grupo operacional, profissional, fraternal, cívico, religioso ou outro que contribua para o bem estar público.

**O ...111. Supervisiona atividades profissionais.**

Dirige negócio próprio acima do nível dos pequenos mercados, ou mantém posição de pequena capacidade executiva mais alta do que de capataz em trabalho de rotina.

**AG.. 112. Faz compras para outros.**

Faz ou aprova grandes compras, fora das próprias necessidades ou das necessidades domésticas dos dependentes como agente para outros, envolvendo responsabilidade e escolha crítica, com arbítrio maduro, quanto a convivência e custo.

**O ..113. Dirige ou oriente trabalhos de outros.**

Mantém posição executiva superior ou de supervisão técnica ou emprega vários trabalhadores por sua própria conta. Planeja e organiza o trabalho dos outros de modo mais amplo.

**O ..114. realiza trabalho técnico ou profissional.**

Produz trabalho altamente habilidoso ou executivos acima do nível de diaristas ou consegue carreira profissional, literária ou artística de alto mérito.

**S .115. Compartilha de responsabilidades na vida da comunidade.**

Participa da direção geral de grandes empreendimentos. Ex.: membro do conselho de diretores de importantes organizações de negócios, sociais, educacionais, institucionais ou cívicos. Ocupa posição importante de confiança pública.

**O . 116. Cria as próprias oportunidades.**

Domina o ambiente e executa seus próprios planos; designa a maneira de fazer certas coisas; contribui com idéias, sai da rotina aceita; tem sucesso ao desenvolver novos descobrimentos, operações melhoradas, direção mais eficiente. Sustenta as atividades criativas ou de organizações durante um período apreciável de anos.

**S ..117. Contribui para o bem estar geral.**

Obteve amplo reconhecimento como alguém que promove progresso público em campos filantrópicos, religiosos, educacionais, culturais, científicos, industriais e patrióticos.

**Escala de Maturidade Social de Vineland****Pontos:****Idade Social (IS):****Quociente Social (QS):**

1			40			79	
2			41			80	
3			42			81	
4			43			82	
5			44			83	
6			45			84	
7			46			85	
8			47			86	
9			48			87	
10			49			88	
11			50			89	
12			51			90	
13			52			91	
14			53			92	
15			54			93	
16			55			94	
17			56			95	
18			57			96	
19			58			97	
20			59			98	
21			60			99	
22			61			100	
23			62			101	
24			63			102	
25			64			103	
26			65			104	
27			66			105	
28			67			106	
29			68			107	
30			69			108	
31			70			109	
32			71			110	
33			72			111	
34			73			112	
35			74			113	
36			75			114	
37			76			115	
38			77			116	
39			78			117	

## ANEXO 4 – Escala de Traços Autísticos (ATA)

### **PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO X-FRÁGIL**

NOME:

NOME DOS PAIS:

ESCOLARIDADE:

DATA DE NASCIMENTO:

DATA DA AVALIAÇÃO:

### **Escala de Avaliação de Traços Autísticos (ATA)**

#### **Scale of autistic traits**

I dificuldade na interação social	
II manipulação do ambiente	
III utilização das pessoas a seu redor	
IV resistência à mudança	
V busca de uma ordem rígida	
VI falta de contato visual/olhar defendido	
VII mímica inexpressiva	
VIII distúrbios de sono	
IX alteração na alimentação	
X dificuldade controle esfínteres	
XI exploração do objetos (apalpar/chupar)	
XII uso inapropriado dos objetos	
XIII falta de atenção	
XIV ausência de interesse pela aprendizagem	
XV falta de iniciativa	
XVI alteração de linguagem e comunicação	
XVII não manifesta habilidades e conhecimentos	
XVIII reações inapropriadas ante a frustração	
XIX não assume responsabilidades	
XX hiper./hipoatividade	
XXI movim. estereotipados e repetitivos	
XXII ignora o perigo	
XXIII aparecimento antes dos 36 meses	

**Obs:**

## ANEXO 5 – Mini-Exame do Estado Mental (Mini-Mental State Examination (MMSE))

### MINIEXAME DO ESTADO MENTAL\*

Paciente: \_\_\_\_\_

Avaliador: \_\_\_\_\_ Data da Avaliação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### ORIENTAÇÃO TEMPORAL (5 pontos)

- *Dia da semana* (1 ponto) \_\_\_\_\_
- *Dia do mês* (1 ponto) \_\_\_\_\_
- *Mês* (1 ponto) \_\_\_\_\_
- *Ano* (1 ponto) \_\_\_\_\_
- *Hora aproximada* (1 ponto) \_\_\_\_\_

#### ORIENTAÇÃO ESPACIAL (5 pontos)

- *Local genérico* (residência, hospital, clínica) (1 ponto) \_\_\_\_\_
- *Local específico* (andar ou setor) (1 ponto) \_\_\_\_\_
- *Bairro ou rua próxima* (1 ponto) \_\_\_\_\_
- *Cidade* (1 ponto) \_\_\_\_\_
- *Estado* (1 ponto) \_\_\_\_\_

#### MEMÓRIA DE FIXAÇÃO (3 pontos)

- *Repetir: Vaso, carro, tijolo.*  
1 ponto para cada palavra repetida na primeira tentativa \_\_\_\_\_   
Repita até as três palavras serem repetidas (máximo de 5 tentativas)

#### ATENÇÃO E CÁLCULO (5 pontos)

- *Subtração: 100-7 sucessivamente, por 5 vezes*  
(1 ponto para cada cálculo correto) \_\_\_\_\_

#### MEMÓRIA DE EVOCAÇÃO (3 pontos)

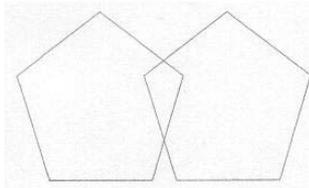
- *Lembrar as 3 palavras repetidas anteriormente (em MEMÓRIA DE FIXAÇÃO)*  
(1 ponto por palavra certa) \_\_\_\_\_

#### LINGUAGEM (8 pontos)

- *Nomear objetos: um relógio e uma caneta* (2 pontos) \_\_\_\_\_
- *Repetir: "nem aqui, nem ali, nem lá"* (1 ponto) \_\_\_\_\_
- *Seguir comando verbal: "pegue este papel com a mão direita, dobre ao meio e coloque no chão"* (3 pontos) \_\_\_\_\_
- *Ler e seguir comando escrito (FRASE): "feche os olhos"* (1 ponto) \_\_\_\_\_
- *Escrever uma frase* (1 ponto) \_\_\_\_\_

#### PRAXIA CONSTRUTIVA (1 ponto)

- *Copiar um desenho* (1 ponto) \_\_\_\_\_



ESCORE: /30

\* Normas sugeridas para o uso do mini-exame do estado mental (MEEM) no Brasil. Brucki SMD, Nitrini R e col. *In press*