

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

***EFEITO DA FENILALANINA E DA ALANINA SOBRE  
AS ATIVIDADES DOS COMPLEXOS DA CADEIA  
RESPIRATÓRIA DE CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS***

por

**Virginia Cielo Rech**

**Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre

2002

*Dedico este trabalho a todas as pessoas que acreditam no AMOR.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Clovis Milton Duval Wannmacher pela orientação em várias esferas do conhecimento, pela paciência, conselhos e carinho nos momentos difíceis que minha família e eu passamos e, é claro, pelas boas risadas que compartilhamos – *poveretto*, terá que aguentar-me por mais 4 anos;

Aos professores do grupo de Erros Inatos do Metabolismo: Ângela, Dutra e em especial ao Moacir pela técnica utilizada e as sugestões dadas durante o trabalho;

À professora Regina por proporcionar meu acesso ao Departamento de Bioquímica;

À grande parceira durante as cadeiras de mestrado: Eleonora. Juntas trocamos idéias, dividimos trabalhos, mas acima de tudo criamos um vínculo de carinho e amizade;

À amiga Luciane, pelo carinho ao ensinar-me as técnicas quando entrei no laboratório, aliás carinho este que sinto até hoje: obrigada.

Aos amigos e colegas: Andréa, Carmem, Elisa, Graça, Adriana, Rui, Carina, Letícia (passarinho), aos colegas do laboratório 34, em especial à Renata e o Marcelo, por tudo que fizeram e ainda fazem;

Aos colegas dos laboratórios 36 (meu corredor de passagem) e 38 (meu segundo local de trabalho) e em especial ao Rafael e ao César pelas técnicas ensinadas;

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao CPG pela formação proporcionada e, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS, RS-Brasil) e Programa de Núcleos de Excelência-Financiadora de Estudos e Projetos (PRONEX II, FINEP-Brasil), pelo suporte financeiro;

Aos funcionários do departamento;

Aos inúmeros ratos sacrificados: estes resultados não existiriam sem eles;

À minha família, por tudo que representam para mim e, em especial a alguém que um dia se chamou Maria e tive o grande privilégio de chamá-la de mãe.

Ao Gilberto, meu amor e grande amigo por ser um "companheiraço": um dos meus alicerces de apoio.

Fevereiro de 2002

# SUMÁRIO

	Pág.
<b>RESUMO</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>5</b>
1.1 – Hiperfenilalaninemia e fenilcetonúria .....	5
1.2 – Mitocôndrias .....	9
1.3 – Alanina .....	11
1.4 – Objetivos .....	12
1.4.1 – Verificar o efeito da fenilalanina sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória e da succinato desidrogenase em córtex cerebral de ratos jovens. ....	12
1.4.2 – Verificar o efeito da alanina sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória e da succinato desidrogenas em córtex cerebral de ratos jovens. ....	13
<b>2 RESULTADOS</b> .....	<b>14</b>
ARTIGO 1: Virginia Cielo Rech, Luciane Rosa Feksa, Carlos S. Dutra-Filho, Angela T. S. Wyse, Moacir Wajner, Clovis M. D. Wannmacher. <i>Inhibition     of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral     cortex</i> . Neurochemical Research (aceito para publicação) .....	15
ARTIGO 2: Virginia C. Rech, Luciane R. Feksa, Carlos S. Dutra-Filho, Angela T. S. Wyse, Moacir Wajner, Clovis M. D. Wannmacher. <i>Inhibition of the     mitochondrial respiratory chain by alanine in rat cerebral cortex</i> . (enviado para publicação no Metabolic Brain Disease) .....	29

<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>42</b>
3.1	– Conclusões .....	42
3.2	– Perspectivas .....	43
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>

## RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo de fenilalanina (Phe) e seus metabólitos nos tecidos dos pacientes afetados. O dano neurológico é a marca da PKU e a Phe é considerada o principal agente neurotóxico nesta doença, cujos mecanismos de neurotoxicidade são pouco conhecidos. A alanina (Ala) é nutricionalmente um aminoácido não essencial. Ela é o principal aminoácido gliconeogênico porque pode originar piruvato e glicose, tendo sido, por este motivo, usada como um suplemento dietético em combinação com o hormônio de crescimento no tratamento de crianças subnutridas afetadas por algumas doenças metabólicas herdadas, para induzir o anabolismo. O principal objetivo do presente trabalho foi medir as atividades dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (CCR) e succinato desidrogenase (SDH) no córtex cerebral de ratos Wistar sujeitos à hiperfenilalaninemia (HPA) quimicamente induzida e à administração crônica de Ala, desde o 6<sup>o</sup> até o 21<sup>o</sup> dia de vida pós-natal. Também investigamos o efeito *in vitro* da Phe e Ala nas atividades da SDH e CCR em córtex cerebral de ratos de 22 dias de idade. Os resultados mostraram uma redução nas atividades da SDH e complexos I + III no córtex cerebral de ratos sujeitos à HPA e também no córtex cerebral de ratos sujeitos à administração de Ala. Também verificamos que ambos: Phe e Ala inibiram *in vitro* a atividade dos complexos I + III por competição com NADH. Considerando a importância da SDH e CCR para a sustentação do suprimento energético para o cérebro, nossos resultados sugerem que o déficit energético possa contribuir para a neurotoxicidade da Phe em PKU. Em relação à Ala, ficou evidenciado que mais investigações serão necessárias antes de considerar a suplementação com Ala como uma terapia adjuvante válida para crianças com estas doenças.

## ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is biochemically characterized by the accumulation of phenylalanine (Phe) and its metabolites in tissues of affected children. Neurological damage is the clinical hallmark of PKU and Phe is considered the main neurotoxic metabolite in this disorder, which mechanisms of neurotoxicity are poorly known. Alanine (Ala) is a nutritionally nonessential amino acid. It is the principal gluconeogenic amino acid because it can originate pyruvate and glucose. It has been suggested that Ala could be used as a dietary supplement in combination with growth hormone in the treatment of undernourished children affected by some inherited metabolic diseases to induce anabolism. The main objective of the present work was to measure the activities of the mitochondrial respiratory chain complexes (RCC) and succinate dehydrogenase (SDH) in brain cortex of Wistar rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia (HPA) and to chronic alanine administration from the 6<sup>th</sup> to the 21<sup>st</sup> day of life. We also investigated the *in vitro* effect of Phe and Ala on SDH and RCC activities in the cerebral cortex of 22-day-old rats. The results showed a reduction of SDH and complex I + III activity in brain cortex of rats subjected to HPA and also in brain cortex of rats subjected to alanine administration. We also verified that both Phe and Ala inhibited the *in vitro* activity of complexes I + III by competition with NADH. Considering the importance of SDH and RCC for the maintenance of energy supply to brain, our results suggest that energy deficit may contribute to the Phe neurotoxicity in PKU. Besides, our results indicate that more investigation would be necessary before considering alanine supplementation as a valid adjuvant therapy to sick children with these disorders.

# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 – Hiperfenilalaninemia e fenilcetonúria

Hiperfenilalaninemia (HPA) é o termo genérico para identificar as concentrações persistentemente elevadas da fenilalanina (Phe), acima da distribuição dos valores plasmáticos considerados normais (Scriver e Kaufman, 2001). As causas genéticas da HPA incluem mutação no gene da enzima hepática fenilalanina hidroxilase (EC 1.14.16.1) (PAH). Muitas mutações no locus do gene da PAH podem causar a fenilcetonúria (PKU) que é um erro inato do metabolismo de aminoácidos. Esta doença tem uma incidência aproximada de 8 para 100.000 nascidos vivos e é transmitida por genes autossômicos recessivos (Nelson e Cox, 2000). Em indivíduos homocigotos, a atividade enzimática pode apresentar-se alterada ( $k_m$  ou  $V_{max}$  modificados) ou estar ausente; os heterocigotos não manifestam a doença, pois um alelo normal determina síntese suficiente da enzima (Marzocco e Torres, 1990). A fenilcetonúria é a causa mais comum de níveis elevados de Phe no sangue. Quando a PAH é geneticamente defeituosa, uma via secundária do metabolismo da Phe, normalmente pouco empregada, passa a ter grande atuação (Figura 1.1). Nesta, a reação inicial mais significativa é a transaminação da Phe para formar fenilpiruvato, tornando-se uma via funcionalmente significativa já que esta reação é induzida pelo substrato, porém, não é completamente operativa em recém-nascidos prematuros ou na primeira fase de HPA. Ambos, fenilalanina e fenilpiruvato, são acumulados no sangue e tecidos e são excretados na urina, razão pela qual esta condição patológica é chamada de fenilcetonúria (Lehninger et al., 1993; Scriver e Kaufman, 2001). Bowden e McArthur (1972) verificaram que na acidemia fenilpirúvica, o ácido fenilpirúvico inibe a piruvato descarboxilase no cérebro, mas não no fígado. Sugeriram que isto explicasse o defeito na



formação da mielina e o retardo mental nesta doença. A maior parte do fenilpiruvato é descarboxilada para produzir fenilacetato ou reduzida para formar fenilactato. O fenilacetato tem um odor tão forte e característico que foi usado para detectar a PKU em crianças.

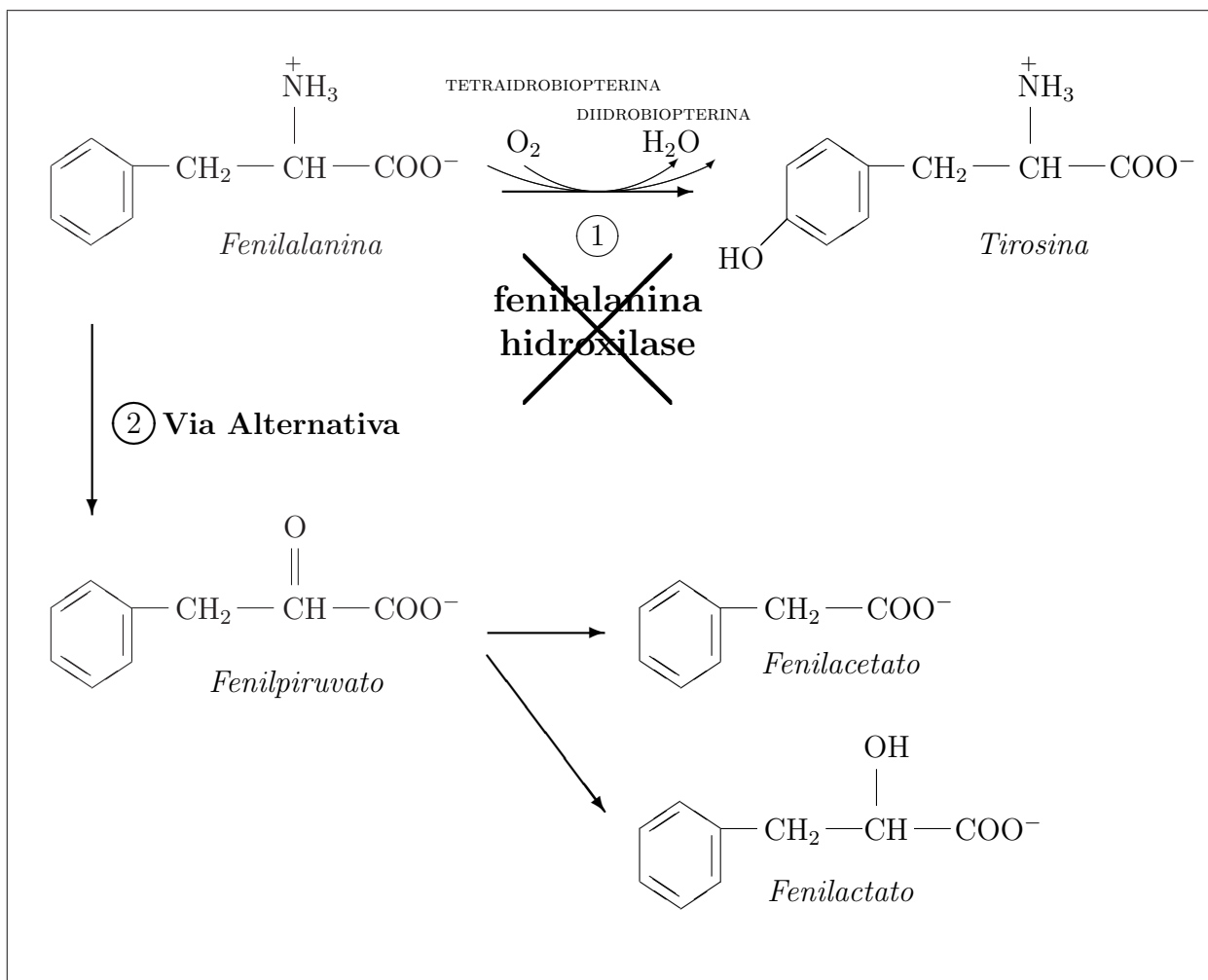


Figura 1.1: Via principal e uma das vias secundárias de degradação da fenilalanina (adaptado de Scriver e Kaufman, 2001).

A enzima PAH está ativa em hepatócitos humanos (e nos rins), mas a Phe é incorporada nas proteínas de todos os tecidos, e a conversão da Phe em vários metabólitos também ocorre em outros tecidos além do fígado. Deste modo, os fluxos entre os órgãos são parte integral da rota para este aminoácido e o transporte da Phe através da mem-

brana plasmática deve ser anterior a sua entrada nas vias intracelulares. A captação da Phe em células de mamíferos é mediada por transportadores que estão acoplados a um gradiente de  $\text{Na}^+$  orientado para o interior dos ápices das membranas dos rins e epitélio intestinal, e por transportadores independentes de  $\text{Na}^+$  em outras membranas plasmáticas. A Phe proveniente do plasma e fluido extracelular entra nas células parenquimatosas através de um transportador independente de  $\text{Na}^+$ , o qual transporta os aminoácidos aromáticos e de cadeia ramificada e sai das células através de um sistema compartilhado pelos aminoácidos de carga neutra. Interações entre os aminoácidos nos transportadores podem perturbar estes fluxos e podem ter um papel na patogênese do fenótipo cerebral em PKU, pois o excesso de Phe pode competir com outros aminoácidos pelo transporte através da barreira hematoencefálica, resultando na depleção de alguns metabólitos muito necessários.

A reação de hidroxilação da Phe é uma etapa obrigatória e limitante na via catabólica que leva à completa oxidação da Phe em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Os produtos cetogênicos (por exemplo: acetoacetato) e gliconeogênico (por exemplo: fumarato) do catabolismo da Phe contribuem para o conjunto (“pool”) de metabólitos de 2 carbonos e glicose no organismo. Nesta visão da dependência parcial do cérebro no suprimento periférico de glicose, a habilidade da Phe em prover substratos gliconeogênicos, neste contexto, tem um papel na função e desenvolvimento cerebral normal. A hidroxilação da Phe tem outro papel no metabolismo dos mamíferos, provendo o organismo com um suprimento endógeno do aminoácido não essencial tirosina. Quando a hidroxilação é deficiente, a tirosina torna-se um aminoácido essencial. O cérebro não contém PAH, mas contém outra enzima, a tirosina hidroxilase, que catalisa a conversão da Phe em tirosina. Talvez a tirosina hidroxilase agindo sobre a Phe, forneça uma fração significativa da tirosina necessária para a síntese protéica; se ela pode fazer o mesmo em PKU, ainda é motivo de dúvida.

A própria Phe provavelmente seja o agente neurotóxico na PKU. Os metabólitos da Phe não são encontrados na doença humana (ou de ratos) em concentrações suficientemente altas para serem relacionados com o distúrbio metabólico e químico no cérebro,

pois suas concentrações, por exemplo no fluido cerebrospinal, não têm nenhuma relação com as usadas para demonstrar os efeitos tóxicos *in vitro* em experimentos animais. Estudos recentes em ratos mutantes para PKU negam a relevância de metabólitos da própria Phe (Scriver e Kaufman, 2001). Quaisquer que sejam seus mecanismos, as conseqüências neurotóxicas da Phe na PKU podem ser agudas e reversíveis ou crônicas e irreversíveis.

Em pacientes PKU clássicos não-tratados, são encontrados níveis sanguíneos de Phe que atingem até 2,4 mM. O valor de Phe livre no plasma de pessoas normais não é significativamente diferente em jovens e adultos. O valor em adultos normais, sob condições fisiológicas, é  $58 \pm 15 \mu\text{M}$ . Os valores correspondentes em crianças (com média de idade de 8 anos) e adolescentes (com média de 16 anos de idade) são  $62 \pm 18 \mu\text{M}$  e  $60 \pm 13 \mu\text{M}$ , respectivamente. Valores em recém-nascidos e crianças mais velhas são semelhantes aos dos adultos. O desenvolvimento cognitivo e as funções neurofisiológicas deficientes em PKU são complexos, mas há um consenso emergente de que a própria Phe, em concentrações elevadas, é uma molécula nociva (Scriver e Kaufman, 2001).

As principais características clínicas desta doença são retardo mental, irritabilidade, movimentos despropositados, reflexos diminuídos dos tendões, convulsões, pigmentação diminuída da pele, eczema e escleroderma, formação deficiente de mielina, microcefalia e vômitos. O déficit de aprendizagem em pacientes PKU, poderia ser devido, ao menos em parte, à produção reduzida de neurotransmissores por um transporte deficiente de tirosina através da barreira hematoencefálica, uma vez que os níveis de tirosina plasmática são baixos em PKU (Hanley et al., 2000). No entanto, os níveis líquidos de tirosina são altos, pois a Phe é transformada em tirosina no cérebro pela triptofano hidrolase (Scriver e Kaufman, 2001). Com um diagnóstico precoce da PKU, o retardo mental pode ser prevenido em grande extensão através de um controle dietético rígido. A dieta precisa suprir as quantidades de Phe suficientes e necessárias para suprir as necessidades de tirosina e de síntese protéica do organismo. O consumo de alimentos ricos em proteínas precisa ser controlado.

Trabalhos anteriormente realizados no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo evidenciaram que a Phe inibe a captação de glicose *in vitro* pelo córtex cere-

bral de ratos (Rodrigues et al., 1990), a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase *in vitro* e *in vivo* (Wyse et al., 1995) e a fosforilação de proteínas do citoesqueleto (Freitas et al., 1995). Além disso, também foi reportada uma redução significativa do metabolismo da glicose no cérebro de pacientes PKU, principalmente na substância branca (Hasselbach e et al., 1996). Juntos, estes dados sugerem que este aminoácido compromete a produção energética cerebral e/ou sua utilização. Déficits na energia cerebral poderiam explicar as anormalidades na mielinização, na densidade e organização celular, arborização dendrítica e número de espinhas sinápticas encontradas no cérebro de pacientes PKU não tratados (Bauman e Kemper, 1982).

## 1.2 – Mitocôndrias

São organelas das células eucarióticas que apresentam uma membrana externa facilmente permeável a pequenas moléculas e íons, e a membrana interna que é impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons, incluindo os prótons ( $\text{H}^+$ ); as únicas espécies que atravessam a membrana interna são aquelas para as quais existem proteínas transportadoras específicas. Na membrana interna estão situados os componentes da cadeia respiratória e o complexo enzimático responsável pela síntese do ATP. A matriz mitocondrial, o espaço envolto pela membrana interna, contém o complexo da desidrogenase pirúvica e as enzimas do ciclo do ácido cítrico, a via da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e as vias da oxidação dos aminoácidos - todas as vias de oxidação dos combustíveis, exceto a glicólise, que ocorre no citosol. Pelo fato da membrana interna ser seletivamente permeável, ela segrega os intermediários e as enzimas das vias metabólicas citosólicas dos processos metabólicos que ocorrem na matriz. Transportadores específicos carregam piruvato, ácidos graxos e aminoácidos e seus derivados  $\alpha$ -cetoácidos para dentro da matriz para terem acesso à maquinaria do ciclo do ácido cítrico. Semelhantemente, o ADP e o fosfato inorgânico (Pi) são transportados especificamente para dentro da matriz à medida que o ATP é transportado para fora. A cadeia respiratória mitocondrial consiste de uma série de transportadores de elétrons, em sua maioria constituídos por complexos multiprotéicos, cujos grupos prostéticos são capazes de aceitar ou doar um

ou dois elétrons. Cada componente da cadeia pode aceitar elétrons de um transportador precedente ou transferi-los para o seguinte numa seqüência específica. Transportadores móveis como a Coenzima Q (CoQ) e o citocromo *c* transportam elétrons entre os complexos (Nelson e Cox, 2000) (Figura 1.2).

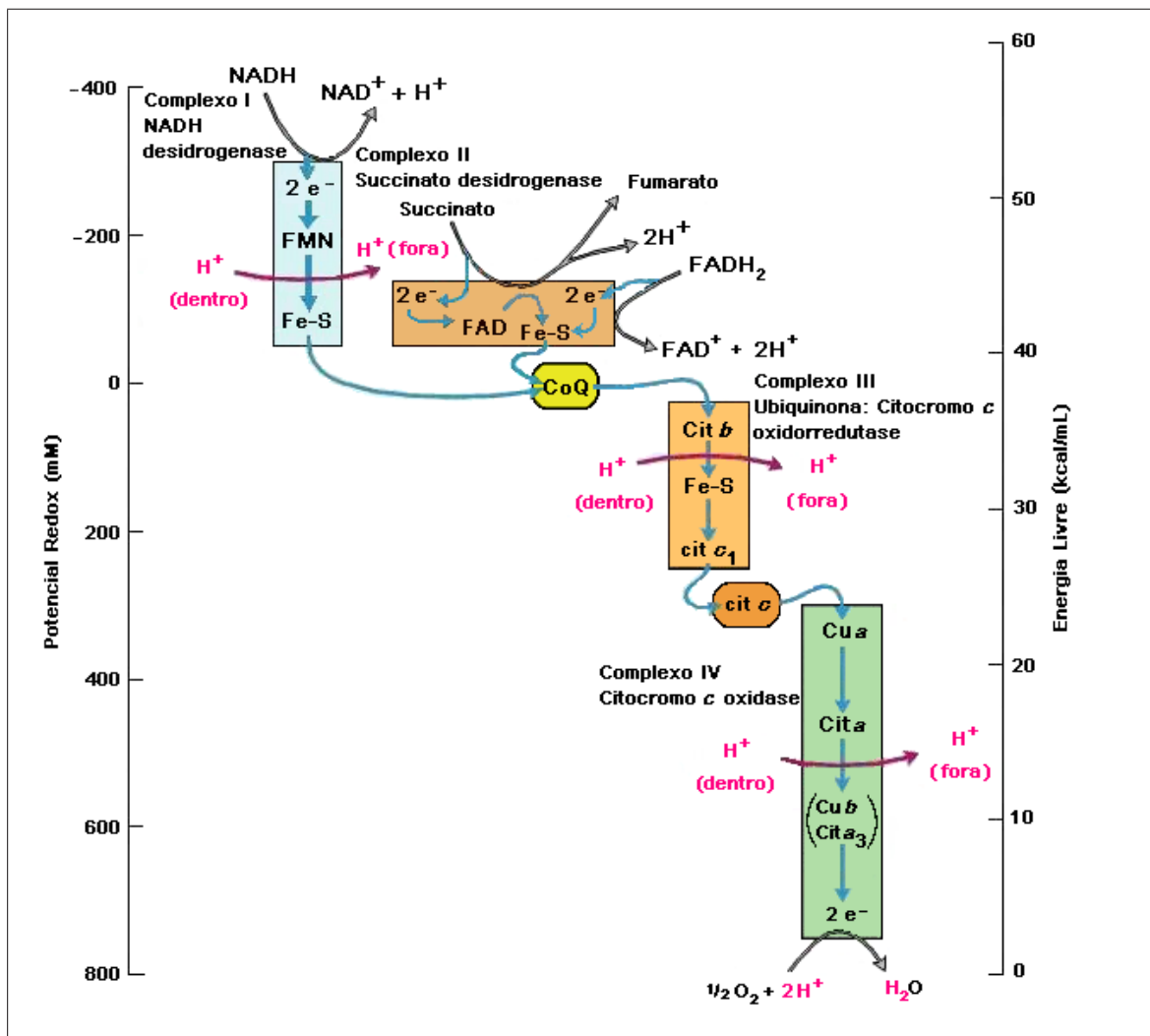


Figura 1.2: Direção do fluxo de elétrons através da cadeia de transporte de elétrons. (Adaptado do *Molecular Cell Biology* (Lodish et al., 2000)).

Portanto, essas organelas são devotadas à produção energética através da fosforilação oxidativa (OXPHOS) (Di Donato, 2000). A OXPHOS gera o máximo da energia celular e requer a ação bem coordenada de vários complexos enzimáticos res-

piratórios localizados numa estrutura especial da membrana mitocondrial interna, a cadeia respiratória mitocondrial (CR). A CR ou cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é composta de quatro complexos (I-IV) e está construída para aceitar elétrons do NADH e FADH<sub>2</sub>, transferindo-os através de uma série de reações de oxidorredução até o oxigênio molecular para produzir água e simultaneamente acoplar esta reação exergônica à translocação de prótons através da membrana interna (Wallace, 1999). O complexo I ou NADH: ubiquinona oxirredutase realiza a oxidação do NADH derivado da oxidação de ácidos graxos, piruvato e aminoácidos; complexo II ou succinato: ubiquinona oxirredutase é um componente do ciclo de Krebs que realiza a oxidação do FADH<sub>2</sub>, derivado do ciclo de Krebs, transferindo os elétrons do succinato à ubiquinona. A succinato desidrogenase (SDH) é uma importante enzima do complexo II; o complexo III ou ubiquinol: ferricitocromo-*c* oxirredutase e o complexo IV ou citocromo *c* oxidase transferem elétrons do citocromo *c* ao oxigênio. A síntese de ATP é a outra reação fundamental da CR mitocondrial. O fluxo de prótons (gradiente eletroquímico de prótons) gerado durante o transporte de elétrons pela cadeia de transporte de elétrons, dirige a formação de ATP a partir de ADP e Pi através da enzima ATP sintase (complexo V) (Babcock e Wikström, 1992)(Wallace, 1999).

### 1.3 – Alanina

A alanina (Ala) é um aminoácido nutricionalmente não essencial sintetizado pela transaminação do piruvato originado da glicose. Por outro lado, a Ala é o principal aminoácido gliconeogênico porque pode originar piruvato e glicose através da via inversa. Este processo ocorre predominantemente no fígado até uma saturação plasmática limitada em aproximadamente 9 mM. A Ala participa do assim chamado ciclo glicose-alanina, no qual a alanina proveniente do tecido muscular é utilizada na gliconeogênese hepática, carregando simultaneamente os grupos amino dos aminoácidos para o fígado, para remoção da amônia através da síntese da uréia (Rodwell, 2000).

O transporte de Ala através da barreira hematoencefálica é mediado principalmente através do sistema de transporte A. A Ala acumula rapidamente nos sinaptosso-

mas cerebrais de ratos pelos sistemas de captação de alta e de baixa afinidade (Erecinska et al., 1994). No cérebro, a Ala é utilizada para a síntese de aspartato, glutamato, glutamina e também de proteínas (Balász, 1965)(Baños et al., 1978). Por outro lado, a Ala pode ser transaminada a piruvato, o qual é transformado em oxaloacetato ou acetil coenzima A na mitocôndria, gerando, desta forma, energia (Rodwell, 2000).

Trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo evidenciaram que a Ala previne a inibição *in vivo* e *in vitro* da atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , -ATPase em membrana plasmática sináptica de córtex de ratos causada por Phe (Wyse et al., 1995; Wyse et al., 1999) e também previne a inibição *in vivo* e *in vitro* da fosforilação de proteínas do citoesqueleto de córtex cerebral de ratos causada pelo mesmo aminoácido (Freitas et al., 1995; Freitas et al., 1997; Carreras et al., 2000). Considerando ainda que a administração de Phe em ratos reduz os níveis circulantes de Ala e sua captação cerebral (de Céspedes et al., 1989), é possível que a suplementação alimentar de Ala possa ser benéfica aos pacientes PKU.

Por ser a Ala um aminoácido não-essencial e não estar associada a nenhuma desordem metabólica, sua suplementação dietética foi considerada segura e usada como um suplemento na dieta em combinação com o hormônio de crescimento no tratamento de crianças subnutridas com doenças metabólicas herdadas (Marsden et al., 1994). Ainda assim alguma precaução deve ser tomada, pois foi descrito que a sobrecarga da terminação nervosa com a Ala pode ser deletéria à função neuronal devido ao aumento da liberação de glutamato.

## 1.4 – Objetivos

### 1.4.1 – Verificar o efeito da fenilalanina sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória e da succinato desidrogenase em córtex cerebral de ratos jovens.

O objetivo principal consistiu na determinação das atividades dos CCR e SDH no córtex cerebral de ratos jovens sujeitos a hiperfenilalaninemia (HPA) induzida quimicamente. Também investigamos os efeitos *in vitro* da Phe nas atividades dos CCR e SDH

no córtex cerebral de ratos não-tratados. Esta investigação teve o intuito de contribuir para a compreensão dos mecanismos responsáveis pela etiopatogenia dos danos cerebrais característicos da PKU.

#### **1.4.2 – Verificar o efeito da alanina sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória e da succinato desidrogenas em córtex cerebral de ratos jovens.**

Considerando que tem sido proposto que a Ala pode ser usada como um suplemento na dieta em alguns estados patológicos associados a dano neurológico, e que nada tem sido feito pra investigar os efeitos da Ala na produção de energia mitocondrial cerebral, o principal objetivo da presente investigação foi determinar o efeito da Ala nas atividades dos complexos da cadeia respiratória (CCR), os principais responsáveis pela energia produzida nas células, e também na SDH, considerada um marcador da função neural. Estas atividades foram medidas no córtex cerebral de ratos jovens sujeitos à administração crônica da Ala e também na presença de Ala no meio de incubação no córtex cerebral de ratos jovens não tratados.



## 2 – RESULTADOS

### OBJETIVO 1

Verificar o efeito da fenilalanina sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória e da succinato desidrogenase em córtex cerebral de ratos jovens.

### RESULTADO 1- Artigo 1

Virginia Cielo Rech, Luciane Rosa Feksa, Carlos Severo Dutra-Filho, Angela Terezinha de Souza. Wyse, Moacir Wajner, Clovis Milton Duval Wannmacher. *Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex*. Neurochemical Research (aceito para publicação).

### OBJETIVO 2

Verificar o efeito da alanina sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória e da succinato desidrogenase em córtex cerebral de ratos jovens.

### RESULTADO 2 - Artigo 2

Virginia C. Rech, Luciane R. Feksa, Carlos S. Dutra-Filho, Angela T. S. Wyse, Moacir Wajner, Clovis M. D. Wannmacher. *Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by alanine in rat cerebral cortex*. (enviado para publicação no Metabolic Brain Disease)





## 3 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

### 3.1 – Conclusões

A fenilcetonúria foi uma das primeiras doenças de erros inatos do metabolismo de aminoácidos a ser estudada, por isso muitos mecanismos já foram descritos na literatura, mas muito estudo precisa ser ainda realizado para compreendermos melhor a patogênese desta doença. O objetivo em estudar os efeitos da Phe sobre as atividades dos CCR *in vitro* e *in vivo* no córtex cerebral de ratos foi o de poder contribuir para a elucidação dos danos cerebrais causados nesta doença. A Ala também foi testada porque em alguns estudos anteriormente realizados este aminoácido reverteu os danos causados pela Phe e por este motivo poderia ser considerado para a realização de ensaios clínicos como um suplemento na terapia de crianças afetadas pela doença.

Nossos resultados evidenciaram uma inibição *in vivo* e *in vitro* dos complexos I + III da cadeia respiratória no cérebro de ratos jovens causado pela Phe. Esta redução foi causada por provável competição com o NADH ao nível do complexo I. A Phe também diminuiu a atividade da SDH no cérebro de ratos sujeitos a HPA quimicamente induzida. É difícil extrapolar estes resultados à PKU humana. Se esta inibição ocorre também no cérebro de pacientes PKU, isso nos induz a especular se a deficiência mitocondrial poderia resultar em morte celular apoptótica, ou no abaixamento do limiar da célula para ser submetida à apoptose. Neste caso, o déficit energético causado pela inibição dos CCR e SDH pode contribuir para os danos cerebrais característicos em PKU.

Também verificamos uma inibição *in vivo* e *in vitro* dos complexos I + III da cadeia respiratória no cérebro de ratos de 22 dias causados pela Ala e redução *in vivo* da atividade da SDH. A inibição dos complexos I + III pode ter sido causada pela

competição entre Ala e NADH, provavelmente ao nível do complexo I. Se esta inibição ocorrer também no cérebro humano, ela nos induz a especular que a deficiência mitocondrial induzida pela Ala poderia resultar numa alteração da função cerebral. Por essa razão, estes resultados indicam que será necessário realizar mais estudos bioquímicos sobre os efeitos desta suplementação de Ala antes que a mesma possa ser considerada uma terapia adjuvante segura para crianças doentes.

### 3.2 – Perspectivas

Nossos resultados abrem a perspectiva de continuarmos a investigação com os seguintes objetivos:

- 1 - Verificar os efeitos da hiperfenilalaninemia (PKU) quimicamente induzida sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo.
- 2 - Verificar os efeitos da  $\alpha$ -metilfenilalanina, fenilalanina e seus metabólitos sobre a atividade *in vitro* dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos jovens.
- 3 - Estudar os mecanismos de ação *in vitro* e *in vivo* da  $\alpha$ -metilfenilalanina, fenilalanina e seus metabólitos sobre a atividade *in vitro* dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos jovens.

## 4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Babcock, G. T. and Wikström, M. (1992). Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature*, 356:301–309.
- Balász, R. (1965). Control of glutamate metabolism. the effect of pyruvate. *J. Neurochem.*, 12:63–67.
- Baños, G., Daniel, P. and Pratt, O. E. (1978). The effect of age upon the entry of some amino acids into de brain and its incorporation into cerebral protein. *Develop. Med. Child Neurol.*, 20:335–346.
- Bauman, M. L. and Kemper, T. L. (1982). Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropathol.*, 58(55-60).
- Bowden, J. A. and McArthur 3rd., C. L. (1972). Possible biochemical model for phenylketonuria. *Nature*, 235:5335.
- Carreras, A. L., Mattos-Dutra, A. G. D., Meirelles, R., Wannmacher, C. M. D. and R., P.-P. (2000). Phenylalanine inhibition of the phosphorylation of cytoeskeletal proteins from cerebral cortex of young rats is prevented by alanine. *Eur. J. Clin. Invest.*, 30(6):536–542.
- de Céspedes, C., Thoene, J. G., Lowler, K. and Christensen, H. N. (1989). Evidence for inhibition of exodus of small neutral amino acids from non–brain tissues in hyperphenylalaninaemic rats. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 12(2):166–180.
- Di Donato, S. (2000). Disorders related to mitochondrial membranes: Pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J. Inher. Metab. Dis.*, 23:247–263.

- Erecinska, M., Nelson, D., Nissim, I., Daikhin, Y. and Yudkoff, M. (1994). Cerebral alanine transport and alanine aminotransferase reaction: Alanine as a source of glutamate. *J. Neurochem.*, 62:1953–1964.
- Freitas, M. S. D., de Mattos, A. G., Camargo, M. M., Wannmacher, C. M. D. and Pessoa-Pureur, R. (1995). Effect of phenylalanine and  $\alpha$ -methylphenylalanine on in vitro incorporation of  $^{32}\text{P}$  into cytoskeletal cerebral proteins. *Neurochem. Int.*, 26:381–385.
- Freitas, M. S. D., de Mattos, A. G., Schroder, N., Wannmacher, C. M. D. and Pessoa-Pureur, R. (1997). Effect of hyperphenylalaninemia chemically induced on in vitro incorporation of  $^{32}\text{P}$  into cytoskeletal proteins from cerebral cortex of developing rats. *Exp. Neurol.*, 143(2):188–195.
- Hanley, W. B., Lee, A. W., Hanley, A. J., Lehotay, D. C., Austin, V. J., Schoonheydt, W. E. and Clark, B. A. P. J. T. (2000). "hypotirosinemia" in phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.*, 69(4):286–294.
- Hasselbach, S. and et al. (1996). Cerebral glucose metabolism is decreased in white matter changes in patients with phenylketonuria. *Pediatr. Res.*, 40:21–24.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. e Cox, M. M. (1993). *Princípios de Bioquímica*. Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, São Paulo, 2a. edição.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, New York, 4th edition. Disponível na URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=mcb.TOC>, último acesso: jan. 2002.
- Marsden, D., Barshop, B. A., Capistrano-Estrada, S., Rice, M., Prodanus, C., Sartoris, D., Wolff, J., Jones, K. L., Spector, S. and Nyhan, W. L. (1994). Anabolic effect of human hormone: Management of inherited disorders of catabolic pathways. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 52:145–154.

- Marzzoco, A. e Torres, B. B. (1990). *Bioquímica Básica*. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.
- Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth, New York, 3rd ed. edition.
- Rodrigues, N. R., Wannmacher, C. M. D., Dutra-Filho, C. S., Pires, R. F., Fagan, P. R. and Wajner, M. (1990). Effect of phenylalanine, p-chlorophenylalanine and a-methylphenylalanine on glucose uptake in vitro by the brain of young rats. *Biochem. Soc. Trans.*, 18:419.
- Rodwell, V. W. (2000). Biosynthesis of the nutritionally nonessential amino acids. In Murray, R., Granner, D., Mayes, P. A. and Rodwell, V. W., editors, *Harpers Biochemistry*. Appleton & Lange, Stamford, 25th edition.
- Scriver, C. R. and Kaufman, S. (2001). Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine hydroxylase deficiency. In Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D., editors, *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, pages 1667–1724. McGraw-Hill, New York, 8th edition.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283:1482–1488.
- Wyse, A. T. S., Bolognesi, G., Brusque, A. M., Wajner, M. and Wannmacher, C. M. D. (1995).  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. *Med. Sci. Res.*, 23:261–261.
- Wyse, A. T. S., Noriler, M. E., Borges, L. F., Floriano, P. J., Silva, C. G., Wajner, M. and Wannmacher, C. M. D. (1999). Alanine prevents the decrease of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in experimental phenylketonuria. *Metab. Brain Dis.*, 14:95–101.