



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EFEITO DA CREATINA E DO PIRUVATO SOBRE ALGUNS
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM RATOS
SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO INTRA-HIPOCAMPAL DE
FENILALANINA**

Tese de Doutorado

SIMONE LUISA BERTI

Orientador:

Prof. Dr. CLÓVIS MILTON DUVAL WANNMACHER

Porto Alegre, 2011.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EFEITO DA CREATINA E DO PIRUVATO SOBRE ALGUNS
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM RATOS
SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO INTRA-HIPOCAMPAL DE
FENILALANINA**

SIMONE LUISA BERTI

Orientador:

Prof. Dr. CLÓVIS MILTON DUVAL WANNMACHER

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2011.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE – DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EFEITO DA CREATINA E DO PIRUVATO SOBRE ALGUNS
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM RATOS
SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO INTRA-HIPOCAMPAL DE
FENILALANINA**

SIMONE LUISA BERTI

Orientador:

Prof. Dr. CLÓVIS MILTON DUVAL WANNMACHER

Porto Alegre, 2011.

Dedico esta tese
aos meus pais, Luiz e Celina,
por cuidarem de mim como
só quem ama cuida e
por demonstrarem, a mim e aos meus irmãos,
como transformar o amor em trabalho,
e o trabalho em oração.

Os poemas são pássaros que chegam
não se sabe de onde e pousam
no livro que lê.

Quando fecha o livro, eles alçam vôo
como de um alçapão.

Eles não têm pouso
nem porto
alimentam-se um instante em cada par de mãos
e partem.

E olhas, então, essas tuas mãos vazias,
no maravilhoso espanto dos saberes
que o alimento deles já estava em ti...

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

A Deus e a todos aqueles que, em Seu Nome, iluminaram e aqueceram minha mente e meu coração para honrar o dom da vida.

“Então Ele disse a todos: ... E que vantagem há em ganhar o mundo inteiro quando isto importa em perder-se a si mesmo?” (Lucas, 9: 23 – 25).

Ao meu orientador:

Prof. Dr. Clóvis Milton Duval Wannmacher. Mestre de muitos mestres, homem sábio e culto, amigo inteligente, divertido e solidário. Capaz de demonstrar a importância das sutilezas e a nobreza do vigor. Agradeço pelos ensinamentos e pelo respeito ao método que enaltece o trabalho. Muito obrigada pelo acolhimento, pela convivência e pelo exemplo profissional e humano.

Aos professores:

Prof. Dr. João José Freitas Sarkis (*in memoriam*) pelo acolhimento, amizade e orientação científica. Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry (*in memoriam*) pelo acolhimento e orientação científica. Pelos seus exemplos de dignidade e saber. Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho e à Prof. Dra. Cristiane Matté pela amizade e orientação científica.

Aos professores, colegas e amigos:

Guilherme Marmontel Nasi, estudante de Medicina (UFRGS) e aluno de iniciação científica ao longo de todo este projeto, nutricionista Michely Lopes Nunes, Mestranda em Medicina (FFCMPA), Bióloga Fernanda Luz de Castro (PUCRS), Cristina Garcia, estudante de Farmácia(UFRGS), que colaboraram intensamente com este projeto. Por sua alegria, inteligência e interesse científico terem transformado a realização deste trabalho em momentos de discussão científica, sensibilidade e descontração.

Aos professores e colegas do Grupo de Pesquisa em Erros Inatos do Metabolismo, principalmente, à mestranda Denise Bertin Rojas e aos doutorandos Vivian Strassburguer Andrade, Tarsila Barros Moraes e Thales Preissler. Pela colaboração no desenvolvimento do projeto, amizade e doçura. Ao mestrando Rodrigo Andrade pelo coleguismo e colaboração.

Aos Profs. Drs. Letícia Pettenuzzo e Diogo Losch de Oliveira pelas valiosas orientações. Aos pós-doutorandos Eleonora Araújo dos Reis e Eduardo Rico pela determinante colaboração e afetuoso acolhimento em suas orientações.

Aos professores, colegas e amigos do grupo das Nucleotidases, em especial a minha então doutoranda Prof. Dra. Carla Denise Bonan, pelo exemplo de dedicação, pelo aprendizado, amizade e coleguismo.

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da UFRGS por tudo de bom que compartilhamos e pela convivência extremamente saudável que tornou todos os meus dias melhores.

Ao meu padrinho e amigo, Dom Gentil Delazeri, ser divinamente humano determinante em minha vida. Ao conselheiro e amigo Dom Paulo Antônio de Conto, pela providencial presença e estímulo.

À minha família: aqueles com quem cantamos “Noite Feliz” e nos despimos como o Menino Jesus...

Pai e Mãe, Luiz e Celina, pela sua capacidade de amar. Todo amor que tenho me foi dado. Pai, obrigada por segurar minha mão, transmitir e desejar coragem. Pequenos gestos, grandes ensinamentos! Mãe, só tamanha doçura me faria tão forte!

Aos meus irmãos Ana Rita, Paulo Roberto, Sandra, Márcia e Cassiane. A música mais bonita que cantamos juntos dizia: **“Noosso amoor... É um tipo especial de amoor... É um tipo de amoor... que não irá morrer jamais... Pois nasceu para viver... É um sonho que eu vou seguir... E que se tornou real... Nós vamos casar, Nós vamos casar... E assim perpetuar o nosso amoor...”**

Muito obrigada pelo amor de que eu tanto precisei, pelo exemplo, pelo interesse, por me fazerem sentir especial, por terem levado adiante seus sonhos e me incentivarem a buscar os meus. Obrigada, minha família, meus irmãos e meus cunhados, pelas suas famílias e pelas crianças que trazem felicidade e renovam a nossa família: Diego, Carlos Roberto, Maria Júlia e Ana Paula.

À CAPES:

Pela bolsa concedida e às agências financiadoras que possibilitaram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

PARTE I

I. Resumo	2
II. Abstract	3
III. Lista de Abreviaturas	4
IV. Lista de Figuras	6
V. Introdução	9
V.1. Erros Inatos do Metabolismo	9
V.2. Fenilcetonúria e Hiperfenilalaninemia	10
V.2.1. Histórico	10
V.2.2. Conceito e Frequência	11
V.2.3. Metabolismo da L-Fenilalanina e Fenilalanina Hidroxilase	13
V.2.4. Genética da PKU	15
V.2.5. Diagnóstico	16
V.2.6. Aspectos Clínicos	17
V.2.7. Aspectos Fisiológicos	17
V.2.8. Tratamento	18
V.3. Memória e Aprendizagem	19
V.3.1. Plasticidade Sináptica e Memória	21

V.3.2. Extinção ou Inibição de Memórias_____	22
V.3.3. O Papel do Hipocampo na Formação e na Extinção da Memória_____	23
V.4. Tarefa Comportamental_____	24
V.4.1. Campo Aberto (Open Field Task)_____	24
V.5. Estresse Oxidativo_____	25
V.5.1. Radicais Livres_____	25
V.5.2. Defesas Antioxidantes_____	26
V.5.3. Estresse Oxidativo_____	28
V.5.4. Dano Oxidativo_____	28
V.6. Objetivos_____	31
V.6.1. Objetivo Geral_____	31
V.6.2. Objetivos Específicos_____	31
PARTE II _____	33
Piruvato e creatina previnem alterações do estresse oxidativo e do comportamento causadas pela administração de fenilalanina no hipocampo de ratos _____	34
PARTE III _____	46
Discussão_____	47
1. A administração de fenilalanina inibiu a aprendizagem e	

memorização dos animais quanto às tarefas de habituação no campo aberto. A pré - administração de piruvato ou creatina preveniu os efeitos da fenilalanina_____	52
2. A administração intra - hipocampal de fenilalanina provocou o aumento das medidas de: grupos de sulfidrilas totais, TRAP e TAR. A medida de TBARS foi diminuída pela administração de fenilalanina. Piruvato ou creatina preveniram os efeitos da fenilalanina_____	57
Conclusões_____	62
Perspectivas_____	64
Referências Bibliográficas _____	65

PARTE I

I. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar o possível efeito preventivo do piruvato e da creatina (substâncias energéticas e antioxidantes) sobre as alterações comportamentais e bioquímicas provocadas pela administração intra-hipocampal da fenilalanina (Phe) em ratos Wistar. Foi desenvolvido um modelo químico experimental de fenilcetonúria (PKU) pela administração intra-hipocampal de Phe a ratos Wistar adultos atingindo níveis semelhantes aos encontrados no cérebro dos pacientes afetados. Piruvato e creatina preveniram alterações de comportamento induzidas pela Phe nas tarefas de habituação no campo aberto. O piruvato e a creatina, isoladamente, não exerceram efeito sobre os animais nas tarefas de campo aberto, mas preveniram os efeitos da Phe sobre a atividade exploratória. A Phe, o piruvato e a creatina não tiveram efeito sobre a emocionalidade dos animais. Também foram investigados parâmetros de estresse oxidativo procurando evidências de um possível mecanismo pelo qual a alta concentração de Phe poderia resultar em prejuízo da habituação dos ratos ao campo aberto. A Phe provocou o aumento de TRAP, que é uma medida da concentração de substâncias antioxidantes não enzimáticas, principalmente GSH e tioredoxina, e de TAR, que é a medida da qualidade das substâncias antioxidantes não enzimáticas, bem como das sulfidrilas totais, que compreendem GSH, tioredoxina e grupos tíois de proteínas, as quais foram aumentadas no hipocampo de ratos que receberam Phe. TBARS, que é uma medida de lipoperoxidação, diminuiu pela administração de Phe. O piruvato e a creatina, isoladamente, não exerceram efeito sobre os parâmetros de estresses oxidativo, mas o aumento das defesas antioxidantes não enzimáticas induzido pela Phe no hipocampo foi totalmente prevenido pelo pré-tratamento com creatina ou piruvato, dois potentes antioxidantes, reforçando a hipótese de que o primeiro contato do hipocampo com Phe provoca a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, induzindo o aumento de defesas antioxidantes. Estes resultados também sugerem uma possível relação entre a inibição das atividades da piruvato quinase e da creatina quinase nas alterações de comportamento causadas por Phe. Em **perspectiva**, piruvato e creatina são suplementos dietéticos a serem considerados como agentes coadjuvantes para a atual terapia dos pacientes fenilcetonúricos baseada apenas em uma dieta restrita em Phe.

II. ABSTRACT

The objective of this work was to investigate the possible preventive effect of pyruvate and creatine (substances with energetic and antioxidant properties) on the behavioral and biochemical alterations caused by intrahippocampal administration of phenylalanine (Phe) in Wistar rats. It was developed a experimental chemical model of phenylketonuria(PKU) by injecting Phe into the hippocampus of adult Wistar rats, achieving similar levels than those verified in the brain of affected patients. Pyruvate and creatine prevented behavioral alterations induced by Phe in habituation in the open field task. Pyruvate and creatine did not cause effect on animal behaviour in the open field task, but they prevented the Phe effects on exploratory activity. Phe, pyruvate and creatine did not compromise emotionality of the animals in the open field task. Stress oxidative parameters were measured looking for evidences of a mechanism for which the high Phe concentration could result in the behavioral alterations. Phe provoked the increase of TRAP, which is a measure of the concentration of nonenzymatic antioxidant substances, mainly GSH and thioredoxin, and of TAR, which is a measure of the quality of nonenzymatic antioxidant substances, as well as of the Total sulfhydryl groups, which is a measure of GSH, thioredoxin and thiol-groups of proteins, in the hippocampus of the rats. TBARS, which is a measure of lipoperoxidation, was decreased by Phe administration. Pre-treatment with pyruvate and creatine did not altered stress oxidative parameters, but fully prevented the alterations induced by Phe administration, reinforcing the hypothesis that the first contact of the hippocampus with Phe provokes reactive oxygen and nitrogen species formation, inducing increase of antioxidant defenses. These results also suggest a possible relationship between the inhibition of piruvate kinase and creatine kinase activities in the behavioral alterations caused by Phe. In **perspective**, pyruvate and creatine are diet supplements to be considered as adjuvant agents to the present therapy of phenylketonuric patients based only on Phe-restricted diet

III. LISTA DE ABREVIATURAS

BH₄	Tetraidrobiopterina
CAT	Catalase
CK	Creatina quinase
CuZnSOD	Cobre zinco superóxido dismutase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EEG	Eletroencefalograma
EIM	Erros inatos do metabolismo
ERN	Espécies reativas do nitrogênio
ERO	Espécies reativas do oxigênio
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
GSSG	Glutathiona oxidada
GR	Glutathiona redutase
HPA	Hiperfenilalaninemia
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
IP	Intraperitoneal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade(do inglês <i>low density lipoprotein</i>)

L-NAME	L-nitro-arginina metil ester
LTM	Memórias de longo prazo (do inglês <i>long-term memory</i>)
MRI	Imagens por ressonância magnética (do inglês <i>magnetic resonance imaging</i>)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Óxido nítrico sintase
PAH	Fenilalanina hidroxilase hepática
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
Phe	Fenilalanina
PKU	Fenilcetonúria
PK	Piruvato quinase
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
qBH₂	Diidropteridina
RL	Radical livre
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase

Tyr	Tirosina
------------	----------

IV. LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Metabolismo da Fenilalanina (Phe) em humanos. A ingestão de Phe é através da dieta e ela é reciclada através do “pool” de aminoácidos. A hidroxilação de Phe pela PAH com seu cofator BH_4 , na presença de oxigênio (O_2) molecular, produz Tyr. O metabolismo alternativo de L-Phe por descarboxilação ou transaminação produz vários metabólitos que são excretados na urina (Scriver & Kaufman, 2001).	12
Figura 2	A conversão de Fenilalanina(Phe) a Tirosina(Tyr). É via uma rota envolvendo a <i>para</i> -hidroxilação do benzeno pela PAH, o cofator BH_4 e o O_2 molecular (Williams et al., 2008).	13
Figura 3	A estrutura de domínio de Fenilalanina Hidroxilase (PAH). Cada subunidade de PAH é classificada em três domínios funcionais que estão envolvidos com regulação, atividade catalítica e subunidades de ligação (Erlandsen & Stevens, 1999 em Williams et al., 2008).	14
Figura 4	Mapeamento das principais áreas cerebrais envolvidas	22

	no processamento de memórias declarativas. (Adaptado de Izquierdo, 2002).	
Figura 5	Redução do oxigênio à água. (Adaptado de Smith; Marks & Lieberman, 2007).	26
Figura 6	Dano celular mediado por radicais livres. O superóxido e o radical hidroxil iniciam a lipoperoxidação nas membranas celular, mitocondrial, nuclear e do retículo endoplasmático. O aumento da permeabilidade celular provoca o influxo de Ca^{2+} , o qual causa dano mitocondrial adicional. Os grupamentos sulfidril de cisteína e outros resíduos de aminoácidos nas proteínas são oxidados e degradados. O DNA nuclear e o mitocondrial podem ser oxidados, resultando em quebras de fita e outros tipos de danos. As ERN (NO, NO ₂ e peroxinitrito) têm efeitos similares. (Adaptado de Smith et al., 2007).	28

V. INTRODUÇÃO

V.1 - Erros Inatos do Metabolismo

A primeira menção ao termo erros inatos do metabolismo(EIM) data de 1908. Garrod, em seus estudos realizados com pacientes com alcaptonúria, doença em que os afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico em sua urina, observou que frequentemente um ou mais indivíduos de uma mesma família eram afetados sem que seus pais ou demais familiares apresentassem a doença. Baseado também nas observações da maior incidência de consanguinidade entre os pais dos pacientes e nas leis Mendel, Garrod, juntamente com Bateson, um geneticista inglês, propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio observando ainda que a alcaptonúria e outras anomalias metabólicas herdadas eram raras e incomuns (Waber, 1990; Scriver et al., 2001).

Os EIM constituem um grande e heterogêneo grupo de doenças genéticas, caracterizado pela ausência, deficiência ou modificação estrutural de uma proteína, geralmente uma enzima. Esta alteração resulta no bloqueio da via metabólica com consequente acúmulo de seus substratos e derivados, bem como diminuição na síntese do produto. Tal bloqueio, dependendo da via afetada, repercute clinicamente de maneira bastante variável no indivíduo, geralmente de sintomatologia grave e muitas vezes letal (Scriver et al., 2001). Um dos aspectos clínicos mais comuns nos EIM consiste na alteração do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). No conjunto, eles atingem um a cada mil nascimentos, correspondendo a 10% das doenças genéticas, embora sua frequência isolada seja baixa. Até o momento, foram descritos aproximadamente 500 distúrbios envolvendo defeitos na síntese,

degradação, armazenamento e transporte de moléculas no organismo (Gimenez-Sanchez et al., 2001).

Desde os estudos de Garrod, muitos pesquisadores têm detectado muitas doenças metabólicas hereditárias e os EIM já foram descritos em todas as áreas do metabolismo humano normal (aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídios e carboidratos, etc.) (Scriver et al., 2001). Estudos revelam que aproximadamente um terço dos EIM correspondem a aminoacidopatias, outro terço a acidemias orgânicas e outro terço corresponde a todo restante (Hoffman, 1994).

V.2 - Fenilcetonúria e Hiperfenilalaninemia

V.2.1 - Histórico

Em 1934, o Dr. Asbjorn Fölling, através de um minucioso exame clínico, observou que duas crianças da mesma família apresentavam um odor característico na urina, mas não apresentavam nenhum outro sinal ou sintoma, exceto o retardo mental, descobrindo acidentalmente a fenilcetonúria (PKU) (Fölling, 1990).

Fölling elaborou um método para detectar uma substância desconhecida, que na presença de cloreto férrico apresentava uma coloração diferente. A substância desconhecida foi detectada: ácido fenilpirúvico. Outros testes com cloreto férrico foram realizados em 430 crianças com retardo mental, dentre as quais, 8 revelaram novos casos semelhantes. Hipotetizando uma associação entre retardo mental e excreção de fenilpiruvato na urina, Fölling sugeriu que esta era uma nova desordem do metabolismo da fenilalanina (Phe) e a chamou de “Imbecilidade Fenilpirúvica”, a qual, mais tarde, foi denominada de “Fenilcetonúria” (Penrose & Quastel, 1937). O

nome da doença deriva do alto nível de fenilpiruvato, uma fenilcetona, encontrado na urina das crianças afetadas.

O defeito metabólico foi detectado por Jervis, em 1947, que mostrou que a Phe proveniente da dieta não era convertida em tirosina (Tyr) nestes pacientes. Aproximadamente nessa época, a relação entre a redução da ingestão de Phe e o aumento do prognóstico foi demonstrada (Bickel et al., 1953). O sistema enzimático da conversão da Phe em Tyr foi descrito em 1952 por Udenfriend e Cooper. O pediatra canadense Robert Guthrie desenvolveu testes de “screening” para PKU (Guthrie & Susi, 1963; Koch, 1997). No final dos anos 1970, vários grupos começaram a investigar a base molecular da PKU. O mais notável recente avanço no estudo da PKU foi o estabelecimento, em 1996, do PAH (fenilalanina hidroxilase hepática) Mutation Analysis Consortium Database (Hoang et al., 1996).

V.2.2 - Conceito e Frequência

A PKU é transmitida por herança autossômica recessiva o que significa um risco de recorrência para a prole de 25% a cada gestação de um casal heterozigoto portador. Em indivíduos homozigotos, a atividade enzimática pode estar bastante reduzida ou ausente. Os heterozigotos, que representam cerca de 1,5% da população típica, não manifestam a doença, pois um alelo normal determina a síntese suficiente da enzima (Marzzoco & Torres, 1990). A incidência da PKU na população caucasiana está entre 1 em 10.000 e 1 em 15.000 pessoas havendo variabilidade na incidência em vários países e regiões. Na América Latina, a PKU é o EIM mais frequente diagnosticado o que ocorre não somente devido a sua elevada frequência, mas pela simplicidade da técnica diagnóstica e pelos avanços nos programas de rastreamento neonatal (Giuliani & Coelho, 1997).

A doença é caracterizada bioquimicamente pela ausência ou deficiência da atividade da enzima hepato-específica fenilalanina hidroxilase (PAH) ou, mais raramente, do seu cofator, a tetraidrobiopterina (BH₄), levando ao acúmulo de Phe e dos metabólitos derivados do seu catabolismo no sangue e outros tecidos, bem como sua excreção em grande quantidade pela urina. Hiperfenilalaninemia (HPA) é o nome genérico dado a diferentes distúrbios caracterizados por elevados níveis de Phe no sangue. As HPA podem ser classificadas de acordo com o nível sérico de Phe ou com a tolerância à Phe da dieta podendo ser divididas em:

a) Hiperfenilalaninemia Persistente Benigna: condição na qual os níveis de Phe no sangue permanecem entre 2 e 6 mg/dL, sem prejuízo ao paciente, e a atividade da PAH é em torno de 1 a 5% do normal (Smith & Lee, 2000);

b) Hiperfenilalaninemia Temporária: condição transitória causada pela imaturidade temporária da PAH caracterizada por níveis plasmáticos elevados de Phe após o nascimento que regridem após poucas semanas de vida pós-natal (Smith & Lee, 2000; Scriver et al., 2001);

c) Fenilcetonúria Materna: síndrome teratogênica em filhos de mães fenilcetonúricas que apresentaram níveis plasmáticos de Phe elevados durante a gestação. É caracterizada por baixo peso ao nascimento, microcefalia, retardo mental e distorções faciais (Clarck, 1996; Lyon et al., 1996);

d) Fenilcetonúria Clássica (PKU): condição causada pela deficiência da PAH na qual os níveis plasmáticos de Phe são costumeiramente superiores a 10 mg/dL e a atividade enzimática é menor que 1% do normal (Smith & Lee, 2000).

V.2.3 – Metabolismo da L-Fenilalanina e Fenilalanina Hidroxilase

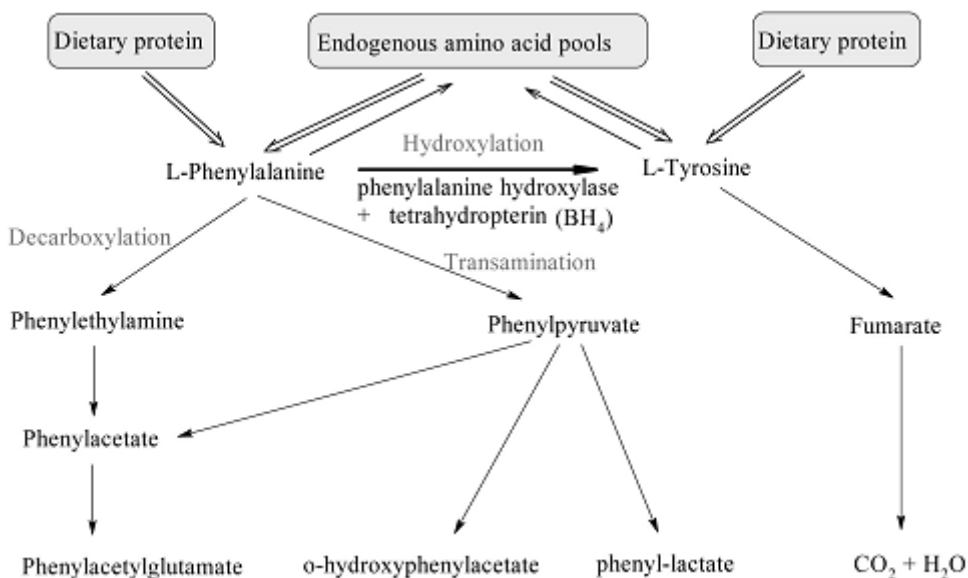


Figura 1. Metabolismo da Fenilalanina (Phe) em humanos. A ingestão de Phe é através da dieta e ela é reciclada através do “pool” de aminoácidos. A hidroxilação de Phe pela PAH com seu cofator BH₄, na presença de oxigênio (O₂) molecular, produz Tyr. O metabolismo alternativo de L-Phe por descarboxilação ou transaminação produz vários metabólitos que são excretados na urina (Scriver & Kaufman, 2001).

L-fenilalanina é um aminoácido nutricionalmente essencial e indispensável para a síntese proteica em tecidos de mamíferos (Womack & Rose, 1934). Normalmente, 75% da Phe é convertida em Tyr por hidroxilação (Moss & Schoenheimer, 1940; Grau & Steele, 1954) e 25% é incorporada a proteínas. Como a principal via catabólica da Phe está afetada na PKU, pacientes afetados pela doença apresentam níveis sanguíneos de Phe até 20 vezes maiores que o normal. Além do acúmulo de Phe decorrente da ausência ou deficiência da atividade da PAH, ocorrem reações paralelas como a transaminação da Phe com o piruvato produzindo o metabólito fenilpiruvato. Além disso, ocorre a diminuição do produto

Tyr, responsável pela biossíntese de diversos neurotransmissores, como a dopamina e a norepinefrina (Scriver & Kaufman, 2001)(Figura 1).

Enquanto a *para*-hidroxilação de Phe é essencial para a ruptura do anel benzênico (Figura 2), ela não é requerida para o futuro metabolismo da cadeia lateral de alanina (Kaufman, 1999). Esta rota alternativa de transaminação e descarboxilação leva à formação de metabólitos tais como fenilpiruvato (transaminação), feniletilamina (descarboxilação) e os derivados do fenilpiruvato: fenilactato e *o*-hidroxifenilacetato que são excretados na urina (Figura 1).

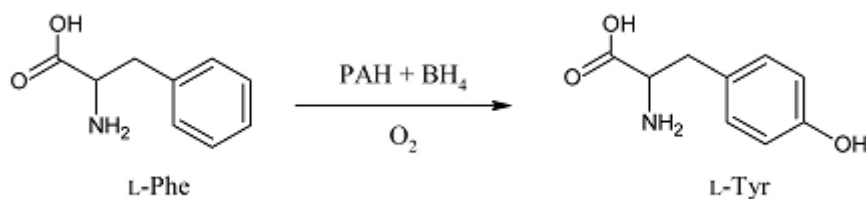


Figura 2. A conversão de Fenilalanina(Phe) a Tirosina(Tyr). É via uma rota envolvendo a *para*-hidroxilação do benzeno pela PAH, o cofator BH_4 e o O_2 molecular (Williams et al., 2008).

Phe, tetraidrobiopteridina (BH_4) e oxigênio (O_2) estão envolvidas na reação de hidroxilação da Phe. Além de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) e um mecanismo que envolve a fosforilação e desfosforilação (Udenfriend & Cooper, 1952; Scriver & Clow, 1980). Os produtos são Tyr, diidropteridina (qBH_2) e água (H_2O). A qBH_2 é uma substância instável e portanto pode sofrer um rearranjo e formar o tautômero 7,8 diidropteridina e, através da diidrofolato redutase, reconstituir a BH_4 . PAH pode ser dividida em um número de domínios funcionais (Figura 3). O domínio regulatório contém um resíduo de serina que é considerado estar envolvido na ativação pela fosforilação. O domínio catalítico contém uma porção principal de

26 ou 27 aminoácidos responsáveis pelo cofator e ferro férrico ligado. O domínio C-terminal é considerado ser associado com inter-subunidade de ligação (Hufton et al., 1995).

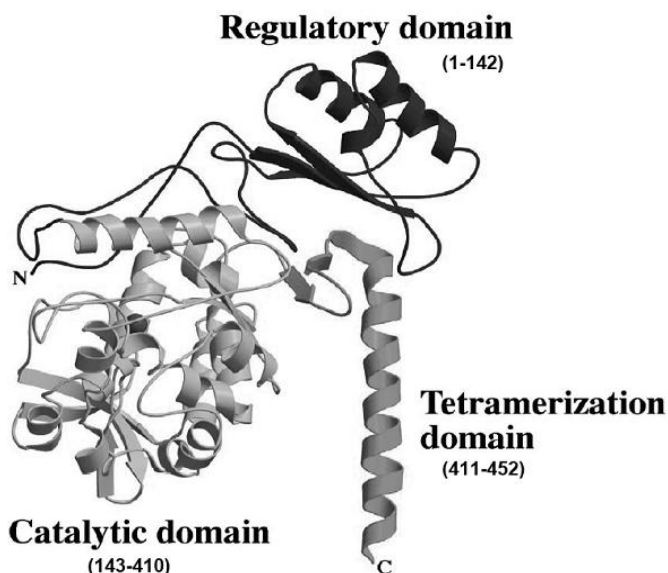


Figura 3. A estrutura de domínio de Fenilalanina Hidroxilase(PAH). Cada subunidade de PAH é classificada em três domínios funcionais que estão envolvidos com regulação, atividade catalítica e subunidades de ligação (Erlandsen & Stevens, 1999 em Williams et al., 2008).

V.2.4 – Genética da PKU

O gene da PAH humana está localizado no cromossomo 12q23.2, contém aproximadamente 171kb e 13 exons (Konecki et al., 1992; Lidsky et al., 1985). O DNA funcional contém aproximadamente 2,4kb e codifica a síntese de um polipeptídeo de 452 aminoácidos, cuja sequência é quase idêntica à da proteína PAH humana, indicando uma pequena modificação pós-traducional (Lidsky et al., 1985). HPA pode ser causada por mais de 500 mutações do “locus” na PAH, que resultam na PKU, ou por várias mutações em outros “loci” que afetam a síntese e a regeneração de BH₄, resultando em uma HPA não PKU (Scriver & Kaufman, 2001).

V.2.5 – Diagnóstico

A PKU foi o primeiro EIM incluído em triagem neonatal no mundo desde o final dos anos 1960, seguindo o desenvolvimento do ensaio bioquímico de Guthrie para diagnóstico de PKU e diversas outras doenças (Muchamore et al., 2006). No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), implantado em 2001, já está presente nos 27 estados. A PKU faz parte da triagem em todos eles.

O diagnóstico da HPA é feito com base na elevada concentração sanguínea de Phe em repetidas amostras de sangue. O limite superior de referência para Phe em sangue total ou plasma em neonatos é menor que 150 $\mu\text{mol/L}$ e levemente menor ($< 120\mu\text{mol/L}$) em crianças mais velhas (Scriver & Kaufman, 2001). Das crianças com HPA persistente, mais de 98% têm a condição devido à mutação do “locus” na PAH (Scriver & Kaufman, 2001). O diagnóstico pode ser confirmado pela determinação fluorimétrica da Phe no soro (Thompson & Thompson, 1988) ou ainda por cromatografia de troca iônica através de analisadores de aminoácidos ou por cromatografia líquida de alta performance. O diagnóstico diferencial da PKU para outras desordens de síntese e reciclagem de BH_4 , importante para instituição do tratamento adequado, pode envolver vários testes incluindo testes de carga de BH_4 , medida plasmática e na urina de metabólitos da proteína e metabólitos neurotransmissores bem como medida de traços sanguíneos de diidropteridina redutase (Scriver & Kaufman, 2001). A medida direta da atividade da enzima (PAH, 4 α -carbinolamina desidratase) requer biópsia do tecido hepático (Williams et al., 2008).

V.2.6 – Aspectos Clínicos

Os pacientes fenilcetonúricos são normais ao nascimento, mas os problemas neurológicos podem surgir nos primeiros meses da vida, caso não recebam o tratamento recomendado (Cooper, 2000). A PKU caracteriza-se clinicamente por um grupo de sinais e sintomas de manifestação variável: eczema, dificuldade para andar e falar, hipopigmentação da pele, atraso do desenvolvimento psicomotor, convulsões, hiperatividade, reduzida performance em testes de atenção e em escala de QI, comportamento agressivo, hipotonia muscular, tremores, microcefalia, epilepsia, hipoplasia dentária, descalcificação dos ossos longos, retardo do crescimento e anormalidade do eletroencefalograma (EEG) e de imagens por ressonância magnética (MRI) diretamente relacionadas com a concentração sanguínea de Phe (Fois et al., 1955; Paine, 1957; Poley & Dumermuth, 1968; Nyhan, 1979; Pietz et al., 1993; Thompson et al., 1993; Moyle et al., 2007).

V.2.7 – Aspectos Fisiológicos

A deterioração mental e as alterações do tecido nervoso dos pacientes com PKU foram anteriormente relacionadas com possíveis efeitos tóxicos do fenilpiruvato (Silberberg, 1967) e do fenilacetato (Fulton et al., 1980). O aumento dos níveis circulantes de Phe em pacientes fenilcetonúricos limitaria o transporte de Tyr e triptofano (precursores de neurotransmissores), por competição pelo sistema de transporte, entre eles o sistema L, na barreira hemato-encefálica (Lattera & Godstein, 1993), diminuindo sua disponibilidade para a síntese de neuropeptídeos ou conversão a aminas biogênicas (Nadler & Hsia, 1961; Oldendorf, 1973; Wurtman et al., 1980).

Muitos trabalhos têm imputado à Phe o principal papel na gênese da disfunção cerebral (Scriver & Kaufman, 2001) demonstrando que Phe interfere em

vários sistemas enzimáticos influenciando na neurotransmissão glutamatérgica, na síntese de neurotransmissores e de colesterol (Glushakov et al., 2003, 2005; Joseph & Dyer, 2003; Schefer et al., 2000), na sinaptogênese, na atividade da piruvato quinase e no metabolismo da glicose (Pietz et al., 2003; Hörster et al., 2006; Hasselbalch et al., 1996; Rech et al., 2002; Costabeber et al., 2003). Evidências da alteração de vários parâmetros de produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio e atividade antioxidante pelo acúmulo de Phe em vários modelos de HPA e PKU levaram diversos pesquisadores a presumir que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia do dano tecidual dos pacientes com PKU (Colomé et al., 2003; Artuch et al., 2004; Hagen et al., 2002; Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2006; Martinez-Cruz et al., 2002; Sitta et al., 2009; Moraes et al. 2010; Fernandes et al., 2010).

V.2.8 – Tratamento

A triagem neonatal permite um tratamento dietético precoce (dieta com baixo conteúdo de Phe) que previne a maioria das anormalidades neurológicas (Van der Knaap & Valk, 2005). Há propostas de objetivos no que diz respeito à concentração sanguínea de Phe durante o tratamento: do nascimento aos 8 anos, Phe entre 100 e 350 $\mu\text{mol/L}$; crianças mais velhas e adultos, Phe < 700 $\mu\text{mol/L}$ (Australian Society for Inborn Errors of Metabolism, 2005; Blau & Burgard, 2006).

Novas possibilidades têm sido introduzidas no manejo da PKU, tais como grande número de aminoácidos neutros, tetraidrobiopterina e, potencialmente, fenilalanina amônia liase ou terapia gênica (Feillet & Agostini, 2010).

Alguns estudos apontam que uma dieta considerada relativamente baixa em Phe e as vantagens e desvantagens desta alimentação em pacientes com PKU poderia ser cuidadosamente avaliada. Uma prática aproximada disto seria permitir 300 – 400 mL de leite humano por dia, embora a tolerância individual devesse ser

estritamente monitorada. Similares arranjos têm sido sugeridos para manejo da PKU alternando alimentos infantis, leite materno humano e produtos livres de Phe (van Rijn et al., 2003).

V.3 – Memória e Aprendizagem

A habilidade dos animais de recordar experiências e de modificar seu comportamento de acordo com a natureza de suas experiências claramente se classifica como um dos mais excitantes fenômenos da biologia (McGauch, 1966).

A aprendizagem e a memória são propriedades fundamentais do sistema nervoso central, sendo que ambas estão intimamente relacionadas. Os indivíduos apresentam capacidade de adaptação e modificação de seu comportamento quando expostos a novas experiências, e a capacidade de aprender e recordar eventos depende das modificações induzidas no sistema nervoso pela percepção destes eventos (Ramón & Cajal, 1911).

Memórias de longo prazo (LTM – long-term memory) não são estabelecidas imediatamente depois que elas são adquiridas. Sua consolidação requer uma variedade de processos moleculares ritmados nos neurônios que fazem a memória. Estes processos sequenciais estão ligados um ao outro em uma rota complexa (Izquierdo & McGauch, 2000; Izquierdo & Medina, 1997). Eles têm sido melhor estudados na subregião CA1 do hipocampo, que está envolvida na maioria, senão em todas as formas de memória explícita ou declarativa em mamíferos (Izquierdo & McGauch, 2000; Izquierdo & Medina, 1997; Squire, 1992; Taubenfeld et al., 1999).

A memória, como um processo dinâmico, pode ser dividida em quatro etapas:

1. **Aquisição** da informação através da exposição à experiência, interna ou externa ao indivíduo. Processo automático que consta essencialmente da associação de estímulos e respostas entre si. Este processo associativo (ou não)

inicial é intenso e se manifesta no fato de ser a memória de uma experiência recém-vivida, que geralmente é fiel e precisa ao estímulo que conduziu sua criação. Entretanto, com o passar do tempo, esta intensidade e clareza podem sofrer um decréscimo (Cammarota, 1998). Não recordamos tudo o que nos sucede, só guardamos aquilo que, por determinadas circunstâncias, individuais e do contexto, parecem ser determinantes para nos capacitarmos a recordar (Luft, 2007).

2. **Consolidação** é a fase do processamento da memória em que a mesma se mostra mais lábil e mais susceptível a modificações através da filtração e fixação progressiva das informações adquiridas (McGauch, 2000). Os processos moleculares que delineiam as mudanças sinápticas necessárias para formação da memória incluem dois picos do aumento da atividade da proteína quinase AMPc-dependente, fosforilação do fator de transcrição CREB₁, ativação gênica e síntese proteica (Bernabeu et al., 1997; Cammarota et al., 2000; Izquierdo & McGaugh, 2000; Izquierdo & Medina, 1997; McGaugh, 2000; O'Connell et al., 2000; Taubenfeld et al., 1999). O primeiro destes picos ocorre nos primeiros cinco minutos depois do treino, e o segundo, que depende do primeiro, ocorre 2-6 horas depois em ratos (Bernabeu et al., 1997; Cammarota et al., 2000; Taubenfeld et al., 1999; Vianna et al., 1999, 2000), em pintos (Rose, 2001), e nos caranguejos (Locatelli et al., 2002).

3. O **armazenamento** das memórias consolidadas garante sua preservação como tal permanecendo de uma maneira mais ou menos estável com o passar do tempo (Izquierdo, 1989; McGaugh, 1966, 2000). Independente do lugar onde se conservam estas memórias, pois há questões que ainda não possuem respostas definitivas, é indiscutivelmente certo que estas só nos valem se pudermos resgatá-las (Izquierdo, 2002).

4. A **evocação** é a única maneira de estudar e avaliar o armazenamento de memórias, observando a mudança de comportamento do animal devido ao processo de memorização (Izquierdo et al., 1998, 2000; Viana, 2000a).

A consequência dos três processos envolvidos na memória seria uma aprendizagem que se manifesta por um novo comportamento ou a modificação de um pré-existente. Entretanto, a maioria dos estudiosos restringe o processo da aprendizagem somente à aquisição de novos conhecimentos, enquanto que a memória seria a retenção dos mesmos (Izquierdo et al., 1992; Kandel & Squire, 2000; Morgado, 1999). Por definição, não há aprendizagem sem memória e nem memória sem aprendizagem. Devido à dificuldade e às muitas controvérsias para definição literal da aprendizagem, tem-se optado por um termo geral que é plasticidade.

V.3.1 – Plasticidade Sináptica e Memória

As alterações observadas no processo de aprendizagem e memória ocorrem devido à plasticidade neural, fenômeno característico do sistema nervoso central (Ramón & Cajal, 1911).

O conceito de plasticidade é extremamente amplo, incluindo todas as formas de reorganização duradoura que ocorrem em um cérebro maduro. Essas reorganizações podem ser observadas sobre os aspectos fisiológicos (propriedades funcionais adquiridas pelos neurônios), morfológicos (morfologia e ultraestrutura neural e glial) ou bioquímicos (atividades enzimáticas, transdução do sinal e mudanças na expressão gênica). Referem-se a alterações estruturais e funcionais nas sinapses como resultado de processos adaptativos do organismo. Estas adaptações promovem alterações na eficiência sináptica e podem aumentar ou diminuir a transmissão de impulsos com a consequente modulação do comportamento (Au Lois et al., 1997; McMahon & Barrionuevo, 2002).

O cérebro tem a extraordinária capacidade de desenvolver respostas plásticas durante longos períodos, podendo durar por toda a vida, sendo que a plasticidade funcional está acoplada a mudanças estruturais de longa duração (Au

Lois et al., 1997). Estudos demonstraram que o SNC pode exibir plasticidade sináptica sutil e específica em resposta a uma dada atividade como, por exemplo, o aprendizado de uma nova tarefa (Cotman, 1998).

V.3.2 – Extinção ou Inibição de Memórias

Horas, dias e até anos depois, outros processos podem contribuir para dar às memórias forma final. Estes processos incluem extinção, esquecimento (Vianna et al., 2001), reaprendizagem e adição ou redistribuição da informação, mistura com outras memórias. Enquanto alguns destes eventos têm também sido interpretados como uma forma de consolidação (Squire, 1992), é mais comum reservar esta palavra para designar os eventos que delineiam os processos que ocorrem nas primeiras horas depois da aquisição (Izquierdo & McGaugh, 2000; McGaugh, 2000).

Quando descreveu o processo de extinção, Pavlov já sugeria que este constituía um novo aprendizado. Atualmente, evidências experimentais de diferentes origens reforçam os preceitos de Pavlov (1927) e Knorski (1948) e sugerem que as memórias formadas para o aprendizado original e para o comportamento resultante do processo de extinção são armazenadas paralelamente e evocadas preferencialmente de acordo com a relação de hierarquia ultimamente estabelecida entre elas (Rescorla, 1988; Pearce & Bouton, 2001; Bouton, 2002).

Por constituir um novo aprendizado, o processo de extinção potencialmente envolve substratos neuroanatômicos, celulares e moleculares similares aqueles inicialmente recrutados para o condicionamento associativo. Demonstrações experimentais sugerem que diferentes tipos de paradigmas de aprendizado envolvem diferentes estruturas cerebrais para o condicionamento inibitório que envolve o processo de extinção, alguns paralelos e coexistindo com aqueles envolvidos no condicionamento excitatório original (Chan et al., 2001; Dudai, 2003).

V.3.3 – O papel do Hipocampo na Formação e na Extinção da Memória

O hipocampo é apontado como estrutura central no processamento de informações contextuais e é crucial para a aquisição, consolidação e evocação de memórias aversivas baseadas no condicionamento associativo (Phillips & Le Doux, 1992; Eichenbaum, 1996; Lorenzini et al., 1996; Izquierdo & Medina, 1997).

O hipocampo processa a informação recentemente adquirida por um período de semanas ou meses e, após, transfere-a para áreas específicas do córtex cerebral para um armazenamento mais prolongado (Baddeley, 1997). Esta estrutura tem conexões com a amígdala e o septo medial, córtex entorrinal, córtex pré-frontal e córtex parietal associativo (Hyman et al., 1990). Todas estas áreas são essenciais para formação das memórias declarativas (Figura 4).

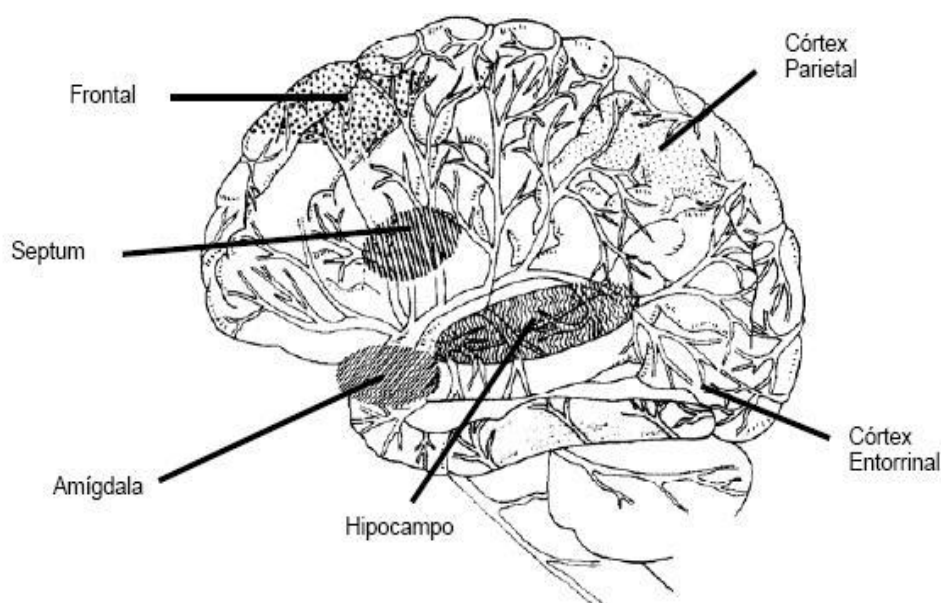


Figura 4. Mapeamento das principais áreas cerebrais envolvidas no processamento de memórias declarativas. (Adaptado de Izquierdo, 2002).

O papel central do hipocampo nos processos cognitivos estende-se ao fenômeno de extinção como foi demonstrado há várias décadas por Douglas (1967) e Kimble (1968), utilizando lesões hipocâmpais que prejudicavam a inibição de comportamentos aprendidos previamente em roedores e replicadas mais tarde por Benoit e colaboradores (1999).

V.4 – Tarefa Comportamental

V.4.1 – Campo Aberto (Open Field Task)

A habilidade de habituar-se a um novo meio ambiente, uma medida da aprendizagem/memória, é determinada pela exposição de animais (ratos Wistar) a um campo aberto (open field task) em duas consecutivas sessões de cinco minutos de treino e teste espaçadas em 24 horas. Isto permite a compreensão e análise da variação dos parâmetros comportamentais conhecidos por serem indicativos do comportamento exploratório e da emocionalidade.

Parâmetros como o número de cruzamentos de quadrados com as quatro patas, o número de “rearings”, o tempo de latência para iniciar a exploração do novo meio ambiente, o número de “groomings” e o número de bolos fecais são registrados por um observador sem informação de condições subjetivas (Walsh & Cummins, 1976). O número de cruzamentos é indicativo da atividade motora e sua redução ao longo das sessões, uma medida de habituação. A redução do número de “rearings” através das sessões também é considerada uma medida de habituação. O número de “groomings” e de bolos fecais e tempo de latência são expressões da emocionalidade (Archer, 1973; Elias et al., 1975; Ohl et al., 2001).

Cada animal é testado somente uma vez, tanto que diferentes tratamentos requerem diferentes grupos de animais. O aparato consiste em uma caixa medindo 60X40X50cm com um vidro na parede frontal. O piso é dividido em 12 quadrados

iguais por linhas pretas. Os animais são gentilmente colocados no quadrante esquerdo de trás, o cronômetro é acionado e os parâmetros comportamentais destacados passam a ser observados e registrados durante o tempo de cinco minutos (Walsh & Cummins, 1976).

V.5 – Estresse Oxidativo

V.5.1 – Radicais Livres

Um radical livre (RL) é uma estrutura química que possui um elétron desemparelhado, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Isto o torna muito instável, extraordinariamente reativo e com uma capacidade enorme para combinar-se inespecificamente com as diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas (Halliwell & Gutteridge, 2007; Southorn & Powis, 1988).

Os sistemas biológicos são expostos a radicais livres que são formados endogenamente (subprodutos do metabolismo aeróbico) ou que são resultados de influências externas, como a radiação ionizante e a exposição à radiação eletromagnética (Southorn & Powis, 1988; Wolf, 2001).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 molecular sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . No entanto, aproximadamente 5% do O_2 utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à H_2O , podendo ser convertido a intermediários reativos como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila (OH^{\cdot}) e também o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo exacerbado inclusive em condições fisiológicas (Bovoris & Chance, 1973).

Espécies reativas do oxigênio (ERO) é um termo genérico que inclui radicais do oxigênio e certos não radicais que são agentes oxidantes e/ou são facilmente

convertidos a radicais (ácido hipocloroso (HOCl), ácido hipobromoso (HOBr), ozônio (O₃), peroxinitrito (ONOO), O₂^{•-}, H₂O₂). Em outras palavras, todos radicais de O₂ são ERO, mas nem todas ERO são radicais de O₂. Espécies reativas do nitrogênio (ERN) é também um termo coletivo incluindo radicais de óxido nítrico e dióxido de nitrogênio, bem como não radicais, tais como ácido nitroso (HNO₂) e tetróxido dinitrogênio (N₂O₄). Reativo não é sempre um termo apropriado: H₂O₂, óxido nítrico (NO[•]) e O₂^{•-} reagem rapidamente com umas poucas moléculas, já OH[•] reage rapidamente com quase todas. Outras espécies reativas têm intermediários reativos (Halliwell & Whiteman, 2004).

V.5.2 – Defesas Antioxidantes

Halliwell e Gutteridge (1996) definiram um antioxidante como qualquer substância que, quando presente a baixas concentrações, quando comparadas com aquela de um substrato oxidável, significativamente diminui ou previne a oxidação daquele substrato.

O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes totais e as espécies reativas geradas no tecido (Halliwell & Gutteridge, 2007). Para evitar o dano celular que pode ser causado pela formação de espécies reativas, os sistemas biológicos desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante, que podem ser enzimáticos e não-enzimáticos, convertendo-as em derivados inativos (Halliwell, 2001). As enzimas antioxidantes agem impedindo a sua geração bem como as removendo. Dentre os principais antioxidantes enzimáticos estão a enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de dois radicais superóxido formando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e O₂, a enzima catalase, que é responsável pela degradação de H₂O₂ formando H₂O e O₂, e a enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px) que catalisa a decomposição de hidroperóxidos utilizando a

glutationa reduzida (GSH) como substrato para formar glutationa oxidada (GSSG) e o produto de redução do hidroperóxido. Fisiologicamente, a GSH-Px atua acoplada à enzima glutationa redutase (GR) que, por sua vez, catalisa a redução de GSSG, usando nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como coenzima (Halliwell, 2001; Bonnefoy et al., 2002; Salvador & Henriques, 2004). (Figura 5).

Além das enzimas antioxidantes, o organismo tem a capacidade de sintetizar compostos não-enzimáticos que apresentam, direta ou indiretamente, grande capacidade de defesa antioxidante, atuando a fim de manter o estado de equilíbrio celular. São exemplos deles: bilirrubina, ácido úrico, melatonina, estrógeno e glutationa (Halliwell & Gutteridge, 2007). Alguns antioxidantes não podem ser sintetizados pelo organismo, devendo ser ingeridos na dieta. Dentre estes antioxidantes não-enzimáticos, pode-se citar vitaminas, como A,C,E, riboflavina e tiamina e os polifenóis (Salvador & Henriques, 2004).

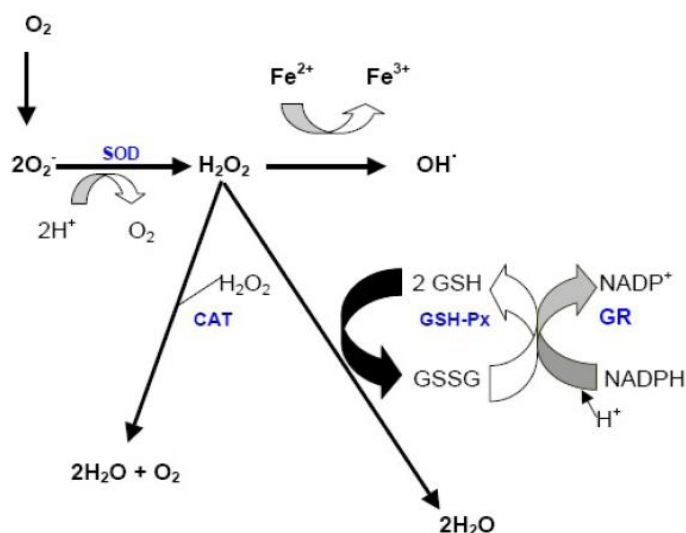


Figura 5 . Redução do oxigênio à água. (Adaptado de Smith; Marks & Lieberman, 2007).

V.5.3 – Estresse Oxidativo

Em essência, o termo estresse oxidativo se refere a um sério desequilíbrio entre produção de espécies reativas e defesas antioxidantes. Sies (1991) definiu o estresse oxidativo como uma desordem no balanço pró-oxidante-antioxidante em favor do anterior, levando ao potencial dano. O estresse oxidativo pode resultar de duas condições associadas ou não:

a) Níveis diminuídos de antioxidantes, por exemplo, mutações afetando as atividades de enzimas de defesa antioxidante tais como cobre zinco superóxido dismutase (CuZnSOD), ou GSH-Px, ou toxinas que depletam defesas antioxidantes. Por exemplo, muito xenobióticos são metabolizados por conjugação com GSH; altas doses podem depletar GSH e causar estresse oxidativo ainda se o xenobiótico não for ele mesmo o gerador de espécies reativas. Deficiências de minerais na dieta, por exemplo, zinco (Zn^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), ferro (Fe^{2+}), cobre (Cu^{2+}) e selênio (Se) e/ou antioxidantes podem também causar estresse oxidativo.

b) Aumento da produção de espécies reativas, por exemplo, por exposição das células ou organismos a elevados níveis de O_2 ou a outras toxinas que são elas mesmas espécies reativas (por exemplo, NO_2) ou são metabolizados para gerar espécies reativas (por exemplo paraquat), ou ativação excessiva dos sistemas “naturais” produzindo tais espécies (por exemplo, ativação inapropriada de células fagocitárias em doenças inflamatórias crônicas) (Halliwell & Whiteman, 2004).

V.5.4 – Dano Oxidativo

Dano oxidativo é o dano biomolecular que pode ser causado pelo ataque direto de espécies reativas durante o estresse oxidativo (Figura 6) tendo como consequências:

a) Adaptação de células ou organismo por auto-regulação de sistemas de defesa, que podem (a) proteger completamente contra o dano; (b) proteger contra o dano por alguma extensão, mas não completamente; ou (c) “sobreprometer” (a célula é resistente a níveis mais altos de estresse oxidativo impostos subsequentemente).

b) Injúria celular: isto envolve o dano oxidativo a algum ou todos alvos moleculares: lipídeos, DNA, proteínas, carboidratos, etc. O dano oxidativo pode também ocorrer durante a adaptação. Nem todo dano causado pelo estresse oxidativo é dano oxidativo: dano às biomoléculas pode resultar de mudanças relacionadas ao estresse oxidativo no nível de íons, cálcio (Ca^{2+}), por exemplo, ou ativação de proteases, por exemplo.

c) Morte Celular: a célula pode (a) recuperar-se do dano oxidativo reparando-o ou repondo as moléculas danificadas, ou (b) ela pode sobreviver com dano oxidativo persistente ou (c) o dano oxidativo, especialmente ao DNA, pode provocar a morte celular, por apoptose ou necrose (Halliwell & Whiteman, 2004).

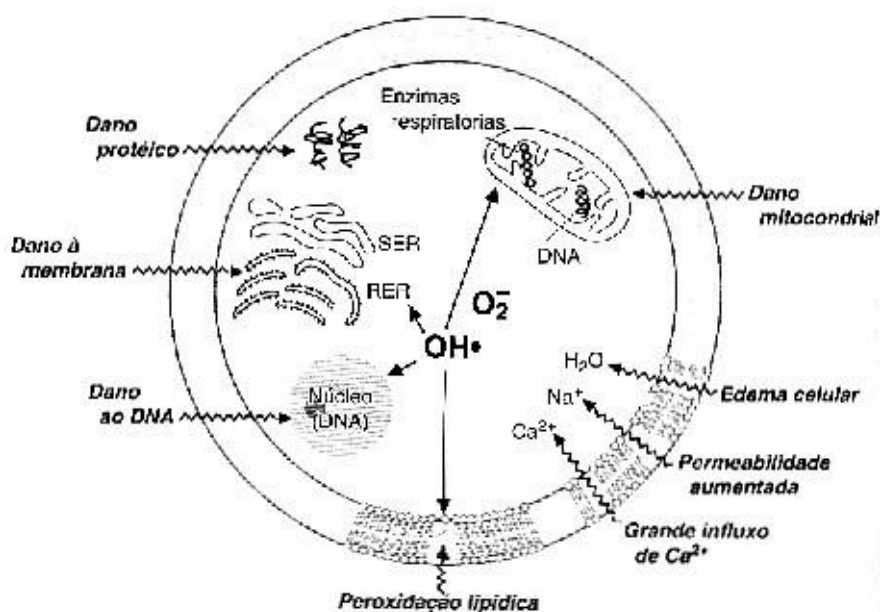


Figura 6. Dano celular mediado por radicais livres. O superóxido e o radical hidroxil iniciam a lipoperoxidação nas membranas celular, mitocondrial, nuclear e do retículo endoplasmático. O aumento da permeabilidade celular provoca o influxo de Ca^{2+} o qual causa dano mitocondrial adicional. Os grupamentos sulfidril de cisteína e outros resíduos de aminoácidos nas proteínas são oxidados e degradados. O DNA nuclear e o mitocondrial podem ser oxidados, resultando em quebras de fita e outros tipos de danos. As ERN (NO , NO_2 e peroxinitrito) têm efeitos similares. (Adaptado de Smith et al., 2007).

VI. OBJETIVOS

VI. 1 – Objetivo Geral

Os trabalhos compilados nesta tese dedicaram-se à investigação do possível efeito preventivo do piruvato e da creatina sobre alterações comportamentais e bioquímicas sugerindo uma possível relação da aprendizagem/memória com o estresse oxidativo. Em estudos anteriores em nosso laboratório, as atividades das enzimas piruvato quinase e creatina quinase apresentaram alteração em modelos animais de HPA e PKU. O estresse oxidativo também foi demonstrado nos referidos modelos. Para isso, utilizamos um modelo experimental de hiperfenilalaninemia através da administração intra-hipocampal de fenilalanina a ratos Wistar adultos atingindo níveis semelhantes aos encontrados no cérebro dos pacientes fenilcetonúricos. A abordagem farmacológica foi associada ao paradigma comportamental de campo aberto. Além disso, investigamos a possível relação entre as alterações de parâmetros comportamentais e as alterações de parâmetros de estresse oxidativo.

VI. 2 – Objetivos Específicos

1. Desenvolver e aplicar modelo experimental de hiperfenilalaninemia através da administração intra-hipocampal de fenilalanina a ratos Wistar adultos atingindo níveis semelhantes aos encontrados no cérebro dos pacientes fenilcetonúricos.
2. Estudar nestes animais parâmetros comportamentais (tarefa de campo aberto) e bioquímicos (estresse oxidativo).

3. Investigar o eventual efeito preventivo da administração de substâncias com propriedades energéticas e antioxidantes (creatina e piruvato) sobre os parâmetros comportamentais e bioquímicos alterados no modelo in vivo.

PARTE II

CAPÍTULO I

Piruvato e creatina previnem as alterações do estresse oxidativo e do comportamento causadas pela administração de fenilalanina no hipocampo de ratos.

Pyruvate and creatine prevent oxidative stress and behavioral alterations caused by phenylalanine administration into hippocampus of rats

Publicado em 08 de Novembro de 2011

Metabolic Brain Disease

Pyruvate and creatine prevent oxidative stress and behavioral alterations caused by phenylalanine administration into hippocampus of rats

Simone Luisa Berti · Guilherme Marmontel Nasi · Cristina Garcia ·
Fernanda Luz de Castro · Michely Lopes Nunes · Denise Bertin Rojas ·
Tarsila Barros Moraes · Carlos Severo Dutra-Filho ·
Clóvis Milton Duval Wannmacher

Received: 16 August 2011 / Accepted: 8 November 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Phenylketonuria is characterized by a variable degree of mental retardation and other neurological features whose mechanisms are not fully understood. In the present study we investigated the effect of intrahippocampal administration of phenylalanine, isolated or associated with pyruvate or creatine, on rat behavior and on oxidative stress. Sixty-day-old male Wistar rats were randomly divided into 6 groups: saline; phenylalanine; pyruvate; creatine; phenylalanine + pyruvate; phenylalanine + creatine. Phenylalanine was administered bilaterally in the hippocampus one hour before training; pyruvate, at the same doses, was administered in the hippocampus one hour before phenylalanine; creatine was administered intraperitoneally twice a day for 5 days before training; controls received saline solution at same volumes than the other substances. Parameters of exploratory behavior and of emotionality were assessed in both training and test sessions in the open field task. Rats receiving phenylalanine did not habituate to the open field along the sessions, indicating deficit of learning/memory, but parameters of emotionality were normal, not interfering in the habituation process. Pyruvate or creatine administration prevented the lack of habituation caused by phenylalanine. Pyruvate and creatine also prevented alterations provoked

by phenylalanine on lipid peroxidation, total content of sulfhydryls, total radical-trapping antioxidant potential and total antioxidant reactivity. The results suggest that the behavioral alterations provoked by intra-hippocampal administration of phenylalanine may be caused, at least in part, by oxidative stress and/or energy deficit. If this also occurs in PKU, it is possible that pyruvate and creatine supplementation to the phenylalanine-restricted diet might be beneficial to phenylketonuric patients.

Keywords Phenylalanine · Behavior · Open field · Oxidative stress · Creatine · Pyruvate

Introduction

Phenylketonuria (PKU) is an inborn autosomal recessive disease caused by a severe deficiency of phenylalanine-4-hydroxylase activity. This disease is biochemically characterized by the accumulation of phenylalanine (Phe) and its metabolites in blood and other tissues. The incidence in Caucasians is approximately 1:10,000 (Scriver and Kaufman 2001).

The mechanisms of brain damage in PKU seem to be multiple and are poorly understood, although there are evidences suggesting that normal levels of Phe are critical to every phase of brain development. (Scriver and Kaufman 2001). On the basis of blood Phe concentrations, PAH deficiency can be classified into classic PKU (Phe >1,200 $\mu\text{mol/L}$), mild PKU (Phe=600–1,200 $\mu\text{mol/L}$) and mild hyperphenylalaninemia (HPA), where blood Phe is elevated above upper reference limit, but <600 $\mu\text{mol/L}$. The decreased PAH activity found in most forms of PKU and

S. L. Berti · G. M. Nasi · C. Garcia · F. L. de Castro ·
M. L. Nunes · D. B. Rojas · T. B. Moraes · C. S. Dutra-Filho ·
C. M. D. Wannmacher (✉)

Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo,
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: clovisdw@ufrgs.br

Published online: 19 November 2011

 Springer

HPA are caused by mutations in the PAH gene, resulting in a non-functional PAH enzyme (Williams et al. 2008).

Early detection of PKU patients through neonatal screening allows an early dietary treatment (low-Phe diet) which prevents most of the neurological abnormalities (Scriver and Kaufman 2001). With good dietary control during the first years of life, PKU children seemed to have comparable IQs to their siblings (Berry et al. 1979; Burgard et al. 1996; Dobson et al. 1976; Koch et al. 1984). However, despite generally normal intellectual performance, many PKU subjects are less competent in academic skills, performing worse than controls of the same age in arithmetic and language achievement (Fishler et al. 1987), visual perception and visual-motor skills (Fishler et al. 1987, 1989; Leuzzi et al. 2004). The benefits of the Phe-restricted, low protein diet, are clear and include: avoidance of the main biochemical abnormality (increased Phe concentrations), improved neurological and psychological performance, and prevention of neurological damage. However, dietary treatment does not come without challenges such as: compliance with the diet, the requirement of social support, and risk of imbalances in essential dietary nutrients (Hanley 2004).

Treatment options for the management of phenylketonuria (PKU; OMIM 262600) are expanding, with the introduction of new possibilities, such as large neutral amino acids, tetrahydrobiopterin and, potentially, phenylalanine (Phe) ammonia lyase or gene therapy (Feillet and Agostoni 2010).

Magnetic resonance imaging (MRI) has shown white matter lesions in the brain of adult PKU patients, the size and number of which directly relate with blood Phe concentration (Thompson et al. 1993). Such changes have been reversed by lowering blood Phe levels (Cleary et al. 1995). This has led to the establishment of Phe treatment targets (birth to 8 years, Phe 100–350 $\mu\text{mol/L}$; older children and adults, Phe <700 $\mu\text{mol/L}$) (Blau and Burgard 2006). A meta-analysis of the cognitive profile of adolescents and adults with PKU compared with control subjects showed significantly reduced Full Scale IQ, processing speed, motor control and inhibitory abilities, and reduced performance on tests of attention in the PKU groups (Moyle et al. 2007).

It has been demonstrated that glucose metabolism is reduced in brain of PKU patients (Hasselbach et al. 1996) and Phe inhibits the *in vitro* glucose uptake by rat brain (Rodrigues et al. 1990). The inhibition of pyruvate kinase by phenylalanine decreases glycolysis and energy production, and alanine, a known competitor of phenylalanine on the enzyme activity, prevents the reduction of glycolysis and energy production caused by phenylalanine in brain cortex homogenates from 30-day-old Wistar, probably by preventing the enzyme inhibition provoked by the amino acid (Lütz et al. 2003). Phe and PPA (phenylpyruvic acid)

inhibit pyruvate kinase (PK) activity by competition with the enzyme substrates ADP and phosphoenolpyruvate. Pyruvate kinase plays a crucial role on the glycolytic pathway, the main route that provides energy for brain functioning. It is possible that a reduction of this enzyme activity may contribute to the brain damage characteristic of PKU (Feksa et al. 2003).

Free radicals seem to be involved in a large number of human diseases. Increasing evidence has shown that damage caused by free radicals is an important contributing factor in chronic inflammatory, vascular, neoplastic and neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease, Alzheimer's disease, strokes, multiple sclerosis, epilepsy, etc. (Halliwell and Gutteridge 2007). The brain has relatively low levels of antioxidant defenses, high lipid content, specially unsaturated fatty acids and catecholamines, which are highly susceptible to reactive oxygen species (ROS) attack (Sirtori et al. 2005).

Oxidative stress was observed in some errors of intermediary metabolism owing to the accumulation of toxic metabolites leading to excessive free radical production (Halliwell and Gutteridge 2007). Restricted diets also alter the antioxidant status in some inborn errors of metabolism (Artuch et al. 2004). In this context, oxidative stress has been demonstrated in animal models of HPA and PKU (Hagen et al. 2002; Ercal et al. 2002; Martinez-Cruz et al. 2002). The *in vitro* effect of Phe, at similar concentrations as to those found in the plasma of PKU patients and higher, on lipid peroxidation (increase of TBA-RS values) and protein oxidative damage (sulfhydryl oxidation) in nuclei-free homogenates from the hippocampus was verified and since the lipid oxidative damage provoked by Phe was totally prevented by the free radical scavengers α -tocopherol and melatonin, these effects were probably mediated by reactive oxygen species (Fernandes et al. 2010). Several studies have shown that enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses are decreased in plasma and erythrocytes of PKU patients, which may be due to an increased free radical generation or secondary to the deprivation of micronutrients which are essential for these defenses (Ribas et al. 2011).

Pyruvate has been considered a strong antioxidant and neuroprotector (Jagtap et al. 2003; Frenzel et al. 2005; Hegde et al. 2010). The protective effects by providing simultaneous resistance to oxidative stress and mitochondrial insult are the result of a unique dual property of pyruvate with concurrent ability to serve as an effective neuronal energy substrate for glycolysis and to act as an exceptionally powerful antioxidant (Mazzio and Soliman 2003).

Previous studies demonstrated that Phe inhibited creatine kinase (CK) activity (Costabeber et al. 2003) which is mainly responsible for phosphocreatine synthesis (Khuchua et al. 1998). Creatine is a natural ergogenic compound and

is widely used by athletes as a food supplement to enhance muscular performance. It also has anti-apoptotic (O’Gorman et al. 1997), anti-excitotoxic (Xu et al. 1996), and directly anti-oxidative properties (Lawler et al. 2002; Sestili et al. 2006), both in vitro and in vivo. Marked creatine-mediated neuroprotection was found in rodent models of neurodegenerative diseases, such as Huntington’s disease, Parkinson’s disease, or amyotrophic lateral sclerosis (Wyss and Schulze 2002; Beal 2011).

Natural dietary supplements with creatine was accompanied by favorable effects on neurobehavioral functioning, especially memory skills (Bender et al. 2008). Creatine prevents behavioral alterations caused by methylmalonic acid administration into the hippocampus of rats in the open field task (Vasques et al. 2006). All these findings pinpoint to a close correlation between the functional capacity of the creatine kinase/phosphorylcreatine/creatine system and proper brain function (Wyss and Schulze 2002).

Taking together these observations about creatine and pyruvate, it is possible that these substances may prevent the effect of phenylalanine (Phe) on creatine kinase (CK) and pyruvate kinase activities, acting directly and/or through oxidative stress. To test the hypothesis that inhibition of pyruvate kinase and creatine kinase may be partially responsible for behavior alterations caused by intra-hippocampal Phe administration, sixty-day-old male Wistar rats were subjected to open field task after treatment with Phe and pretreatment with pyruvate and creatine. Considering that Phe induces oxidative stress, we investigated the influence of intra-hippocampal Phe administration and pretreatment with pyruvate or creatine, on some parameters of oxidative stress and antioxidant defenses. The hippocampus was chosen because this structure is closely involved in learning/memory (Izquierdo and Medina 1997).

Materials and methods

Reagents

All reagents were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Animals

A total of 90 sixty-day-old male Wistar rats (180–230 g) from our own breeding stock of the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, Brazil, were used for the experiments. The animals were housed four per cage with commercial chow (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil) containing 20.5% protein (predominantly soybean supplemented with methionine), 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipids, 7% ash and 10% moisture and

water freely available under a 12 h light/12 h darkness cycle (lights on at 7:00 AM) at a constant temperature of $22\pm 1^\circ\text{C}$. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, and followed the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication n° 85–23, revised 1985).

Surgical procedure

Rats were bilaterally implanted under deep anaesthesia (i.p. administration of a mixture of ketamine and xylazine, 90 and 60 mg/Kg, respectively) with 22-gauge stainless cannula with an inner needle guide (diameter, 0.3 mm) aimed 1.0 above the pyramidal cell layer of the dorsal hippocampus (coordinates A: - 4,2; L: 3,0; V: 2,5 mm), according to Paxinos and Watson (1986). The cannula was fixed to the skull with dental cement (Izquierdo and Medina 1997). All procedures were performed under aseptic conditions. The animals were allowed to recover unrestrained for 2 days after surgery until the day of the experiment.

Intrahippocampal drug administration and control of cannula placement

One hour before training, 30-gauge needle was fit into the guide cannula protruding 1 mm from the tip of the cannula in order to administer a bilateral infusion of 1 μL of 30 mM Phe (achieving approximately 1 μM concentration in the hippocampus), or 1.0 μL of NaCl 30 mM into the dorsal hippocampus. The pH of each solution was previously adjusted to 7.4 with 0.1 N NaOH. Infusions were performed at a rate of 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. In this form was administered 1 μL pyruvate (30 mM). Creatine was injected i.p. (0.4 g/kg) for five days before the behavioral evaluation. At the end of the behavioral evaluation, 2 μL of 4% methylene blue were infused through the cannula. The animals were killed by decapitation and the brains were removed for evaluation of cannula placement (Izquierdo et al. 2000). Animals which showed that diffusion was not restricted to the hippocampus were discarded.

In the experiments designed to evaluate the effect of pyruvate, the animals were bilaterally preinjected into the hippocampus with 1 μL of 30 mM NaCl or 1 μL of 30 mM pyruvate. One hour after pyruvate injection, a bilateral infusion of 1 μL of 30 mM Phe or 1 μL of 30 mM NaCl was administered into the dorsal hippocampus.

The effect of creatine was evaluated by preinjecting 0.4 g/Kg of creatine i.p. (or NaCl 0.9 g% in the same volume) in the animals for 5 days. One hour after the last administration, a bilateral infusion of 1 μL of 30 mM Phe or 1 μL of 30 mM NaCl was administered into the dorsal hippocampus.

All the animals were subjected to similar treatments receiving the same number of injections in the same volumes. Animals of the groups that did not receive creatine received the same volume of saline through the same via (intraperitoneal) along the treatment (5 days). Intra-hippocampal administration followed the same design: pyruvate or Phe was substituted by the same volume of saline.

Open field habituation

The rats' ability to habituate to a new environment, a measure of learning/memory, was assessed by subjecting the animals to two consecutive 5-min sessions (training and testing) spaced 24 h in an open field. It allows the comprehensive analysis of a range of behavioral parameters known to be indicative of dimensions such as exploratory behavior and emotionality. Each animal was tested only once, so that different treatments required different sets of rats. The rats received the last intra-hippocampal infusion one hour before training session. The apparatus consisted of a wooden box measuring 60×40×50 cm with a frontal glass wall. The floor was divided into 12 equal squares by black lines. The animals were placed gently on the left rear quadrant of the open field, and the number of the squares crossed with the four paws, number of rearing responses, latency time to initiate exploration of the novel environment, number of groomings and number of fecal boli were recorded by an observer not aware of the subject condition (Walsh and Cummins 1976). Crossings and rearings are considered exploratory behavior and fecal boli, latency and grooming are expressions of emotionality (Archer 1973; Elias et al. 1975). The number of squares crossed was indicative of motor activity and its reduction along the sessions, a measure of habituation. The reduction in the number of rearing responses along the sessions was considered as a measure of habituation.

Tissue preparation for oxidative stress evaluation

One hour after the last intra-hippocampal drug administration the rats were killed by decapitation without anesthesia, and the brain was rapidly excised on a Petri dish placed on ice. The olfactory bulbs, pons, medulla, cerebellum and cerebral cortex were discarded and hippocampus was dissected, weighed and kept chilled until homogenization. Brain tissue was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at 750 × g for 10 min at 4°C to discard nuclei and cell debris (Gonzalez-Flecha et al. 1991; Evelson et al. 2001). The pellet was discarded and the hippocampus supernatant, a suspension of mixed and preserved organelles, including mitochondria, was separated and used for the various analyses.

Thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS)

TBA-RS measures mainly malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation caused mainly by hydroxyl free radicals. Hydroxyl free radicals are mainly formed from H₂O₂ by the iron-catalyzed Fenton reaction or by the Haber-Weiss reaction. TBA-RS was measured according to Ohkawa et al. (1979). Briefly, to glass tubes samples and reagents were added in the following order: 500 μL of tissue supernatant; 50 μL of SDS 8.1%; 1,500 μL of 20% acetic acid in aqueous solution (v/v) pH 3.5; 1,500 μL of 0.8% thiobarbituric acid; and 700 μL of distilled water. The mixture was vortexed and the reaction was carried out in a boiling water bath for 1 h. The mixture was allowed to cool on water for 5 min, and was centrifuged at 750 × g for 10 min. The resulting pink stained TBA-RS were determined spectrophotometrically at 532 nm. A calibration curve was generated using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as a standard. TBA-RS were calculated as nmol of TBA-RS per mg of protein.

Total sulfhydryl content

This assay is based on the method of Aksenov and Markesbery (2001) where the reduction of 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, 0.1 mM DTNB was added to 120 μL of hippocampus supernatants. This was followed by 30-min incubation at room temperature in a dark room. Absorption was measured at 412 nm. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were calculated as nmol of TNB per mg of protein.

Total radical-trapping antioxidant potential (TRAP)

TRAP was determined by measuring the chemiluminescence intensity of luminol induced by z,z'-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP) thermolysis (free radical source) in a scintillation counter (Evelson et al. 2001). After adding 3 mL of 10 mM ABAP and 10 μL of 5.6 mM luminol to scintillation vials, the initial light intensity was obtained. Ten microliters of 160 μM Trolox (water soluble α-tocopherol analogue) or 30 μL of samples were added to assess their antioxidant content and at this point, the luminescence intensity is practically abolished. The consumption of active antioxidants present in samples produces the return of the luminescence and the time required to this was compared to those obtained employing Trolox under identical experimental conditions. TRAP values were calculated as Trolox equivalents and were represented as nmol of Trolox per mg of protein.

Total antioxidant reactivity (TAR)

TAR, which represents the quality of the tissue antioxidants, was determined by measuring the luminal chemiluminescence intensity induced by *z,z'*-azo-bis-(2-amidinopropane (ABAP) according to the method of Lissi et al. (1992). The background chemiluminescence was measured by adding 4 mL of 2 mM ABAP (in 0.1 M glycine buffer, pH 8.6) into a glass scintillation vial. Fifteen microliters of luminal (4 mM) was added to each vial and the chemiluminescence was measured. This was considered to be the basal value. Ten microliters of 10 μ M Trolox or hippocampus was then added and the chemiluminescence was measured during 60 s. The Trolox or supernatant addition reduces the chemiluminescence. The rapid reduction in luminal intensity is considered as a measure of the TAR capacity. TAR measurement was calculated as nmol of Trolox per mg of protein.

Protein determination

Protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Training-test differences from the open field experiments were analyzed by Kruskal-Wallis ANOVA followed by Mann-Whitney *U* test when Kruskal-Wallis test was significant and the results were expressed as median and percentile 75. Data from the oxidative stress experiments were expressed as mean \pm standard deviation. Assays were performed in duplicate. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA and comparison between means was performed by the Tukey test when F value was significant. All analyses were performed through the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software. A value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Pretreatment with creatine and pyruvate prevents the effect of phenylalanine on the habituation of rats in the open field task

The training-test difference of the number of crossing and rearing responses of the animals submitted to the open field task can be observed in Fig. 1. Statistical analysis of the two parameters of habituation by Kruskal-Wallis ANOVA, followed by Mann-Whitney *U* test revealed a deficit in the habituation to a novel environment of the rats infused with phenylalanine, since this group did not reduce the number of crossing and rearing responses at testing session

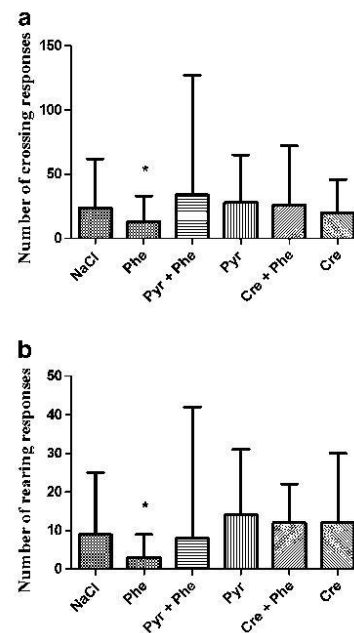


Fig. 1 Effect of the administration of phenylalanine (Phe), pyruvate (Pyr) and creatine (Cre), on the number of crossings (**a**) and rearings (**b**) performed by rats on the open field. Data are median + percentile 75 of differences between training and testing for fifteen animals in each group. * $p < 0.05$ compared to the other groups (Mann-Whitney *U* test)

compared with the other groups ($p < 0.05$). Therefore, pretreatment with pyruvate or creatine prevented the effect of phenylalanine on the two parameters of habituation. These results suggest a possible relation between the inhibition of pyruvate kinase and creatine kinase activities by phenylalanine and the deficit of habituation (learning/memory) in the open field task.

Phenylalanine, pyruvate and creatine do not compromise emotionality of the animals in the open field task

The expressions of emotionality were evaluated according to the number of fecal boli, the latency to initiate exploration of the novel environment and the number of groomings of the animals subjected to the open field task (Fig. 2). Statistical analysis of the three parameters of emotionality did not reveal statistical differences between groups in these parameters ($P > 0.05$). Therefore, phenylalanine, pyruvate and creatine did not interfere in the emotionality of the animals in the open field task, indicating that the effects observed in the habituation were not due to emotional factors.

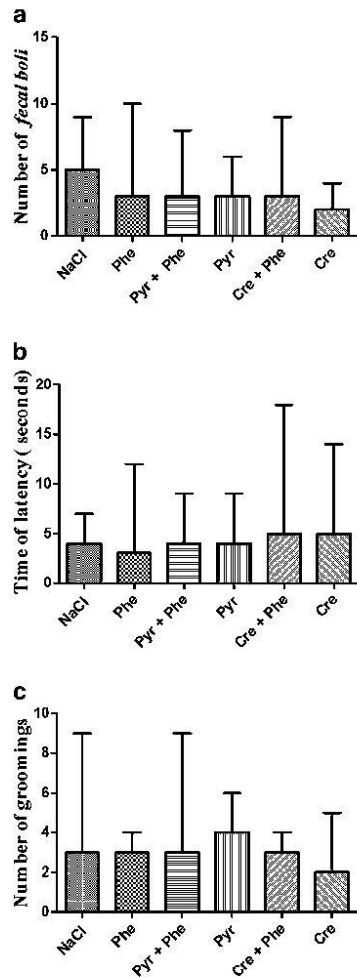


Fig. 2 Effect of the administration of phenylalanine (phe), pyruvate (Pyr) and creatine (Cre) on the number of fecal boli (a), latency in initiate the exploration (b) and number of groomings (c) performed by rats on the open field. Data are median + percentile 75 of differences between training and testing for fifteen animals in each group

Pretreatment with creatine and pyruvate prevents alteration of oxidative stress parameters caused by phenylalanine administration into rat hippocampus

Results were compatible with oxidative stress. TRAP, which is a measure of the concentration of nonenzymatic antioxidant substances, mainly GSH and thioredoxin, was increased in the hippocampus of the rats receiving Phe. Two-way ANOVA showed a significant interaction be-

tween Phe and creatine ($F(1,22)=3.94$; $P<0.05$) and between Phe and pyruvate ($F(1,22)=4.19$; $P<0.05$); Tukey test showed that Phe group was different from the other groups, indicating that the increase of TRAP induced by Phe was prevented by creatine or pyruvate (Fig. 3).

TAR, which is a measure of the quality of nonenzymatic antioxidant substances, was increased by Phe administration. Two-way ANOVA showed a significant interaction between Phe and creatine ($F(1,22)=5.42$; $P<0.05$) and between Phe and pyruvate ($F(1,22)=4.65$; $P<0.05$); Tukey test showed that Phe group was different from the other groups, indicating that the increase of TAR induced by Phe was prevented by creatine or pyruvate (Fig. 4).

TBARS, which is a measure of lipoperoxidation, was decreased by Phe administration. Two-way ANOVA showed a significant interaction between Phe and creatine ($F(1,20)=6.19$; $P<0.05$) and between Phe and pyruvate ($F(1,20)=6.73$; $P<0.05$); Tukey test showed that Phe group was different from the other groups, indicating that the increase of TRAP induced by Phe was prevented by creatine or pyruvate (Fig. 5).

Total sulfhydryl groups, which is a measure of GSH, thioredoxin and thiol-groups of proteins, was increased in the hippocampus of the rats receiving Phe. Two-way ANOVA showed a significant interaction between Phe and creatine ($F(1,22)=5.12$; $P<0.05$) and between Phe and pyruvate ($F(1,22)=4.59$; $P<0.05$); Tukey test showed that Phe group was different from the other groups, indicating that the increase of TRAP induced by Phe was prevented by creatine and pyruvate (Fig. 6).

Discussion

A meta-analysis of the cognitive profile of adolescents and adults with PKU compared with control subjects showed

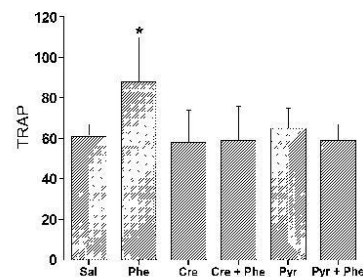


Fig. 3 Effect of pyruvate (Pyr) and creatine (Cre) on the increase of total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) caused by intrahippocampal administration of phenylalanine (Phe). Data are mean \pm SD of 6–8 independent experiments performed in triplicates and are expressed as nmol of Trolox per mg of protein. * $P<0.05$ (Tukey's test)

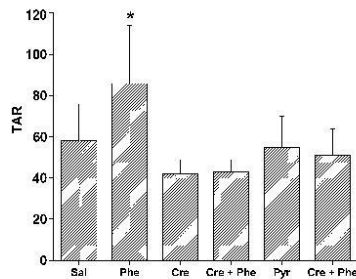


Fig. 4 Effect of pyruvate (Pyr) and creatine (Cre) on the increase of total antioxidant reactivity (TAR) caused by intrahippocampal administration of phenylalanine (Phe). Data are mean \pm SD of 6–8 independent experiments performed in triplicates and are expressed as nmol of Trolox per mg of protein. * $P < 0.05$ (Tukey's test)

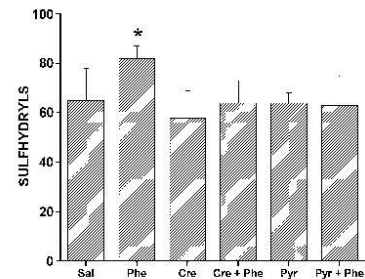


Fig. 6 Effect of pyruvate (Pyr) and creatine (Cre) on the increase of total sulfhydryls caused by intrahippocampal administration of phenylalanine (Phe). Data are mean \pm SD of 6–8 independent experiments performed in triplicates and are expressed as nmol of TNB per mg of protein. * $P < 0.05$ (Tukey's test)

significantly reduced Full Scale IQ, processing speed, motor control and inhibitory abilities, and reduced performance on tests of attention in the PKU groups (Moyle et al. 2007). However, despite the intensive studies, the mechanism by which the aberrant Phe metabolism leads to intellectual impairment is yet to be explained. A better understanding of the biochemistry, genetics and molecular basis of PKU, as well as the need for improved treatment options, has led to the development of new therapeutic strategies. The present work describes that 1 mM intrahippocampal concentrations of Phe, the principal metabolite accumulating in PKU, cause deficit of learning/memory of rats in a behavioral task, and that this deficit can be prevented by pyruvate and creatine.

Animals receiving intrahippocampal infusion of Phe one hour before training presented no habituation as revealed by the lack of reduction of exploratory activity (rearing and crossing responses) along sessions in the open field task, whereas the controls (NaCl-infused animals) showed

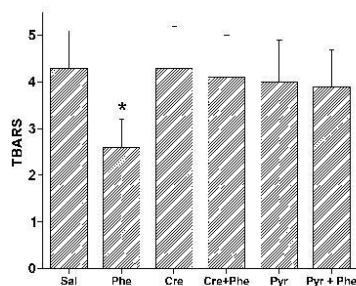


Fig. 5 Effect of pyruvate (Pyr) and creatine (Cre) on the diminution of thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) caused by intrahippocampal administration of phenylalanine (Phe). Data are mean \pm SD of 6–8 independent experiments performed in triplicates and are expressed as nmol of TBA-RS per mg of protein. * $P < 0.05$ (Tukey's test)

normal habituation. In the open field, rats present an exploratory behavior consisting of increased motor activity and rearing responses when first exposed to the box (training session). Memory retention or habituation to a novel environment can be measured by reduction of number of crossing and rearing responses along sessions in this task, in which the hippocampus and amygdala play a crucial role (Denenberg 1969). Since a reduction of number of crossing and rearing responses along sessions in the open field habituation can be interpreted to indicate that animals recognize the environment and remember the previous exposure to this environment (Vasques et al. 2006), and in the present study Phe-treated animals did not show this pattern, it is assumed that this reflects a deficit of learning/memory caused by this amino acid.

When infusion of phenylalanine was preceded in one hour by pre-administration of pyruvate (infused) or creatine (administered i.p.) and the animals were subjected to the open field task, we also showed that there was reduction of the number of crossing and rearing responses along sessions. The significance of this results and their possible relationship to the human condition suggest that pyruvate and creatine could be possible substances capable to prevent Phe-induced behavioral alterations, appointing to possible relation between inhibition of activities of pyruvate kinase and creatine kinase in the behavioral alterations caused by Phe.

Phenylalanine, pyruvate and creatine did not interfere in the number of *fecal boli*, latency to initiate exploration of the novel environment and number of groomings in the open field task, since all groups of animals behaved similarly along the two sessions. Therefore, it seems that alterations of emotionality possibly did not contribute to the deficit of habituation caused by Phe in animals in the open field task as well as the preventive effects presented by pyruvate and creatine.

In the present investigation, intrahippocampal Phe infusion induced increase of total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR), probably caused by the increase of total sulfhydryl compounds, the main component of TRAP and TAR. Diminution of thiobarbituric acid-reactive species (TBARS), indicating that lipid peroxidation was diminished, is probably a consequence of the increase of nonenzymatic defenses. Considering the different methodologies applied, these results are compatible with those of other publications indicating *in vivo* and *in vitro* oxidative stress in hippocampus and also in cerebral cortex of developing rats, and in plasma of PKU patients (Sirtori et al. 2005; Hagen et al. 2002; Sitta et al. 2009; Fernandes et al. 2010). We also observed that the increase of nonenzymatic defenses induced by Phe in hippocampus (TRAP, TAR and total sulfhydryls) and the decrease of TBARS were totally prevented by creatine or pyruvate pretreatment, two potent antioxidants, reinforcing the hypothesis of oxidative stress.

There is only one experiment, *in vitro*, showing the classical markers of oxidative stress in rat hippocampus, as diminution of sulfhydryls, GSH and increase of TBARS, using high concentrations of Phe (2 and 5 mM) in nuclei-free homogenates (Fernandes et al. 2010). In the present work we used one single intrahippocampal injection of Phe, achieving local concentration around 1 mM. It has been reported that low oxidative stress can maintain and even increase cellular GSH content (Shi et al. 1994) and severe oxidative stress may deplete cellular GSH (DeLeve and Kaplowitz 1991). There are several reports showing that oxidative stress increases GSH synthesis (Lu 2009). 4-Hydroxy-2-nonenal (4HNE), a lipid peroxidation product, may act as a mediator for the induction of gene expression for GSH synthesis by oxidants (Liu et al. 1998).

The two main factors that induce GSH synthesis are the increase of cysteine (and cystine) content, and *de novo* synthesis and stabilization of the mRNA of the synthetic enzymes. These two processes cannot occur in nuclei-free homogenate. Therefore, in the experiment of Fernandes et al. (2010), high doses of Phe induced oxidative stress which consumed GSH and increased lipoperoxidation in hippocampus.

The key factors increased by oxidative stress that regulate the cellular level of cysteine other than diet include membrane transport of cysteine, cystine and methionine as well as the transsulfuration pathway (Takada and Bannai 1984).

The activity of GCL (glutamate cysteine ligase) is a major determinant of the rate of GSH synthesis. Transcriptional and post-transcriptional regulation by oxidative stress has been described and post-transcriptional regulation includes mRNA stabilization/destabilization and post-translational modification. Besides, GS (glutathione synthase) is also induced by oxidative stress (Lu 2009). On the other

hand, an increase in gamma GT (γ -glutamyl transpeptidase) activity, induced by oxidative stress, enhances the capacity of cells to utilize extracellular GSH, an important mechanism for cellular adaptation to oxidative stress (Kugelman et al. 1994).

Cysteine and cystine transport occurs rapidly in cell culture and are linear for at least 10 min (Takada and Bannai 1984) and the levels of GSH, in hepatocyte cell culture, doubles after 1 h (Yang et al. 2008), the same time that we used to perform the measures after the hippocampal injection.

Taking into account these reports, our hypothesis is that the Phe injected directly into the hippocampus at 1 mM concentration, rapidly induced oxidative stress, which caused small lipoperoxidation liberating 4HNE, which, together with other free radicals, intermediate the cascade of events that increased GSH levels. In situations of prolonged or higher exposition to Phe, as occur in PKU patients, GSH may be consumed reducing its levels. The preventive effect of creatine and pyruvate, two potent antioxidants, on the alterations observed in oxidative stress markers in the present work argue in favour of our hypothesis. In this light it is conceivable that the slight oxidative stress caused by Phe promotes the prolonged induction of cellular antioxidant defenses we observed herein, and that creatine and pyruvate, rapidly acting as direct antioxidants, prevent the above cellular adaptive responses. Future studies comparing the effects of creatine and pyruvate with those of other established antioxidants in the same experimental system will help to strengthen our hypothesis.

Pyruvate exerts powerful neuroprotective properties by providing simultaneous resistance to oxidative stress and mitochondrial insult. These protective effects are the result of a unique dual property of pyruvate with concurrent ability to serve as an effective neuronal energy substrate for glycolysis and to act as an exceptionally powerful antioxidant (Mazzio and Soliman 2003). Pyruvate strongly counteracted the deep decrease in the neuronal ATP content induced by N-Methyl-D-aspartate (NMDA), indicating that it might protect neurons by rescuing cellular energy charge. The strong accumulation of extracellular glutamate which was found in NMDA-treated cultures was markedly decreased by pyruvate. Thus, pyruvate might also exert its protecting activity by decreasing the delayed accumulation of glutamate which seemed to be neurotoxic after a pre-exposure of neurons to NMDA (Maus et al. 1999). The inhibition of pyruvate kinase by Phe decreases glycolysis and energy production in rats hyperphenylalaninemics (Lütz et al. 2003). It is feasible that early increased brain Phe levels in PKU could reduce brain respiration at a critical time during brain development, suggesting that this inhibition may be one of the mechanisms responsible for

brain damage characteristic of this disease (Rech et al. 2002; Feksa et al. 2002).

Creatine has directly anti-oxidative properties (Lawler et al. 2002). Patients with creatine deficiency syndromes present with mental retardation expressive speech and language delay, and epilepsy. Patients with creatine transporter deficiency may exhibit autistic behavior and mental retardation with learning problems (Hahn et al. 2002). The common denominator of these disorders is the depletion of the brain creatine pool, as demonstrated by *in vivo* proton magnetic resonance spectroscopy (Nasrallah et al. 2010). The effect of acute and chronic HPA on creatine kinase activity in brain cortex of Wistar rats showed that Phe significantly inhibited creatine kinase activity *in vitro* and reduced the enzyme activity *in vivo* (Costabeber et al. 2003). Others studies demonstrated that brain energy metabolism is altered in PKU, as observed by low glucose metabolism by brain of phenylketonuric patients (Hasselbach et al. 1996) and inhibition of respiratory chain in rats (Rech et al. 2002).

Free radicals are produced naturally in organism, but the excess of these compounds caused by their overproduction and/or by diminished antioxidants defenses lead to disturbances in enzymatic systems, membrane transport, DNA function and others, as a result of protein, lipid and DNA oxidative damage (Halliwell and Gutteridge 2007). The brain is more susceptible to oxidative stress for the following reasons: (a) high content of peroxidizable unsaturated fatty acids; (b) high oxygen consumption per unit weight; (c) high content of lipid peroxidation key ingredients (iron and ascorbate); and (d) the scarcity of antioxidant defenses systems (Floyd 1999). Recently, the role of Phe accumulation inducing reactive species production and reducing the antioxidant status has been described in experimental models and in patients with PKU (Martinez-Cruz et al. 2002; Hagen et al. 2002; Artuch et al. 2004; Sirtori et al. 2005; Sitta et al. 2009; Fernandes et al. 2010). It has been also postulated that the protein-restrict diet used to treat PKU may contribute to compromise the antioxidant status of the PKU patients (Artuch et al. 2004; Schulpis et al. 2005). An abnormal behavioral phenotype in mice lacking the B-CK creatine kinase isoform was demonstrated, regarding exploration, habituation, seizure susceptibility and spatial learning. The phenotype in these mice was associated with histological adaptations in the hippocampal mossy fiber field size. Mice lacking the ubiquitous mitochondrial creatine kinase isoform (UbCKmit^{-/-} mice) showed, when subjected to a similar battery of behavioral tasks, diminished open field habituation and slower spatial learning acquisition in the Morris water maze task, but normal sensory or motor functions. These findings suggest a role for mitochondrial CK-mediated high-energy phosphoryl transfer in synaptic signalling in the acoustic signal response network and

hippocampal-dependent learning circuitry of brain (Streijger et al. 2004).

Oral creatine supplementation improves brain performance (Rae et al. 2003). Dietary supplements creatine was accompanied by favorable effects on neurobehavioral functioning, especially memory skills, and improved health and longevity in mice (Bender et al. 2008). Creatine prevents behavioral alterations caused by methylmalonic acid administration into the hippocampus of rats in the open field task (Vasques et al. 2006). Creatine supplementation displayed neuroprotective effects in several animal models of neurological disease, such as Huntington's disease, Parkinson's disease, or amyotrophic lateral sclerosis. All these findings pinpoint to a close correlation between the functional capacity of the creatine kinase/phosphorylcreatine/creatine system and brain function. They also offer a starting-point for novel means of delaying neurodegenerative disease, and/or for strengthening memory function and intellectual capabilities. Therefore, it may be presumed that high energy phosphate levels were restored by chronic treatment with creatine, preventing the Phe-induced open-field task deficit.

In summary, we demonstrate that acute administration of Phe into the hippocampus, which probably mimics the episodes of metabolic decompensation in which acute increases of Phe occur, compromise rat performance in a behavioral task, indicating that this amino acid interferes with the learning/memory processes occurring in this cerebral structure. Even though at present time it is difficult to correlate deficit of performance with biochemical defects, these present results allied to previous studies of our laboratory and to a great body of evidence demonstrating disturbs of brain energy metabolism caused by Phe, strongly suggest that energy deficit provoked by Phe and effect adverse of ROS on tissue metabolism also may be related to the behavioral changes observed in Phe-treated rats. Therefore, it is presumed that energetic substrates with property of scavenging various ROS may be useful as an adjuvant therapy for PKU. In this case, it seems also reasonable to perform more studies to evaluate the possible benefit of pyruvate and creatine supplementation to the diet used by PKU patients.

Acknowledgements We are grateful for the financial support of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net).

References

- Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141–145

- Archer J (1973) Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Ann Behav* 21:205–235
- Artuch R, Colomé C, Sierra C, Brandi N, Lambruschini N, Campistol J, Ugarte D, Vilaseca MA (2004) A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin Biochem* 37:198–203
- Beal MF (2011) Neuroprotective effects of creatine. *Amino Acids* 40:1305–1313
- Bender A, Beckers J, Schneider I, Hölter SM, Haack T, Ruthsatz T, Vogt-Weisenhorn DM, Becker L, Genius J, Rujescu D, Irmeler M, Mjalski T, Mader M, Quintanilla-Martinez L, Fuchs H, Gailus-Durner V, Hrabě de Angelis M, Wurst W, Schmitte J, Klopstock T (2008) Creatine improves health and survival of mice. *Neurobiol Aging* 29:1404–1411
- Berry H, O'Grady D, Perlmutter L, Bofinger M (1979) Intellectual development and academic achievement of children treated early for phenylketonuria. *Dev Med Child Neurol* 21:311–320
- Blau N, Burgard P (2006) Disorders of phenylalanine and tetrahydrobiopterin metabolism. In: Blau N, Leonard J, Hoffmann G, Clarke J (eds) *Physician's guide to the treatment and follow-up of metabolic diseases*. Springer, Heidelberg, pp 25–34
- Burgard P, Schmidt E, Rupp A, Schneider W, Bremer HJ (1996) Intellectual development of the patients of the German Collaborative Study of children treated for phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 155(supplement 1):S33–S38
- Cleary MA, Walter JH, Wraith JE, White F, Tyler K, Jenkins JP (1995) Magnetic resonance imaging in phenylketonuria: reversal of cerebral white matter change. *J Pediatr* 127:251–255
- Costabeber E, Kessler A, Severo Dutra-Filho C, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *Int J Dev Neurosci* 21:111–116
- DeLeve LD, Kaplowitz N (1991) Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 52:287–305
- Denenberg VH (1969) Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci* 159:852–859
- Dobson J, Kushida E, Williamson M, Friedman E (1976) Intellectual performance of 36 phenylketonuria patients and their nonaffected siblings. *Pediatrics* 58:53–58
- Elias PK, Elias MF, Eleftheriou BE (1975) Emotionality, exploratory behavior and locomotion in aging inbred strains of mice. *Gerontologia* 21:46–55
- Ercal N, Aykin-Burns N, Gurer-Orphan H, McDonald JD (2002) Oxidative stress in a phenylketonuria animal model. *Free Radic Biol Med* 32:906–911
- Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA (2001) Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys* 388:261–266
- Feillet F, Agostoni C (2010) Nutritional issues in treating phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 33:659–664
- Feksa LR, Cornelio AR, Rech VC, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CMD (2002) Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in brain cortex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia. *Neurochem Res* 27:947–952
- Feksa LR, Cornelio AR, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CMD (2003) Characterization of the inhibition of pyruvate kinase caused by phenylalanine and phenylpyruvate in rat brain cortex. *Brain Res* 968:199–205
- Fernandes CG, Leipnitz G, Seminotti B, Amaral AU, Zanatta A, Vargas CR, Dutra Filho CS, Wajner M (2010) Experimental evidence that phenylalanine provokes oxidative stress in hippocampus and cerebral cortex of developing rats. *Cell Mol Neurobiol* 30:317–326
- Fishler K, Azen C, Henderson R, Friedman EG, Koch R (1987) Psychoeducational findings among children treated for phenylketonuria. *Am J Ment Defic* 92:65–73
- Fishler K, Azen C, Friedman EG, Koch R (1989) School achievement in treated PKU children. *J Ment Defic Res* 33:493–498
- Floyd RA (1999) Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:236–245
- Frenzel J, Richter J, Eschrich K (2005) Pyruvate protects glucose-deprived muller cells from nitric oxide-induced oxidative stress by radical scavenging. *Glia* 52:276–288
- Gonzalez-Flecha B, Lleusy S, Boveris A (1991) Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radic Biol Med* 10:93–100
- Hagen MEK, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wannmacher CMD, Wyse ATS, Dutra-Filho CS (2002) Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1586:344–352
- Hahn KA, Salomons GS, Tackels-Home D, Wood TC, Taylor HA, Schroer RJ, Lubs HA, Jakobs C, Olson RL, Holden KR, Stevenson RE, Schwartz CE (2002) X-linked mental retardation with seizures and carrier manifestations is caused by a mutation in the creatine-transporter gene (SLC6A8) located in Xq28. *Am J Hum Genet* 70:1349–1356
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, New York
- Hanley WB (2004) Adult phenylketonuria. *Am J Med* 117:590–595
- Hasselbach S, Knudsen GM, Toft PB, Hogh P, Tedeschi E, Holm S, Videbaek C, Henriksen O, Lou HC, Paulson OB (1996) Cerebral glucose metabolism is decreased in white matter changes in patients with phenylketonuria. *Pediatr Res* 40:21–24
- Hegde KR, Kovtun S, Varma SD (2010) Inhibition of glycolysis in the retina by oxidative stress: prevention by pyruvate. *Mol Cell Biochem* 343:101–105
- Izquierdo I, Medina JH (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68:285–316
- Izquierdo LA, Barros DM, Ardenghi PG, Pereira P, Rodrigues C, Choi H et al (2000) Different hippocampal molecular requirements for short-and-long-term retrieval or one-trial avoidance learning. *Behav Brain Res* 111:93–98
- Jagtap JC, Chandele A, Chopde BA, Shastry P (2003) Sodium pyruvate protects against H₂O₂ mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line-SK-N-MC. *J Chem Neuroanat* 26:109–118
- Khuchua ZA, Qin W, Boero J, Cheng J, Payne RM, Saks VA et al (1998) Octamer formation and coupling of cardiac sarcomeric mitochondrial creatine kinase are mediated by charged N-terminal residues. *J Biol Chem* 273:22990–22996
- Koch R, Azen C, Friedman EG, Williamson ML (1984) Paired comparisons between early treated PKU children and their matched sibling controls on intelligence and school achievement test results at eight years of age. *J Inher Metab Dis* 7:86–90
- Kugelman A, Choy HA, Liu R, Shi MM, Gozal E, Forman HJ (1994) gamma-Glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:586–592
- Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S (2002) Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 290:47–52
- Leuzzi V, Pansini M, Sechi E, Chiarotti F, Carducci C, Levi G, Antonozzi I (2004) Executive function impairment in early-treated PKU subjects with normal mental development. *J Inher Metab Dis* 27:115–125
- Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD (1992) Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun* 17:299–311

- Liu R, Gao L, Choi J, Forman HJ (1998) γ -Glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. *Am J Physiol* 275(Lung Cell Mol Physiol):L861–L869
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis-Farr A, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Lu SC (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Mol Asp Med* 30:42–59
- Lütz MG, Feksa LR, Wyse ATS, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CMD (2003) Alanine prevents the in vitro inhibition of glycolysis caused by phenylalanine in brain cortex of rats. *Metab Brain Dis* 18:81–94
- Martinez-Cruz F, Pozo D, Osuna C, Espinar A, Marchante C, Guerrero JM (2002) Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevention by melatonin, vitamin E and vitamin C. *J Neurosci Res* 69:550–558
- Maus M, Marin P, Israel M, Glowinski J, Prémont J (1999) Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 11:3215–3224
- Mazzio E, Soliman KFA (2003) Pyruvic acid cytoprotection against 1-methyl-4-phenylpyridinium, 6-hydroxydopamine and hydrogen peroxide toxicities in vitro. *Neurosci Lett* 337:77–80
- Moyle JJ, Fox AM, Arthur M, Bynevelt M, Burnett JR (2007) Meta-analysis of neuropsychological symptoms of adolescents and adults with PKU. *Neuropsychol Rev* 17:91–101
- Nasrallah F, Feki M, Kaabachi N (2010) Creatine and creatine deficiency syndromes: biochemical and clinical aspects. *Pediatr Neurol* 42:163–171
- O’Gorman E, Beutner G, Dolder M, Koretsky AP, Brdiczka D, Wallimann T (1997) The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 14:253–257
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd edn. Academic, San Diego, p F35
- Rae C, Digney AL, McEwan SR, Bates TC (2003) Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270:2147–2150
- Rech VC, Feksa LR, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CMD (2002) Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex. *Neurochem Res* 27:353–357
- Ribas GS, Sitta A, Wajner M, Vargas CR (2011) Oxidative stress in phenylketonuria: what is the evidence? *Cell Mol Neurobiol* 31:653–662
- Rodrigues NR, Wannmacher CMD, Dutra-Filho CS, Pires RF, Fagan PR, Wajner M (1990) Effect of phenylalanine, *p*-chloro-phenylalanine and α -methylphenylalanine on glucose uptake in vitro by the brain of young rats. *Biochem Soc Trans* 18:419
- Schulpis KH, Tsakiris S, Traeger-Synodinos J, Papassotiropoulos I (2005) Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria. *Clin Biochem* 38:239–242
- Scriver CR, Kaufman S (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic & molecular bases of inherited diseases*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1667–1724
- Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, Battistelli M, Falcieri E, Agostini D, Gioacchini AM, Stocchi V (2006) Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 40:837–849
- Shi MM, Kugelman A, Iwamoto T, Tian L, Forman HJ (1994) Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces γ -glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J Biol Chem* 269(42):26512–26517
- Sirtori LR, Dutra-Filho CS, Fitarelli D, Sitta A, Haeser A, Barschak AG, Wajner M, Coelho DM, Llesuy S, Belló-Klein A, Giugliani R, Deon M, Vargas CR (2005) Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta* 1740:68–73
- Sitta A, Barschak AG, Deon M, Barden AT, Biancini GB, Vargas PR et al (2009) Effect of short and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients. *Int J Dev Neurosci* 27:243–247
- Streijger F, Jost CR, Oerlemans F, Ellenbroek BA, Cools AR, Wieringa B, Van der Zee CE (2004) Mice lacking the Ubckmit isoform of creatine kinase reveal slower spatial learning acquisition, diminished exploration and habituation, and reduced acoustic startle reflex responses. *Mol Cell Biochem* 256–257:305–318
- Takada A, Bannai S (1984) Transport of cystine in isolated rat hepatocytes in primary culture. *J Biol Chem* 259:2441–2445
- Thompson AJ, Tillotson S, Smith I, Kendall B, Moore SG, Brenton DP (1993) Brain MRI changes in phenylketonuria. Association with dietary status. *Brain* 116:811–821
- Vasques V, Brinco F, Viegas CM, Wajner M (2006) Creatine prevents behavioral alterations caused by methylmalonic acid administration into the hippocampus of rats in the open field task. *J Neurol Sci* 244:23–29
- Walsh RN, Cummins RA (1976) The open-field test: a critical review. *Psychol Bull* 83:482–504
- Williams RA, Mamotte CDS, Burnett JR (2008) Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev* 29:31–41
- Wyss M, Schulze A (2002) Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience* 112:243–260
- Xu CJ, Klunk WE, Kanfer JN, Xiong Q, Miller G, Pettigrew JW (1996) Phosphocreatine-dependent glutamate uptake by synaptic vesicles. A comparison with ATP-dependent glutamate uptake. *J Biol Chem* 271:13435–13440
- Yang H, Magilnick N, Xia M, Lu SC (2008) Effects of hepatocyte growth factor on glutathione synthesis, growth, and apoptosis is cell density-dependent. *Exp Cell Res* 314:398–412

PARTE III

DISCUSSÃO

As hiperfenilalaninemias têm sido as doenças mais pesquisadas entre os EIM em todo o mundo. A intensificação destes estudos se justifica pela frequência relativamente alta na população e pela possibilidade de detecção precoce em recém-nascidos com eventual tratamento dietético prevenindo a instalação do quadro clínico. Os modelos animais de EIM, genéticos ou químicos, têm por finalidade mimetizar o distúrbio metabólico em seres humanos, embora nenhum modelo de EIM até hoje desenvolvido tenha sido completamente superponível ao defeito humano específico.

O desenvolvimento do teste de “screening” para PKU (Guthrie & Susi, 1963; Koch, 1997) e o tratamento dietético levaram à prevenção do déficit intelectual em crianças afetadas através do mundo. Além disso, o modelo de PKU tem ainda sido usado como um padrão para derramar luz sobre mais de 200 outros EIM (Applegarth et al., 2000; Raghuveer et al., 2006).

Embora a PAH seja a enzima hepática responsável pelo defeito bioquímico primário na PKU, as principais manifestações desta doença são neurológicas. PAH é regulada por um número de possíveis mecanismos. Depois da refeição proteica, é postulado que o aumento da Phe no “pool” de aminoácidos causa a liberação de glucagon pelo pâncreas (Kaufman, 1986). PAH hepática está sujeita ao controle pelo AMPc (adenosina monofosfato cíclico) proteína quinase dependente e α -adrenérgico estimulado por processos de fosforilação-desfosforilação Ca_{2+} /proteína quinase calmodulina dependente (Richardson et al., 1993). Tem sido postulado que este mecanismo de controle influencia a interação do cofator BH_4 com PAH (Richardson

et al., 1993). Em adição, há evidências de que Phe pode também ser capaz de causar a mudança conformacional em PAH, bem como regular positivamente a atividade do AMPc (Hufton et al., 1995). Estudos de raio-X cristalográfico são consistentes com estes mecanismos (Andersen et al., 2002).

Conforme a base das concentrações sanguíneas de Phe, a deficiência da PAH pode ser classificada em PKU clássica (Phe > 1200 $\mu\text{mol/L}$), moderada PKU (Phe = 600 – 1200 $\mu\text{mol/L}$) e moderada hiperfenilalaninemia (HPA), quando a Phe sanguínea está elevada acima da referência limite, mas abaixo de 600 $\mu\text{mol/L}$ (Hanley, 2004).

Quase a totalidade dos pacientes fenilcetonúricos não tratados apresenta retardo mental grave. A expectativa de vida dos pacientes não tratados é reduzida drasticamente (Scriver & Kaufman, 2001). Os benefícios da dieta de baixa proteína restrita em Phe são claros e incluem: desvio da anormalidade bioquímica (aumento da concentração de Phe), aumento da performance neurológica e psicológica e prevenção do dano neurológico. No entanto, o tratamento dietético não se efetiva sem mudanças tais como: consentimento com a dieta, o requerimento de suporte social e risco de desequilíbrio em nutrientes essenciais (Hanley et al., 2004).

A dieta vegetariana proposta para os fenilcetonúricos (sem carne vermelha, frango, peixe ou qualquer tipo de produto derivado) apresenta benefícios, tais como, baixos níveis de gorduras saturadas, colesterol e proteína animal, dieta rica em carboidratos, fibras, magnésio, potássio, folato, antioxidantes(vitaminas C e E). Vegetarianos fenilcetonúricos, em geral, tem reportado menor Índice de Massa Corporal do que não vegetarianos tanto quanto menores taxas de doença isquêmica cardíaca, menores níveis de colesterol, menor pressão sanguínea, menores taxas de hipertensão, diabetes tipo 2 , câncer de cólon e de próstata. No entanto, esta dieta também apresenta desvantagens. Muitos dados científicos apontam para a

deficiência de nutrientes importantes na dieta vegetariana, tais como: proteína, ferro, zinco, cálcio, selênio, vitamina A, B2 (riboflavina), B12 e D e ácidos graxos ômega-3. Em alguns casos, o uso de alimentos fortalecidos ou suplementos pode ser útil em encontro dos níveis recomendados para os nutrientes individuais (American Dietetic Association, 2003).

Investigações neuropatológicas em pacientes fenilcetonúricos mostraram baixo peso cerebral, redução na formação de mielina com lesões na substância branca, menor desenvolvimento das ramificações dendríticas e menor síntese de dopamina, norepinefrina e serotonina (Huttenlocher, 2000). Foi postulado que o menor peso cerebral destes pacientes resulta da reduzida proliferação de neuroblastos causada pela estimulação induzida por Phe de receptores proliferadores de peroxissomos ativados por receptores gama (Schumacher et al., 2008).

Também tem sido demonstrado que a Phe ou o cofator BH₄ interfere em vários sistemas enzimáticos, tais como tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase, influenciando na síntese de neurotransmissores (Joseph & Dyer, 2003), bem como com a hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-Coa) redutase resultando no prejuízo da síntese de colesterol (Schefer et al., 2000). A alta concentração de Phe reduziu a transmissão sináptica glutamatérgica e glutaminérgica (Glushakov et al., 2003, 2005), sinaptogênese e a atividade da piruvato quinase (PK) (Pietz et al., 2003; Hörster et al., 2006). Outros estudos demonstraram que o metabolismo energético está alterado na PKU, como observado pela baixa do metabolismo da glicose pelo cérebro de pacientes fenilcetonúricos (Hasselbalch et al., 1996; Rech et al., 2002; Costabeber et al., 2003).

Espécies reativas são produzidos naturalmente no organismo, mas o excesso destes componentes causado pela sua superprodução e/ou pela diminuição das defesas antioxidantes leva a distúrbios no sistema enzimático, transporte de

membrana, funções do DNA e outros, como um resultado do dano oxidativo de proteínas, lipídeos e DNA (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Acredita-se que os radicais livres e outras espécies reativas do oxigênio/nitrogênio/clorina contribuem para o desenvolvimento de diversas doenças relacionadas à idade, e talvez, ao próprio processo do envelhecimento (Halliwell & Gutteridge, 1999; Sohal et al., 2002). Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, as espécies reativas podem promover lipoperoxidação, podem causar a oxidação de proteínas de baixa densidade (LDL), podem reagir com proteínas levando a sua inativação e podem também reagir com DNA e RNA (ácido ribonucleico) levando a mutações somáticas e a distúrbios de transcrição (Delanty & Dichter, 1998).

O cérebro é um órgão bastante susceptível ao estresse oxidativo, por consumir grandes quantidades de oxigênio. Além disso, o metabolismo de alguns dos principais neurotransmissores, como glutamato e dopamina, gera ERO capazes de consumir as defesas antioxidantes, que são baixas em muitas regiões do cérebro. Ainda, as membranas neuronais contém níveis elevados de lipídeos polinsaturados capazes de sofrer peroxidação lipídica, além de ferro, também susceptível ao estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O estresse oxidativo também vem sendo observado em alguns erros inatos do metabolismo intermediário, incluindo acidemias orgânicas (Moyano et al., 1997; Colomé et al., 2000; Fontella et al., 2000; Kölker et al., 2001a, b; de Oliveira Marques et al., 2003; Figuera et al., 2003; Latini et al., 2003a, b; Wajner et al., 2004) e outras desordens metabólicas inatas, tais como tirosinemia tipo I, síndrome de Rett, adrenoleucodistrofia ligada ao X, doença de Lesh-Nyhan, defeitos do ciclo da uréia e homocistinúria (Bird et al., 1995; Sierra et al., 2001; Streck et al., 2001, 2003; Vargas et al., 2004).

Embora a causa do estresse oxidativo nos EIM ainda não seja inteiramente compreendida, imagina-se que possa ser devida ao acúmulo de metabólitos tóxicos, que levariam a uma produção aumentada de espécies reativas. Além, disso, dietas restritas, aplicadas em muitos pacientes com EIM, podem também alterar o status antioxidante do organismo (Artuch et al., 2004; Van Backel et al., 2000) o mesmo verificou-se em pacientes tratados com dieta pobre em Phe nos quais avaliou-se o status antioxidante (Schulpis et al., 2003; Schulpis et al., 2005).

Estudos em vários modelos de HPA e PKU têm demonstrado estresse oxidativo. Evidências da alteração de vários parâmetros de produção de radicais livres e atividade antioxidante pelo acúmulo de Phe levaram diversos pesquisadores a presumir que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia do dano tecidual dos pacientes com PKU, explicando, no mínimo em parte, a cascata de disfunções e anormalidades cerebrais com retardo mental observadas nesta doença (Colomé et al., 2003; Artuch et al., 2004; Hagen et al., 2002; Ercal et al., 2002; Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2006; Martinez-Cruz et al., 2002; Sitta et al., 2009; Moraes et al., 2010; Fernandes et al., 2010).

1. A administração de fenilalanina alterou a aprendizagem e memorização dos animais submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia quanto às tarefas de habituação no campo aberto. A pré-administração de piruvato ou creatina preveniu os efeitos da fenilalanina sobre a atividade exploratória.

O maior efeito clínico na PKU está relacionado ao desenvolvimento cerebral e à função cognitiva. Embora o efeito das mutações da PAH sobre a função da enzima hepática e a resultante interrupção da homeostase tenha sido bem descrita (Kayaalp et al., 1997) o mecanismo pelo qual a alta concentração de Phe resulta em prejuízo cognitivo está ainda sendo clarificado.

O marcador visto na neuropatologia em pacientes fenilcetonúricos tratados e não tratados parece envolver hipomielinização e desmielinização (Dyer, 1999). Vários fatores têm sido propostos como contribuidores para a neurotoxicidade na PKU, incluindo: deficiência de Tyr, o efeito da elevada concentração de Phe sobre o transporte de outros metabólitos através da barreira hemato-encefálica, e os efeitos de uma potencial e relativa deficiência de Tyr sobre a neuroquímica e metabolismo (Scriver & Kaufman, 2001). No entanto, há observações que não suportam esta sugestão: a) a restrição de Phe sozinha poderia não prevenir o desenvolvimento do fenótipo, e b) a suplementação de Tyr sozinha no período pós-natal não previne os defeitos do desenvolvimento e não melhora as funções neuropsicológicas (Williams et al., 2008).

O aprendizado é quantificado experimentalmente como a probabilidade com que um organismo responderá, diferentemente, ao mesmo estímulo após a sua repetição. Esta alteração está baseada na memória daquilo que foi aprendido pelo

organismo após uma sessão de treino que é sua exposição a uma novidade ou a um acontecimento (Agranoff, 1998).

Em estudos anteriores, foi investigada a influência da administração intra-hipocampal de substâncias sobre o comportamento animal em tarefas de campo aberto (open field task). Também tem sido investigado o envolvimento de substratos energéticos como antagonistas das alterações do comportamento animal induzidas por tais substâncias (Vasques et al., 2006).

No presente estudo, a alta concentração de Phe no hipocampo, que provavelmente mimetiza os episódios de descompensação metabólica no qual o aumento dramático de Phe no cérebro ocorre, compromete a performance nos testes de comportamento, indicando que este aminoácido interfere com o processo de aprendizagem/memória que envolve esta estrutura cerebral. Embora até o momento haja dificuldade em relacionar o déficit de desempenho com o defeito bioquímico, estes resultados aliados aos estudos prévios do nosso laboratório e um grande corpo de evidências demonstrando distúrbios do metabolismo energético cerebral causados pela Phe, sugerem fortemente que o déficit de energia provocado pela Phe e efeitos adversos de espécies reativas sobre o metabolismo dos tecidos também podem estar relacionados às mudanças de comportamento observadas em ratos tratados com Phe.

Tem sido demonstrado que o metabolismo da glicose está diminuído nos cérebros dos pacientes com PKU (Hasselbach et al., 1996), que a Phe inibe a captação de glicose e a produção de energia em cérebros de ratos (Rodrigues et al., 1990; Lütz et al., 2003) e que a inibição da piruvato quinase (PK) pelo aumento dos níveis de Phe no cérebro poderia reduzir a respiração celular em um momento crítico para o desenvolvimento do cérebro, sugerindo que a inibição da PK possa ser

um dos mecanismos responsáveis pelo dano cerebral característico desta doença (Feksa et al., 2002; 2003). O piruvato tem sido considerado um forte antioxidante e neuroprotetor (Jagtap et al., 2003; Frenzel et al., 2005; Hedge et al., 2010). O etil piruvato, um derivado simples do piruvato, é também um “scavenger” (sequestrador) de ERO, mas parece exercer também efeitos farmacológicos, tais como supressão da inflamação (Kao et al., 2010). O piruvato poderia também exercer sua atividade protetora por decréscimo e/ou retardo do acúmulo do glutamato. Uma contínua liberação de glutamato contribui para a perda neuronal na isquemia cerebral. A privação de glicose celular que ocorre neste processo patológico aumentou a neurotoxicidade induzida por N-metil-D-aspartato (NMDA). O acúmulo de glutamato extracelular parece ser neurotóxico somente depois da pré-exposição de neurônios a NMDA e este acúmulo foi marcadamente diminuído pelo piruvato em cultura de células tratadas com NMDA (Maus et al., 1999).

Estudos prévios demonstraram que a Phe inibiu a atividade da creatina quinase (CK) (Costabeber et al., 2003) que é principalmente responsável pela síntese de fosfocreatina na mitocôndria a partir de ATP e fosforiltransferência da mitocôndria para o citosol, onde fosforila o ADP (Khuchua et al., 1998; Schlattner & Wallimann, 2000). Muitos achados apontam para uma íntima correlação entre a capacidade funcional do sistema creatina quinase/fosfocreatina/creatina e função cerebral. A suplementação ou administração de creatina mostrou efeitos neuroprotetores em diversos modelos animais em condições neurodegenerativas e de doenças neurológicas (Rae et al., 2003; Bender et al., 2008; Vasques et al., 2006; Nasrallah et al., 2010) tais como doença de Huntington, doença de Parkinson ou esclerose múltipla amiotrófica. A biossíntese de creatina tem sido postulada como um dos maiores fatores da concentração de homocisteína no plasma, a qual tem sido identificada como um importante fator de risco independente para doença aterosclerótica. Diminuindo a produção de homocisteína, a suplementação oral de

creatina deve, então, também diminuir o risco do desenvolvimento, por exemplo, de doença cardíaca coronária ou doença cérebro vascular (Wyss & Schulze, 2002).

Quando o tratamento com Phe (1mM) foi precedido em uma hora pela pré-administração de piruvato (1mM infundido no hipocampo) ou creatina (0,4 mg/g por dia por 5 dias administrada i.p.), a performance dos animais nos testes de comportamento ao longo das sessões demonstrou que ambos, piruvato e creatina, previniram os efeitos da fenilalanina sobre a atividade exploratória nas tarefas de habituação no campo aberto, tendo havido redução dos números de “crossings” e “rearings” ao longo das sessões, similar ao ocorrido com o grupo controle. O significado destes resultados e sua possível relação com a condição humana sugere que piruvato e creatina poderiam vir a ser substâncias capazes de prevenir alterações do comportamento, apontando para uma possível relação entre a inibição das atividades da PK e da CK nas alterações de comportamento na PKU.

O piruvato e a creatina, isoladamente, não exerceram efeito sobre os animais na tarefa de campo aberto, mas previniram os efeitos da fenilalanina sobre a atividade exploratória. A fenilalanina, o piruvato e a creatina não tiveram efeito sobre a emocionalidade dos animais. “Crossings” e “rearings” são considerados comportamento exploratório em tarefas de habituação e número de “groomings” e de bolos fecais e tempo de latência para iniciar a exploração do meio ambiente ao longo das sessões são considerados expressões da emocionalidade (Archer, 1973; Elias et al., 1975; Ohl et al., 2001).

Portanto, é possível que parte dos efeitos preventivos da creatina e do piruvato decorram da suplementação das rotas metabólicas reduzidas pela inibição parcial da creatina quinase e da piruvato quinase. Por outro lado, piruvato e creatina são potentes antioxidantes. O piruvato é um substrato energético resultante da atividade da PK (Smith et al., 2007) ao qual é atribuída a inibição do estresse

oxidativo por suas propriedades de “scavenger” de vários ERO e conseqüentemente inibindo muitas das aparentes reações tóxicas tais como a lipoperoxidação lipídica e a perda de tióis teciduais. É ainda especulado que ERO terão um efeito adverso sobre o metabolismo dos tecidos (Hegde et al., 2010). O estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia dos tecidos atingidos pela PKU (Sirtori et al., 2005). Desta maneira, piruvato, assim como creatina, previne alterações de comportamento induzidas por Phe nas tarefas de habituação no campo aberto. Neste caso, é presumido que substratos energéticos, inclusive com propriedades de “scavenger” de vários ERO com efeitos adversos sobre o metabolismo, além da usual medida, poderiam ser úteis como uma terapia adjuvante na PKU.

2. A administração intra-hipocampal de fenilalanina nos animais provocou diminuição de TBARS e aumento das sulfidrilas totais, TRAP e TAR; a pré-administração de piruvato ou creatina preveniu os efeitos da fenilalanina.

O estresse oxidativo tem sido observado em alguns erros inatos do metabolismo intermediário devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos levando ao excesso da produção de radicais livres (Colomé et al., 2000). Dietas restritas também alteram o status antioxidante em alguns erros inatos do metabolismo (Artuch et al., 2004; Van Backel et al., 2000; Sierra et al., 1998; Schulpis et al., 2005). O comportamento do acúmulo de Phe induzindo a produção de espécies reativas e reduzindo o status antioxidante tem sido descrito em modelos experimentais e pacientes com PKU (Colomé et al., 2003; Artuch et al., 2004; Hagen et al., 2002; Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2006, 2009; Martinez-Cruz et al., 2002; Ercal et al., 2002; Moraes et al., 2010; Fernandes et al., 2010). O efeito “in vitro” da Phe, em concentrações similares às aquelas encontradas no cérebro de pacientes com PKU, sobre a peroxidação lipídica (aumento dos níveis de TBA-RS) e do dano oxidativo às proteínas (oxidação de sulfidrilas) no hipocampo foram verificadas e ainda o dano oxidativo provocado por Phe foi totalmente prevenido pelos “scavengers” de radicais livres α -tocoferol e melatonina. Estes efeitos foram provavelmente mediados por ERO (Fernandes et al., 2010).

A medida de alguns parâmetros de estresse oxidativo visou investigar se este processo poderia estar envolvido no comprometimento do desempenho dos animais na tarefa de campo aberto.

Existem evidências crescentes de que o estresse oxidativo desempenha um importante papel em várias condições patológicas, como neoplasias, diabetes,

aterosclerose, doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, crises convulsivas, desmielinização, esclerose lateral amiotrófica, inflamações crônicas e outras doenças neurológicas (Reznick & Parker, 1993; Przedborski et al., 1996; Ben-Menachem et al., 2000; Halliwell & Gutteridge, 1996; Pérez-Severiano et al., 2000; Bogdanov et al., 2001; Karelson et al., 2001; Méndez-Alvarez et al., 2001; Behl & Moosmann, 2002a, b; Stoy et al., 2005; Berg & Youdim, 2006; Mancuso et al., 2007).

O cérebro é mais susceptível ao estresse oxidativo pelas seguintes razões: (a) alto conteúdo de ácidos graxos insaturados peroxidáveis; (b) alto consumo de oxigênio por unidade de peso; (c) alto conteúdo de ferro e ascorbato; e (d) escassez de sistemas de defesa antioxidantes (Floyd, 1999).

Todos os resultados foram compatíveis com o aumento dos parâmetros antioxidantes. TRAP, que é uma medida da concentração de substâncias antioxidantes não enzimáticas, principalmente GSH e tioredoxina, aumentou no hipocampo dos ratos que receberam Phe. A análise estatística mostrou que o aumento de TRAP induzido por Phe foi prevenido pela creatina e pelo piruvato.

Quando foi medida a qualidade das substâncias antioxidantes não enzimáticas, pelo indicador TAR, que é a medida da qualidade das substâncias antioxidantes não enzimáticas, este também aumentou pela administração de Phe. Novamente, a análise estatística mostrou que o aumento de TAR induzido por Phe foi prevenido pela creatina e pelo piruvato.

TBA-RS, que é uma medida de peroxidação, diminuiu pela administração de Phe. A análise estatística indicou que a diminuição de TBA-RS foi prevenida por creatina e piruvato.

A medida dos grupos sulfidrilas totais, que é principalmente uma medida de GSH, tioredoxina e grupos tióis de proteínas, aumentou no hipocampo dos ratos que

receberam Phe. Conforme a análise estatística, o aumento de sulfidrilas totais induzido por Phe foi prevenido por creatina e piruvato.

O efeito preventivo da creatina e do piruvato, dois antioxidantes, é similar a outro estudo mostrando que o estresse oxidativo observado em ratos fenilcetonúricos foi prevenido pelos “scavengers” melatonina, α -tocoferol e ácido ascórbico (Martinez-Cruz et al., 2002). Melatonina e α -tocoferol carregam preferencialmente radicais peróxil e hidroxil, respectivamente, e previnem completamente o dano oxidativo lipídico, o que pode sugerir que estas espécies do oxigênio estiveram principalmente envolvidas nos efeitos da Phe. Desde que a combinação de SOD e CAT e a óxido nítrico sintase (NOS) inibidora da L-NAME (L-nitro-arginina metil ester) não reduziu a peroxidação lipídica, pode ser concluído que os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, assim como óxido nítrico (NO), não estiveram envolvidos neste efeito (Fernandes et al., 2010). Considerando que Phe induz a liberação de radicais livres “in vitro” e “in vivo”, é possível que o aumento das defesas antioxidantes não enzimáticas depois de uma única injeção intra-hipocampal deva ser devido a uma imediata resposta para este estresse oxidativo.

O piruvato, como já reportamos, tem sido considerado um forte antioxidante e neuroprotetor e a creatina tem propriedades diretamente antioxidativas (Lawler et al., 2002).

Os efeitos protetores por prover simultânea resistência ao estresse oxidativo e insulto mitocondrial são resultado de uma única dupla propriedade do ácido pirúvico com concomitante habilidade para servir como um efetivo substrato energético para a glicólise e para agir como um excepcionalmente forte antioxidante (Mazzio et al., 2003).

A defesa das células de Muller, que são as principais células gliais na retina de mamíferos e estão predispostas a servir como protetores metabólicos de outras células de retina contra o estresse oxidativo, depende fortemente do suprimento de

glicose. Piruvato (2mM) foi capaz de aumentar a viabilidade celular 1,6 vezes predominantemente pela redução da necrose celular. Sob privação de glicose, piruvato e outros α -cetoácidos protegeram as células de Muller por carreamento de radicais. Isto poderia estar mostrando que o piruvato não age pelo aumento do status energético das células de Muller, mas carreando o excesso de radicais livres (Frenzel et al., 2005). A geração intraocular de ERO com conseqüente estresse oxidativo tem sido mostrada como sendo um significativo fator de patogênese de muitas doenças que atingem a visão, tais como catarata e degeneração da retina. A inibição da glicólise induzida por estresse oxidativo foi prevenida por piruvato (Hegde et al., 2010) .

O efeito protetor do piruvato de sódio, um “scavenger” de radicais livres, contra o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) induzindo apoptose em células da linhagem - SK-NMC de neuroblastoma humano foi investigado. A poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) participa de um comportamento pivô na manutenção da integridade genômica. Durante a apoptose, muitas proteínas sofrem degradação por caspases. Piruvato de sódio inibiu a atividade da caspase 3, clivagem da PARP e quebra do potencial de membrana mitocondrial. Estes dados sugerem que o piruvato de sódio protege contra danos neuronais causados por H_2O_2 (Jagtap et al., 2003).

A creatina exerce diretamente propriedades antioxidantes (Lawler et al., 2002). Pacientes com síndrome de deficiência de creatina apresentam um expressivo retardo mental, da fala e da linguagem, e epilepsia. Pacientes com deficiência de guanidinoacetato metiltransferase (tratável com suplementação oral de creatina) ou deficiência de transporte de creatina podem exibir comportamento autista. O denominador comum destas desordens é a depleção do “pool” de creatina no cérebro, como demonstrado por espectroscopia de prótons por ressonância magnética “in vivo” (Nasrallah et al., 2010). Uma bateria de testes de comportamento apresentando diminuída habituação ao campo aberto e menor aquisição de

aprendizagem espacial no labirinto aquático de Morris, mas funções motoras e sensoriais normais, sugere uma função para a transferência da alta energia fosforil mediada pela CK mitocondrial em sinalização sináptica no complexo de resposta do sinal acústico e circuito de aprendizagem hipocampal dependente (Streijger et al., 2004).

O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes totais e as espécies reativas geradas no tecido (Halliwell & Gutteridge, 2007). A prevenção dos efeitos observados de Phe pelo pré-tratamento com piruvato e creatina reforça a hipótese de que o primeiro contato do hipocampo com Phe provoca a formação destas espécies reativas, induzindo o aumento de defesas antioxidantes. É possível que a formação contínua destas espécies reativas em condições de persistente hiperfenilalaninemia resulte no desequilíbrio entre as mesmas e as defesas antioxidantes, gerando dano oxidativo. Considerando que o tratamento atual dos pacientes com PKU consiste numa dieta restrita em Phe e restrita em proteína, a qual é baixa em antioxidantes (Van Backel et al., 2000; Schulpis et al., 2005), é possível que os substratos energéticos e antioxidantes piruvato e/ou creatina possam ser potencialmente úteis como agentes coadjuvantes para a presente terapia dietética.

CONCLUSÕES

Nos animais submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia, a fenilalanina inibiu a aprendizagem e memorização dos mesmos quanto à tarefa de habituação no campo aberto, pois reduziu significativamente a atividade exploratória nos testes em relação aos treinos.

O piruvato e a creatina, isoladamente, não exerceram efeito sobre os animais na tarefa de campo aberto, mas preveniram os efeitos da fenilalanina sobre a atividade exploratória.

A fenilalanina, o piruvato e a creatina não tiveram efeito sobre a emocionalidade dos animais.

A fenilalanina provocou o aumento de TRAP, que é uma medida da concentração de substâncias antioxidantes não enzimáticas, principalmente GSH e tioredoxina, e TAR, que é a medida da qualidade das substâncias antioxidantes não enzimáticas.

A fenilalanina provocou o aumento das sulfidrilas totais, que compreendem principalmente GSH, tioredoxina e grupos tióis de proteínas.

A fenilalanina diminuiu a formação de TBA-RS, que é uma medida de lipoperoxidação.

O piruvato e a creatina, isoladamente, não exerceram efeito sobre os parâmetros de estresse oxidativo, mas preveniram as alterações provocadas pela fenilalanina sobre tais determinações.

O piruvato e a creatina são suplementos dietéticos a serem considerados juntamente com a dieta (pobre em fenilalanina), pelas suas propriedades

neuroprotetoras como substâncias energéticas e antioxidantes, dependendo de mais estudos.

Os efeitos da fenilalanina no estresse oxidativo podem representar um caminho para o entendimento do mecanismo patológico que liga o defeito bioquímico primário ao maior efeito clínico na PKU, relacionado ao desenvolvimento cerebral e à função cognitiva.

PERSPECTIVAS

Usando o modelo de estudo presente:

Investigar os parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo de ratos submetidos à administração hipocampal de Phe ao longo de um período de tempo entre 15 e 180 min com o objetivo de testar a hipótese de que há inicialmente produção de espécies reativas seguidos pelo aumento das defesas antioxidantes.

Investigar os parâmetros da rede de fosforiltransferência, tais como as atividades da creatina quinase, piruvato quinase, adenilato quinase, nucleotídeo difosfo quinase, 3-fosfoglicerato quinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase e cadeia respiratória para avaliar a homeostasia energética cerebral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agranoff, B.W. (1998). Learning and Memory. Em: Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects. 6^a ed. Lippincott-Raven Publishers, 1027 – 1052.
- American Dietetic Association, Dietitians of Canada (2003). Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: vegetarian diets. *Can J Diet Pract Res* 64: 62 – 81.
- Andersen, O. A.; Flatmark, T.; Hough, E. (2002). Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation. *J Mol Biol.* 320: 1095 - 108.
- Applegarth D.A.; Toone J.R.; Lowry R.B. (2000). Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969- 1996. *Pediatrics* 105: e10.
- Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Ann Behav* 21: 205 – 235.
- Artuch, R.; Colomé, C.; Sierra, C.; Brandi, N.; Lambruschini, N.; Campistol, J.; Ugarte, D.; Vilaseca, M.A. (2004). A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin. Biochem.* 37: 198 – 203.

- Au Louis, N.C.; Niquet, J.; Ben-Ari, Y.; Represa, A. (1997). Cellular Plasticity. Em: Epilepsy: a comprehensive textbook. Lippincott-Raven Publishers, 387 – 396.
- Australian Society for Inborn Errors of Metabolism. (2005). PKU handbook. Dennison, B. (ed.) Alexandra, Australia: Human Genetics Society of Australasia.
- Baddeley, A. (1997.) Human Memory, Teory and Praticce. Boston: Allyn & Bacon.
- Behl, C. & Moosmann, B. (2002a). Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. Free Radic Biol Med 33: 182 – 191.
- Behl, C. & Moosmann, B. (2002b). Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. Biol Chem 383: 521 – 536.
- Bender, A.; Beckers, J.; Schneider, I.; Hölter, S.M.; Haack, T.; Ruthsatz, T.; Vogt-Weisenhorn, D.M.; Becker, L.; Genius, J.; Rujescu, D.; Irmeler, M.; Mijalski, T.; Mader, M.; Quintanilla-Martinez, L.; Fuchs, H.; Gailus-Durner, V.; Hrabé de Angelis, M.; Wurst, W.; Schmidte, J.; Klopstock, T. (2008). Creatine improves health and survival of mice. Neurobiology of Aging 29: 1404 –1411.
- Ben-Menachem, E.; Killerman, R.; Markleind, S. (2000). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. Epilepsy Res. 40: 29 – 33.

- Benoit, S.C.; Davidson, T.L.; Chan, K.H.; Trigilio, T.; Jarrard, L.E. (1999). Pavlovian conditioning and extinction of context cues and punctuate CSs in rats with ibotenate lesions of the hippocampus. *Psychobiology* 27: 26 – 39.
- Berg, D.; Youdim, M.B. (2006). Role of iron in neurodegenerative disorders. *Top Magn Reson Imaging* 17: 5 – 17.
- Bernabeu, R.; Bevilaqua, L.; Ardenghi, P.; Bromberg, E.; Schmitz, P.; Bianchin, M.; Izquierdo, I.; Medina, J. H. (1997). Involvement of hippocampal D1/D5 receptor—cAMP signaling pathways in a late memory consolidation phase of an aversively-motivated task in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7041–7046.
- Bickel, H.; Gerrard, J.; Hickmans, E.M. (1953). Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet*. 265: 812 - 3.
- Bird, S.; Miller, N.J.; Collins, J.E.; Rice-Evans, C.A. (1995). Plasma antioxidant capacity in two cases of tyrosinemia type 1: one case treated with NTBC. *J Inherit Metab Dis* 18: 123 – 126.
- Blau, N.; Burgard, P. (2006). Disorders of Phenylalanine and Tetrahydrobiopterin Metabolism. Em: Blau, N.; Leonard, J.; Hoffmann, G.; Clarke, J. (eds.) *Physician's Guide to the Treatment and Follow-up of Metabolic Diseases*. Heidelberg: Springer p. 25 - 34.
- Bogdanov; M.B.; Andreassen, O.A.; Dedeoglu, A.; Ferrante, R.J.; Beal, M.F. (2001). Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 79: 1246 – 1249.

- Bonnefoy, M.; Dray, J.; Kostka, T. (2002). Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med* 31(25): 1174 – 1184.
- Bouton, M.E. (2002). Context, ambiguity and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biological Psychiatry* 52: 976 – 986.
- Boveris, A. & Chance, B. (1973). Mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 134: 707 – 716.
- Cammarota, M. (1998). Un Studio Neuroquimico sobre la consolidación de memórias. Trabajo de Tesis para optar al Título de doctor de La universidad de Buenos Aires. 104p.
- Cammarota, M.; Bevilaqua, L. R.; Ardenghi, P.; Paratcha, G.; Levi de Stein, M.; Izquierdo, I.; Medina, J. H. (2000). Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: Abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 76: 36 – 46.
- Chan, K.H.; Morell, J.R.; Jarrard, L.E.; Davidson, T.L. (2001). Reconsideration of the role of the hippocampus in learned inhibition. *Behavioral Brain Research*, 119: 111 – 130.
- Clarke, J.T.R. (1990). A clinical guide to inherited metabolic diseases. Cambridge: Cambridge University Press.

Colomé, C.; Artuch, R.; Vilaseca, M.A.; Sierra, C.; Brandi, N.; Lambruschini, N. et al. (2003). Lipophilic antioxidants in patients with phenylketonuria. *Am J Clin Nutr.* 13: 2561 – 4.

Colomé, C.; Sierra, C.; Vilaseca, M.A. (2000). Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? *Med. Clin.* 115: 111 – 117.

Cooper, G. (ed) (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2ª edição. Sunderland. Sinauer Associates.

Costabeber, E.; Kessler, A.; Dutra-Filho, C.S.; Wyse, A.T.S.; Wajner, M.; Wannmacher, C.M.D. (2003). Hyperphenilalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *Int J Dev Neurosci.* 21: 111 – 116.

Cotman, C.W. (1998). Axonal Sprouting. Em: *Basic neurochemistry molecular cellular and medical aspects*. 6ª ed. Lippincott-Raven Publishers 589 – 612.

de Oliveira Marques, F.; Hagen, M.E.; Pederzolli, C.D. (2003). Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. *Brain Res* 964: 153 – 158.

Delanty, M. & Dichter, N.A. (1998). Oxidative injury in nervous system. *Acta Neurol Scand.* 98: 145 – 153.

Douglas, R.J. (1967). The hippocampus and behavior. *Psychological Bolletin* 67 : 416 – 422.

Dudai, Y. (2003). Neurobiology. Fear thou not. *Nature* 421: 325 – 327.

Dyer, C.A. (1999). Pathophysiology of phenylketonuria. *Ment Retard Dev Disab Res Rev* 5: 104 - 12.

Eichenbaun, H. (1996). Is the rodent hippocampus just for 'place'? *Current Opinion in Neurobiology* 6: 187 – 195.

Elias, P.K.; Elias, M.F.; Eleftheriou, B.E. (1975). Emotionality, exploratory behavior and locomotion in aging inbred strains of mice. *Gerontologia* 21: 46 – 55.

Ercal, N.; Aykin-Burns, N.; Gurer-Orphan, H.; McDonald, J.D. (2002). Oxidative stress in a phenylketonuria animal model. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 906 -911.

Erlandsen, H. & Stevens, R.C. (1999). The structural basis of phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism.* 68: 103-25.

Feillet, F. & Agostoni, C. (2010). Nutritional issues in treating phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* DOI: 10.1007/s10545-010-9043-4

Feksa, L.R.; Cornelio, A.R.; Dutra-Filho, C.S.; Wyse, A.T.S.; Wajner, M., Wannmacher, C.M.D. (2003). Characterization of the inhibition of pyruvate kinase caused by phenylalanine and phenylpyruvate in rat brain cortex. *Brain Research* 968: 199 – 205.

Feksa, L.R.; Cornelio, A.R.; Rech, V.C.; Dutra-Filho, C.S.; Wyse, A.T.S.; Wajner, M.; Wannmacher, C.M.D. (2002). Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase

activity in brain cortex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia. *Neurochem Res* 27(9): 947 - 52.

Fernandes, C.G.; Leipnitz, G.; Seminotti, B.; Amaral, A.U.; Zanatta, A.; Vargas, C.R.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M. (2010). Experimental Evidence that Phenylalanine Provokes Oxidative Stress in Hippocampus and Cerebral Cortex of Developing Rats. *Cell Mol Neurobiol.* 30: 317 – 326.

Figuera, M.R.; Bonini, J.S.; de Oliveira, T.G.; Frussa-Filho, R.; Dutra-Filho, C.S.; Rubin, M.A.; Mello, C.F. (2003). GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intraestriatal injection of methylmalonic acid. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 465 – 473.

Floyd, R. A. (1999). Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med.* 222: 236 – 245.

Fois, A.; Rosemberg, C.; Gibb, F.A. (1955). The electroencephalogram in phenylpyruvic oligofrenia. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 7: 569 – 578.

Folling I. (1990). The discovery of phenylketonuria. *Acta Pediatr Suppl.* 407:.4 -.10.

Fontella, F.U.; Pulrolnik, V.; Gassen, E.; Wannmacher, C.M.D.; Klein, A.B.; Wajner, M.; Dutra-Filho, C.S. (2000). Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport* 11: 541 – 544.

- Fulton, T.R.; Triano, T.; Rabe, A.; Loo, Y.H. (1980). Phenylacetato and enduring behavioral deficit in experimental phenylketonuria. *Life Sciences* 27: 1271 – 1281.
- Frenzel, J.; Richter, J.; Eschrich, K. (2005). Pyruvate Protects Glucose-Deprived Muller Cells From Nitric Oxide-Induced Oxidative Stress by Radical Scavenging. *Glia* 52: 276 – 288.
- Gimenez-Sanchez, G.; Childs, B.; Valle, D. (2001). The effect of mendelian disease on human health. Em: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (eds) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8ª edição, New York, McGraw-Hill.
- Giugliani, R.; Coelho, J. (1997). Diagnóstico de erros inatos do metabolismo na América Latina. *Revista Brasileira de Genética* 20: 147 – 154.
- Glushakov, A.V.; Dennis, D.M.; Summers, C.; Seubert, C.N.; Martynyuk, A.E. (2003). L-Phenylalanine selectively depress currents at glutamatergic excitatory synapses. *J Neurosci Res.* 72: 116 – 124.
- Glushakov, A.V.; Glushakova, O.; Varshney, M.; Bajpai, L.K.; Summers, C.; Laipis, P.J.; Embury, J.E.; Baker, S.P.; Otero, D.H.; Dennis, D.M.; Seubert, C.N.; Martynyuk, A.E. (2005). Long-term changes in glutamatergic synaptic transmission in phenylketonuria. *Brain* 128: 300 – 307.
- Grau, C.R. & Steele, R. (1954). Phenylalanine and tyrosine utilization in normal and phenylalanine-deficient young mice. *J. Nutr.* 53: 591 – 571.

- Grecksch, G. & Matthies, H. (1980). Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12: 663 – 665.
- Guthrie R. & Susi A. (1963). A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics.* 32: 338 - 43.
- Hagen, M.E.K.; Pederzoli, C.D.; Sgaravatti, A.M.; Bridi, R.; Wajner, M.; Wannmacher, C.M.D.; Wyse, A.T.S.; Dutra-Filho, C.S. (2002). Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim. Biophys. Acta.* 1586: 344 – 352.
- Halliwell, B. (2001). Role of the free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 18: 685 – 716.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1996). Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci* 8: 22 – 26
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free radicals in biology and medicine.* New York: Oxford University Press.
- Halliwell, B. & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacol.* 142: 231 – 255.
- Hanley, W.B. (2004). Adult Phenylketonuria. *Am J Med.* 117: 590 - 5.

- Hasselbalch, S.; Knudsen, G.M.; Toft, P.B.; Høgh, P.; Tedeschi, E.; Holm, S.; Videbaek, C.; Henriksen, O.; Lou, H.C.; Paulson, O.B. (1996). Cerebral glucose metabolism is decreased in white matter changes in patients with phenylketonuria. *Pediatr Res.* 40: 21 – 24.
- Hegde, K.R.; Kovtun, S.; Varma, S.D. (2010). Inhibition of glycolysis in the retina by oxidative stress: prevention by pyruvate. *Mol Cell Biochem* DOI: 10.1007/s11010-010-0503-9.
- Hoang L., Byck S., Prevost L., Scriver C.R. (1996). PAH Mutation Analysis Consortium Database: a database for diseaseproducing and other allelic variation at the human PAH locus. *Nucleic Acids Res.* 24: 127 - 31.
- Hoffman, G.F. (1994). Selective screening for inborn errors of metabolism: past, present and future. *Eur J Pediatr.* 153: 2-8.
- Hörster, F.; Schwab, M.A.; Sauer, S.W.; Pietz, J.; Hoffmann, G.F.; Okun, J.G.; Kölker, S.; Kins, S. (2006). Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice. *Pediatr Res.* 59: 544 – 548.
- Hufton, S.E.; Jennings I.G.; Cotton R.G. (1995). Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem J.* 311:353-66.
- Huttenlocher, P.R. (2000). The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. *Eur J Pediatr* 159: S102 – S106.

Hyman, B.T.; Van Roesen, G.W.; Damasio, A.D. (1990). Memory-related neural system in Alzheimer's disease: an anatomic study. *Neurology* 40: 1721 – 1730.

Izquierdo, I. (2002). *Memória*. Porto Alegre: Artmed. 95p.

Izquierdo, I. (1989). Different forms of posttraining memory processing. *Behavioral and Neural Biology* 51: 171 – 202.

Izquierdo, I.; Barros, D. M.; Mello e Souza, T.; de Souza, M. M.; Izquierdo, L. A.; Medina, J. H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393: 635 – 636.

Izquierdo, I.; Da Cunha, C.; Rosat, R.; Jerusalinski, D.; Ferreira, M.B.; Medina, J.H. (1992). Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats. *Behavioral and Neural Biology* 58: 16 -26.

Izquierdo, I. & McGaugh, J. L. (2000). Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav. Pharmacol.* 11: 517 – 534.

Izquierdo, I. & Medina, J. H. (1997). Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connections to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68: 285 – 316.

- Jagtap, J.C.; Chandele, A.; Chopde, B.A.; Shastry, P. (2003). Sodium pyruvate protects against H₂O₂ mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line-SK-N-MC. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 26: 109 - 118.
- Jervis G.A. (1947). Studies on phenylpyruvic oligophrenia: the position of the metabolic error. *J Biol Chem.* 169: 651 - 6.
- Jervis G.A. (1953). Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc Soc Exp Biol Med* 82: 514 - 5.
- Joseph, B. & Dyer, C.A. (2003). Relationship between myelin production and dopamine synthesis in the PKU mouse brain. *J Neurochem* 86: 615 – 626.
- Kandel, E.R. & Squire, L.S. (2000). Neuroscience: Breaking down barriers in the study of brain and mind. *Science* 290: 1113 -1120.
- Kao, K.K. & Fink, M.P. (2010). The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. *Biochemical Pharmacology* 80: 151 – 159.
- Karelson, E.; Bogdanovic, N.; Garlind, A.; Winblad, B.; Zilmer, K.; Kullisaar, T.; Vihalemm, T.; Kairane, C.; Zilmer, M. (2001). The cerebrocortical areas in normal brain aging and Alzheimer's disease: noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem Res* 26: 353 – 361.
- Kaufman S. (1986). Regulation of the activity of hepatic phenylalanine hydroxylase. *Adv Enzyme Regul.* 25: 37-64.

- Kaufman S. (1999). A model of human phenylalanine metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3160 - 4.
- Kayaalp, E.; Treacy, E.; Waters, P.J.; Byck, S.; Nowacki, P.; Scriver, C.R. (1997). Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 61: 1309 - 17.
- Khuchua, Z.A.; Qin, W.; Boero, J.; Cheng, J.; Payne, R.M.; Saks, V.A. et al. (1998). Octamer formation and coupling of cardiac sarcomeric mitochondrial creatine kinase are mediated by charged N-terminal residues. *J Biol Chem* 273: 22990 - 6.
- Kimble, D.P. (1968). Hippocampus and internal inhibition. *Psychological Bulletin* 70: 285 – 295.
- Knorski, J. (1948). *Conditioned Reflexes and Neuron Organization* London: Oxford University Press.
- Koch J.H. (1997). *Robert Guthrie - the PKU story: A crusade against mental retardation*. Pasadena, USA: Hope Publishing House.
- Kölker, S.; Ahlemeyer, B.; Huhne, R.; Mayatepek, E.; Krieglstein, J.; Hoffmann, G.F. (2001a). Potentiation of 3-hydroxyglutarate neurotoxicity following induction of astrocytic iNOS in neonatal rat hippocampal cultures. *Eur J Neurosci* 13: 2115 – 2122.

- Kölker, S.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Hoffmann, G.F. (2001b). Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr Res* 50: 76 – 82.
- Konecki, D.S.; Wang, Y.; Trefz, F.K.; Lichter-Konecki, U.; Woo, S.L. (1992). Structural characterization of the 5' regions of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 31: 8363 - 8.
- Laterra, J. & Goldstein, G. W. (1993). Brain microvessels and microvascular cells in vitro. Em: Pardridge, W. (ed.). *The Blood-Brain Barrier Cellular and Molecular Biology*. New York: Raven Press Ltd. 1 – 24.
- Latini, A.; Scussiato, K.; Rosa, R.B.; Leipnitz, G.; Llesuy, S.; Belló-Klein, A.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M. (2003a). Induction of oxidative stress by L-2-hydroxyglutaric acid in rat brain. *J Neurosci Res* 74: 103 – 110.
- Latini, A.; Scussiato, K.; Rosa, R.B.; Llesuy, S.; Belló-Klein, A.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M. (2003b). D-2-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Eur J Neurosci* 17: 2017 – 2022.
- Lawler, J.M.; Barnes, W.S.; Wu, G.; Song, W.; Demaree, S. (2002). Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 47–52.
- Lidsky, A.S.; Law, M.L.; Morse, H.G.; Kao, F.T.; Rabin, M.; Ruddle, F.H. et al. (1985). Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6221 - 5.

- Locatelli, F.; Maldonado, H.; Romano, A. (2002). Two critical periods for cAMP-dependent protein kinase activity during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol. Learn. Mem.* 77: 234 – 249.
- Lorenzini, C.A.; Baldi, E.; Bucherelli, C.; Sacchetti, B.; Tassoni, G. (1996). Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Research* 730: 32 - 39.
- Luft, T. (2007). Papel dos Receptores do Peptídeo Liberador de Gastrina Hipocámpais na Memória Motivada por Medo: Possíveis Implicações para Doenças do Sistema Nervoso Central. Tese de Doutorado. UFRGS.
- Lütz, M.G.; Feksa, L.R.; Wyse, A.T.S.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M.; Wannmacher, C.M.D. (2003). Alanine Prevents the *in Vitro* Inhibition of Glycolysis Caused by Phenylalanine in Brain Cortex of Rats. *Metabolic Brain Disease* 18(1): 81 - 94.
- Lyon, G.; Adams, R.D.; Kolodny, E. H. (1996). Neurology of hereditary metabolic diseases of children. 2ª edição. New York: McGraw-Hill.
- Mancuso, C.; Scapagini, G.; Curró, D.; Giuffrida Stella, A.M.; De Marco, C.; Butterfield, D.A.; Calabrese, V. (2007). Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci* 12: 1107 – 1123.

- Marks, D.B.; Marks, A.D.; Smith, C.M. (1996). Oxygen metabolism and oxygen toxicity. Em: Basic Medical Biochemistry. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Martinez-Cruz, F.; Pozo, D.; Osuna, C.; Espinar, A.; Marchante, C.; Guerrero, J.M. (2002). Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevent by melatonin, vitamin E and vitamin C. *J. Neurosci. Res.* 69: 550 – 558.
- Marzzoco, A.; Torres, B.B. (1990). *Bioquímica Básica*. Rio de Janeiro: Guanabarra Koogan S.A.
- Maus, M.; Marin, P.; Israel, M.; Glowinski, J.; Prémont, J. (1999). Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *European Journal of Neuroscience* 11: 3215 - 3224.
- Mazzio, E. & Soliman, K.F.A. (2003). Pyruvic acid cytoprotection against 1-methyl-4-phenylpyridinium, 6-hydroxydopamine and hydrogen peroxide toxicities in vitro. *Neuroscience Letters* 337: 77 – 80.
- McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153: 1351 – 1359.
- McGaugh, J. L. (2000). A century of memory consolidation. *Science* 287: 248 – 251.
- McMahon, D.B. & Barrionuevo, G. (2002). Short- and long-term plasticity of the perforant path synapse in hippocampal area CA3. *Journal of Neurophysiology* 88: 528 – 533.

- Méndez-Alvarez, E.; Soto-Otero, R.; Herminda-Ameijeiras, A.; López- Martín, M.E.; Labandeira-García, J.L. (2001). Effect of iron and manganese on hydroxyl radical production by 6-hydroxydopamine: mediation of antioxidants. *Free Radic Biol Med* 31: 986 – 998.
- Moraes, T.B.; Zanin, F.; Rosa, A.; Oliveira, A.; Coelho, J.; Petrillo, F.; Wajner, M.; Dutra-Filho, C.S. (2010). Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *J. Neurol. Sci.* 292: 89-95.
- Morgado, I. (1999). Aprendizaje y Memoria: conceptos, categorías y sistemas neurales. In: *Neuroanatomía y fisiología das funciones cerebrales*. Ed. Madrileña, Madrid, p.827 - 873.
- Moss, A.R. & Schoenheimer, R. (1940). The conversion of phenylalanine to tyrosine in normal rats. *J. Biol. Chem.* 135: 415 – 429.
- Moyano, D.; Vilaseca, M.A.; Pineda, M.; Campistol, J.; Vernet, A.; Póo, P.; Artuch, R.; Sierra, C.(1997). Tocopherol in inborn errors of intermediary metabolism. *Clin Chim Acta* 263: 147 – 155.
- Moyle, J.J.; Fox, A.M.; Arthur, M.; Bynevelt, M.; Burnett, J.R. (2007). Meta-analysis of neuropsychological symptoms of adolescents and adults with PKU. *Neuropsychol Rev.* 17: 91 - 101.
- Muchamore, I.; Morphett, L.; Barlow-Stewart, K. (2006). Exploring existing and deliberated community perspectives of newborn screening: informing the

development of state and national policy standards in newborn screening and the use of dried blood spots. *Australia and New Zealand Health Policy* 3: 14.

Nadler, H.L. & Hsia, D.Y.Y. (1961). Epinephrine metabolism in phenylketonuria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107: 721 – 723.

Nasrallah, F.; Feki, M.; Kaabachi, N. (2010). Creatine and Creatine Deficiency Syndromes: Biochemical and Clinical Aspects. *Pediatric Neurology* 42(3): 163 – 171.

Nyhan, W.L. (1979). Phenylketonuria. Em: Bergsma, D. (ed) *Birth defects compendium*. 2^a ed. New York. Alan R. Liss. Inc. 866 – 867.

O'Connell, C.; Gallagher, H. C.; O'Malley, A.; Bourke, M.; Regan, C. (2000). CREB phosphorylation coincides with transient synapse formation in the rat hippocampal dentate gyrus following avoidance learning. *Neural Plast.* 7:279–289.

Ohl, F.; Holsboer, F.; Landgraf, R. (2001). The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents. *Behav Res Methods Instrum Comput* 33: 392–397.

Oldendorf, W.H. (1973). Saturation of blood brain barrier transport of amino acid in phenylketonuria. *Arch. Neurol.* 28: 45 – 48.

Paine, R.S. (1957). The variability and manifestations of untreated patients with phenylketonuria (phenylpyruvic aciduria). *Pediatr.* 20: 290 – 302.

- Pavlov, I.P. (1927). *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. London: Oxford University Press.
- Pearce, J.M. & Bouton, M.E. (2001). Theories of associative learning in animals. *Annual Review of Psychology*, 52: 111 – 139.
- Penrose, L. & Quastel, J.H. (1937). Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochem. J.* 31: 266 – 268.
- Pérez-Severiano, F.; Rios, C.; Segovia, J. (2000). Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Res* 862: 234 – 237.
- Phillips, R.G. & LeDoux, J.E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience* 106: 274 – 285.
- Pietz, J.; Rupp, A.; Ebinger, F.; Rating, D.; Mayatepek, E.; Boesch, C.; Kreis, R. (2003). Cerebral energy metabolism in phenylketonuria: findings by quantitative in vivo ³¹P MR spectroscopy. *Pediatr Res.* 53: 654 – 662.
- Pietz, J.; Schmitdt, E.; Matthis, P.; Kobialka, B.; Sonnevile, L. (1993). EEGs in phenylketonuria, I: Follow-up to adulthood; II: Short-term diet-related changes in EEGs and cognitive function. *Develop. Med. Child Neurol.* 35: 54 – 64.

Poley, J.R. & Dumermuth, G. (1968). EEG findings in patients with PKU. Em: HOLT Ks. Eedinburgh. Churchill Livingstone. Ltd. 61.

Przedborski, S.; Donaldson, D.B.S.; Jacowek, M.; Kish, S.J.; Guttman, M.; Rosoklija, G., Hays, A.P. (1996). Brain superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annals of Neurology* 39: 158 – 165.

Rae, C.; Digney, A.L.; McEwan, S.R.; Bates, T.C. (2003). Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: 2147 – 50.

Raghuveer, T.S.; Garg, U.; Graf, W.D. (2006). Inborn errors of metabolism in infancy and early childhood: an update. *Am Fam Physician* 73: 1981 - 90.

Ramón, Y. & Cajal, S. (1911). *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres*. Paris.

Rech, V.C.; Feksa, L.R.; Dutra-Filho, C.S.; Wyse, A.T.S.; Wajner, M.; Wannmacher, C.M. (2002). Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex. *Neurochem Res*. 27: 353 – 357.

Rescorla, R.A. (1988). Behavioral studies of Pavlovian conditioning. *Annual Review of Neuroscince*, 11: 329 – 352.

Reznick, A.Z. & Parker, L. (1993). Free radicals and antioxidants in muscular and neurological diseases and Disorders. Em: Pillo, G.; Albano, E. & Dianzani, M.U.

(eds.) Free Radicals: From Basic Science to Medicine. Switzerland. Birkhäuser Verlag Basic.

Richardson, S.C.; Aspbury, R.A.; Fisher, M.J. (1993). The role of reversible phosphorylation in the hormonal control of phenylalanine hydroxylase in isolated rat proximal kidney tubules. *Biochem J.* 292: 419 - 24.

Rodrigues, N.R.; Wannmacher, C.M.D.; Dutra-Filho, C.S.; Pires, R.F.; Fagan, P.R.; Wajner, M. (1990). Effect of phenylalanine, *p*-chloro-phenylalanine and *a*-methylphenylalanine on glucose uptake in vitro by the brain of young rats. *Biochem Soc Trans* 18: 419.

Rose, S. P. R. (2001). Time-dependent processes in memory formation revisited. Em: Gold, P. E. & Greenough, W. T. (eds.), *Memory Consolidation*, American Psychological Association, Washington, pp. 113–128.

Salvador, M & Henriques, J.A.P. (2004). Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Canoas: Ed. da Ulbra, pp. 13 - 110.

Schlattner, U. & Wallimann, T. (2000). Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. *J Biol Chem* 275: 17314 - 20.

Schulpis, K.H.; Tsakiris. S.; Karikas, G.A.; Moukas, M.; Berakis, P. (2003). Effect of diet on plasm total antioxidant status in phenylketonuric patients. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57: 282 – 287.

- Schulpis, K.H.; Tsakiris, S.; Traeger-Synodinos, J.; Papassotiriou, I. (2005). Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria. *Clin Biochem.* 38: 239–42.
- Schumacher, U.; Lukacs, Z.; Kaltschmidt, C.; Freudlsperger, C.; Schulz, D.; Kompisch, K.; Müller, R.; Rudolph, T.; Santer, R.; Lorke, D.E.; Ullrich, K. (2008). High concentrations of phenylalanine stimulate peroxisome proliferator-activated receptor gamma: implications for the pathophysiology of phenylketonuria. *Neurobiol. Dis.* 32: 385 – 390.
- Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (eds) (2001). *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*. 8^a edição. New York: McGraw-Hill.
- Scriver, C.R. & Clow, C.L. (1980). Phenylketonuria: Epitome of human biochemical genetics. *New Engl. J. Med.* 303: 1336 – 1342.
- Scriver, C.R. & Kaufman, S. (2001). Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine hydroxylase deficiency. Em: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (eds) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*. 8^a edição. New York: McGraw-Hill.
- Schefer, S.; Tint, G.S.; Jean-Guillaume, D.; Daikhin, E.; Kendler, A.; Nguyen, L.B.; Yudkoff, M.; Dyer, C.A. (2000). Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity and forebrain pathology in PKU mouse? *J Neurosci Res.* 61: 549 – 563.

Sierra, C.; Vilaseca, M.A.; Moyano, D.; Brandi, N.; Campistol, J.; Lambruschini, N. et al. (1998). Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin Chim Acta* 276: 1 – 9.

Sierra, C.; Vilaseca, M.A.; Brandi, N.; Artuch, R.; Mira, A.; Nieto, M.; Pineda, M. (2001). Oxidative stress in Rett syndrome. *Brain Dev* 23: S236 – S239.

Sies, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press.

Silberberg, D. H. (1967). Phenylketonuria metabolites in cerebellum culture morphology. *Arch. Neurol.* 17: 524 – 529.

Sirtori, L.R.; Dutra-Filho, C.S.; Fitarelli, D.; Sitta, A.; Haeser, A.; Barschak, A.G.; Wajner, M.; Coelho, D.M.; Llesuy, S.; Belló-Klein, A.; Giugliani, R.; Deon, M.; Vargas, C. (2005). Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1740: 68 – 73.

Sitta, A.; Barschak, A.G.; Deon, M.; DeMari, J.F.; Barden, A.B.; Vanzin, C. et al. (2009). L Carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol.* 29: 211 – 8.

Sitta, A.; Barschak, A.G.; Deon, M.; Terroso, T.; Pires, R.; Giugliani, R. et al. (2006). Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab Brain Dis.* 4: 287 – 96.

- Smith, C.; Marks, A.; Lieberman, M. (2007). Bioquímica Médica Básica de Marks , 2^a ed. Artmed, Porto Alegre.
- Smith, I. & Lee, P. (2000). The hyperphenylalaninemias. Em: Fernandes, J.; Saldubray, J.M.; van den Berg, G. (eds) Inborn Metabolis Diseases. 3^a edição. Springer. 171 – 179.
- Sohal, R.S.; Mockett, R.J. & Orr, W.C. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Radic. Biol. Med. 33: 575 – 586.
- Southorn, P.A. & Powis, G. (1988). Free radicals in medicine I. Chemical nature and biochemical reaction. Mayo Clin. Proc. 63: 381 – 389.
- Squire, L.R. (1992). Memory and the hippocampus: A synthesis of findings with rats, monkeys and humans. Psychol. Rev. 99:195 – 221.
- Stoy, N.; Mackay, G.M.; Forrest, C.M.; Christofides, J.; Egerton, M.; Stone, T.W.; Darlington, L.G. (2005). Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. J Neurochem 93: 611 – 623.
- Streck, E.L.; Zugno, A.I.; Tagliari, B.; Franzon, R.; Wannmacher, C.M.D.; Wajner, M.; Wyse, A.T.S. (2001). Inhibition of rat brain Na⁺, K⁺- ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. Neurochem Res 26: 1195 – 1200.

- Streck, E.L.; Vieira, P.S.; Wannmacher, C.M.D.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M.; Wyse, A.T.S. (2003). In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 18: 147 – 154.
- Streijger, F.; Jost, C.R.; Oerlemans, F.; Ellenbroek, B.A.; Cools, A.R.; Wieringa, B.; Van der Zee, C.E. (2004). Mice lacking the UbCKmit isoform of creatine kinase reveal slower spatial learning acquisition, diminished exploration and habituation, and reduced acoustic startle reflex responses. *Mol Cell Biochem*. Jan-Feb; 256-257(1-2):305-18.
- Taubenfeld, S. M.; Wiig, K. A.; Bear, M. F.; Alberini, C. M. (1999). A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* 2: 309–310.
- Thompson, A.J.; Tillotson, S.; Smith, I.; Kendall, B.; Moore, S.G.; Brenton, D.P. (1993). Brain MRI changes in phenylketonuria. Association with dietary status. *Brain* 116: 811 - 21.
- Thompson, J. & Thompson, M.W. (1988). *Genética médica humana*. Em: *Genética Médica*. 4ª ed. 71 – 72.
- Udenfriend, S. & Cooper, J. R. (1952). The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J. Biol. Chem.*, 194: 503 – 511.
- Van Backel, M.M.; Printzen, G.; Wermuth, B.; Wiesmann, U.N. (2000). Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. *Am J Clin Nutr* 72: 976 – 81.

- Van der Knaap, M.S. & Valk, J. (2005). Phenylketonuria. In: van der Knaap, M.S.; Valk, J. (eds) Magnetic resonance of myelination and myelin disorders. Springer, Berlin, pp 284 – 293.
- Van Rijn, M.; Bekhof, J.; Dijkstra, T.; Smit, P.G.; Moddermam, P.; van Spronsen, F.J. (2003) A different approach to breast-feeding of the infant with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 162: 323 – 326.
- Vargas, C.R.; Wajner, M.; Sirtori, L.R.; Goulart, L.; Chiochetta, M.; Coelho, D.; Latini, A.; Llesuy, S.; Belló-Klein, A.; Giugliani, R.; Deon, M.; Mello, C.F. (2004). Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1688: 26 – 32.
- Vasques, V.; Brinco, F.; Viegas, C.M.; Wajner, M. (2006). Creatine prevents behavioral alterations caused by methylmalonic acid administration into the hippocampus of rats in the open field task. *Journal of the Neurological Science* 244: 23 - 29.
- Vianna M.R.M.; Alonso M.; Viola, H.; Quevedo, J.; De Paris, F.; Furman, M.; De Stein, M.L.; Medina, J.H.; Izquierdo, I. (2000a). Role of Hippocampal Signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 7: 333 – 340.
- Vianna, M. R. M.; Izquierdo, L. A.; Barros, D. M.; Medina, D. M.; Izquierdo, I. (1999). Intrahippocampal infusion of an inhibitor of protein kinase A separates short- from long-term memory. *Behav. Pharmacology* 10: 223 – 228.

- Vianna, M. R. M.; Szapiro, G.; McGaugh, J. L.; Medina, J. H.; Izquierdo, I. (2001). Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12251 – 12254.
- Waber, L. (1990). Inborn errors of metabolism. *Ped Ann* 19(2): 105-118.
- Wajner, M.; Latini, A.; Wyse, A.T.S.; Dutra-Filho, C.S. (2004). The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 27: 427 – 448.
- Walsh, R.N. & Cummins, R.A. (1976). The open-field test: a critical review. *Psychol Bull* 83: 482 -504.
- Williams R.A. , Mamotte C.D.S., Burnett J. R. (2008). Phenylketonuria: An Inborn Error of Phenylalanine Metabolism. *Clin Biochem Rev.* 29: 31-41.
- Wolf, D. (2001). Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47 – 95.
- Womack, M. & Rose, W.C. (1934). Feeding experiments with mixtures of highly purified amino acids. The relation of phenylalanine and tyrosine to growth. *J. Biol. Chem.* 107: 449 - 451.

Wurtman, R.J.; Hefti, F.; Melamed, E. (1980). Precursor of neurotransmitter synthesis. *Pharmacol. Rev.* 32: 315 – 335.

Wyss, M. & Schulze, A. (2002). Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience* 112(2): 243 - 60.