

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR SOBRE O ESTRESSE  
OXIDATIVO E SISTEMA CATECOLAMINÉRGICO EM RATOS  
HIPERFENILALANINÊMICOS

PRISCILA NICOLAO MAZZOLA

Orientador: Dr. Carlos Severo Dutra Filho

Porto Alegre, 2011

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR SOBRE O ESTRESSE  
OXIDATIVO E SISTEMA CATECOLAMINÉRGICO EM RATOS  
HIPERFENILALANINÊMICOS

PRISCILA NICOLAO MAZZOLA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.  
Orientador: Dr. Carlos Severo Dutra Filho

Porto Alegre, 2011

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (Laboratório 34D) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre. Agradecimento especial ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), órgão financiador da bolsa de mestrado e de projeto de pesquisa para o desenvolvimento deste trabalho.

*Dedico esta Dissertação à  
minha avó Encarnación.*

***“A parte que ignoramos é muito  
maior que tudo quanto sabemos.”***

***Platão***

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador Prof Dr Dutra pela paciência, dedicação, atenção e, principalmente, por acreditar em mim. Muito obrigada, espero não ter decepcionado.

Muito obrigada a todos os pós-graduandos e bolsistas do Laboratório 34 D (antigo 36) que foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho: Tarsila, Marcelo, Carlos, Melaine, Bruna, Andrea, Caroline, Giovana, Julia, Fernanda, Laila e Juliana. Foi muito bom trabalhar com todos vocês!!

Ao Departamento de Bioquímica (pessoal da secretaria, portaria e biotério e Professores), obrigada pela estrutura e simpatia. Obrigada aos ratos que participaram deste estudo, acredito ter feito o possível para garantir o seu bem-estar durante os tratamentos. Obrigada ao CNPq, CAPES e outras agências pelo financiamento deste trabalho.

Ao pessoal da 212 do Lapex da ESEF, minha segunda casa (ou seria a primeira?), muito obrigada pela parceria e pelos churrascos! Especialmente ao Prof Dr Flávio Castro, pela excelência em pesquisa e pelo grande exemplo de Professor. Foi um grande prazer trabalhar contigo novamente!

Aos meus amigos daqui, Timmers, Duca, Marna, Rodrigo B., Daniel, Bruna, Naara, Augusto, Sivelli, Ester, Karol, Chris, Dani, Julia... por todo o incentivo e torcida, sempre!! MUITÍSSIMO obrigada!! Adoro vocês!

Obrigada aos meus amigos de longe, Diana, Soraia, Carla, Emanuel, Diogo, Pedro, Fininho, Marco, Jose, Guille, Paula, Rodri, que eu tanto sinto saudades e que espero poder revê-los qualquer dia desses.

Aos pacientes PKU e seus familiares que tive o prazer de conhecer, especialmente à Águeda e à Berta, obrigada por me ajudar e aumentar meu desejo em continuar estudando.

Ao grupo CIAFEL da Universidade do Porto, ao Departamento de Bioquímica do Hospital Sant Joan de Déu, muito obrigada por me receberem tão bem e por serem tão importantes para a minha formação.

Aos meus pais Denise e Basilio, minha irmã Daniela, cunhado Artur e sobrinhos Laura e Lucas, obrigada por me possibilitarem estudar em uma Instituição de grande prestígio como é a UFRGS, e por torcerem pelo meu sucesso.

## ÍNDICE

### Parte I

RESUMO.....	8
ABSTRACT .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
INTRODUÇÃO .....	11
1 Erros Inatos do Metabolismo .....	11
1.1 Fenilcetonúria.....	12
2 Estresse Oxidativo .....	15
3 Sistema Catecolaminérgico .....	16
3.1 Catecolaminas Periféricas.....	17
3.2 Catecolaminas Cerebrais .....	20
4 Fenilcetonúria e Estresse Oxidativo .....	21
5 Fenilcetonúria e Sistema Catecolaminérgico.....	22
6 Estresse Oxidativo e Exercício Físico.....	23
7 Sistema Catecolaminérgico e Exercício Físico .....	24
OBJETIVOS .....	27
Objetivo Geral.....	27
Objetivos Específicos .....	27

### Parte II

CAPÍTULO I - Artigo aceito - REGULAR EXERCISE PREVENTS OXIDATIVE STRESS IN THE BRAIN OF HYPERPHENYLALANINEMIC RATS .....	29
CAPÍTULO II - Artigo a ser submetido - <i>REGULAR EXERCISE PREVENTS DECREASED SUPRARENAL CATECHOLAMINE AND MEMORY DEFICIT IN HYPERPHENYLALANINEMIC RATS</i> .....	54

### Parte III

DISCUSSÃO .....	80
CONCLUSÕES .....	90
PERSPECTIVAS.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92

## Parte I

## RESUMO

Fenilcetonúria (PKU) é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase, levando ao acúmulo de fenilalanina e seus metabólitos no sangue e tecidos. A hiperfenilalaninemia (HPA) causa danos importantes no cérebro, provavelmente causados por aumento de estresse oxidativo e diminuição da disponibilidade dos outros aminoácidos grandes neutros (LNAA), entre outros mecanismos. Pacientes diagnosticados precocemente também estão sujeitos a estes desequilíbrios. O objetivo deste trabalho foi verificar em ratos: a) o efeito agudo do modelo de HPA na concentração de aminoácidos em plasma e cérebro total, b) o efeito do exercício regular em parâmetros de estresse oxidativo em cérebro total, conteúdo de catecolaminas em supra-renal e aspectos comportamentais na HPA crônica. Para o modelo agudo, os ratos foram divididos nos grupos HPA e Salina (SAL) (n=3). A HPA foi induzida através da administração subcutânea de alfa-metil-fenilalanina e fenilalanina, enquanto o grupo SAL recebeu salina. Os animais foram mortos 1 h após a injeção, no segundo dia de tratamento. Para o modelo crônico, os animais foram distribuídos no grupo Sedentário (Sed) ou Exercício (Exe), e subdivididos em SAL e HPA. Grupos HPA (n=16-20) foram submetidos ao modelo durante 17 dias, enquanto os grupos SAL (n=16-20) receberam salina. Os grupos Exe realizaram duas semanas de exercício aeróbico com duração diária de 20 min. No 17º dia, 1 h após a injeção, os animais realizaram a primeira exposição ao teste de campo aberto e, 24 h depois, realizaram a segunda sessão. Após, os animais foram mortos e o cérebro total foi homogeneizado para determinação da lipoperoxidação, através do conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). As glândulas supra-renais foram coletadas para análise de conteúdo de catecolaminas. O efeito agudo de HPA causou aumento de fenilalanina e diminuição de tirosina em plasma e cérebro, bem como diminuiu os níveis dos outros LNAA apenas no cérebro. Cronicamente, a HPA causou aumento de TBA-RS e SOD, e redução de CAT, GPx e conteúdo de catecolaminas. O exercício foi capaz de reverter todas as alterações encontradas no grupo HPA, exceto para a SOD. Quanto aos parâmetros comportamentais, a HPA causou diminuição na memória de habituação e o exercício regular preveniu esta alteração. Nenhuma alteração foi encontrada no grupo ExeSAL. Os ratos hiperfenilalaninêmicos foram mais responsivos aos benefícios produzidos pelo exercício regular. O treinamento físico parece ser uma estratégia interessante a ser estudada para a restauração do sistema antioxidante e de alterações comportamentais que ocorrem na PKU.

**Palavras-chave:** Fenilcetonúria, hiperfenilalaninemia, estresse oxidativo, catecolaminas, exercício físico



## ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of metabolism caused by deficiency of phenylalanine hydroxylase, resulting in accumulation of phenylalanine and its metabolites in blood and tissues. Hyperphenylalaninemia (HPA) causes serious damage in the brain probably due to increased oxidative stress and decreased availability of other large neutral amino acids (LNAA), among other mechanisms. Patients early diagnosed are also subject to these imbalances. The objective of this study was to evaluate: a) the effect of acute HPA model on the concentration of LNAA in plasma and total brain, b) the effect of regular exercise on parameters of oxidative stress in total brain, catecholamine content in suprarenal and behavioral aspects in a chronic HPA model. HPA was induced by subcutaneous administration of alpha-methylphenylalanine and phenylalanine, while SAL group received saline. For the acute model, rats were divided into groups Saline (SAL) and HPA (n = 3). Animals were killed 1 h after last injection, at the second day of treatment. For the chronic model, animals were divided into sedentary group (Sed) or exercise group (Exe), and subdivided into SAL (n=16-20) and HPA (n=16-20). Administration continued as long as 17 days. Exe groups performed two weeks of daily aerobic exercise lasting 20 min. At the 17th day, 1 h after injection, the animals performed the first exposure to open field task, and 24 h later, performed the second session. After that, animals were killed and the whole brain was homogenized to evaluate lipid peroxidation through the content of thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), and activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx). Suprarenal glands were collected for catecholamine content analysis. Acute HPA increased phenylalanine and decreased tyrosine in plasma and brain as well as decreased levels of other LNAA in the brain. Chronically, HPA increased TBA-RS and SOD activity, and reduced CAT and GPx activities in the brain and reduced catecholamine content into suprarenal. Regular exercise was able to prevent all the alterations found in HPA group, except for SOD activity. Regarding the behavioral data, HPA caused a decrease of habituation memory and regular exercise prevented this change. Exercise per se (ExeSAL group) produced no changes. HPA rats were more responsive to the benefits produced by regular exercise. Physical training appears to be an interesting strategy to be studied for the restoration of the antioxidant system and the behavioral changes that occur in PKU.

**Keywords:** Phenylketonuria, hyperphenylalaninemia, oxidative stress, catecholamine, physical exercise

## LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalase

ERO – Espécies reativas de oxigênio

Exe – Exercício

GPx – Glutathione peroxidase

HPA – Hiperfenilalaninemia

LNAAs – Grandes aminoácidos neutros

PKU – Fenilcetonúria

SAL – Salina

SOD – Superóxido dismutase

SR – Supra-renais

TBA-RS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## **INTRODUÇÃO**

### **1 Erros Inatos do Metabolismo**

Os erros inatos do metabolismo são doenças metabólicas envolvendo síntese, transporte, armazenamento ou degradação de substratos biológicos causados por defeitos genéticos hereditários. Este nome foi utilizado pela primeira vez por Archibald Garrod, em 1908, ao descrever a Alcaptonúria utilizando os conceitos da hereditariedade Mendeliana (Scriver 2008). A partir disto, muitos outros problemas de saúde sem diagnóstico conclusivo foram descobertos como sendo decorrentes de erros genéticos que afetavam o metabolismo.

A síntese defeituosa de uma proteína que tem função de enzima levará à carência de sua atividade, comprometendo a formação do produto que deveria ser formado, e ao acúmulo do substrato (Scriver e Kaufman 2001). Assim, além do desequilíbrio gerado pela falta de determinado produto, o substrato em grande quantidade poderá ser tóxico e também sofrer metabolismo secundário, gerando compostos ainda mais prejudiciais ao sistema. O quadro clínico dos erros inatos é bastante variado, visto as diversas combinações de erros genéticos existentes. Assim, os sujeitos acometidos podem ser assintomáticos até a fase adulta, ou apresentarem importante comprometimento mental já na infância.

Saudubray e Charpentier (2001) classificam os erros inatos em três tipos distintos. Fazem parte do primeiro os distúrbios envolvendo síntese ou catabolismo de macromoléculas. O segundo grupo é composto por desordens do metabolismo intermediário, como é o caso da fenilcetonúria. Por fim, o terceiro grupo abriga defeitos na utilização e produção energética.

Apesar de não apresentarem grande incidência isoladamente, todos os erros inatos do metabolismo somados atingem aproximadamente 10% de todas as doenças genéticas. Atualmente, com o diagnóstico mais eficiente, a frequência mundial é de 1:5000 nascidos vivos (Giugliani 1998).

### **1.1 Fenilcetonúria**

A fenilcetonúria foi descrita pela primeira vez em 1934 pelo médico bioquímico Asbjorn Fölling, sendo primeiramente intitulada oligofrenia fenilpirúvica. Este médico norueguês observou dois irmãos com retardo mental que apresentavam odor característico na urina, e excreção aumentada de ácido fenilpirúvico e fenilalanina (Nyhan 1984). Anos depois, Penrose e Quastel (1937) introduziram o termo Fenilcetonúria, que deu origem a sigla PKU (do inglês Phenylketonuria), mais comumente utilizada.

A PKU é o erro inato do metabolismo dos aminoácidos mais comum, ocorrendo com a frequência de 1:14000 nascidos em populações caucasianas (Walter et al. 2002), sendo extremamente rara em negros (Katz e Menkes 1964). No Brasil, a incidência encontrada é de 1:12500 (Jardim et al. 1996), porém supõe-se que muitos casos não sejam contabilizados devido à carência de diagnóstico em determinadas regiões do país (Monteiro e Cândido 2006). A doença é causada pelo erro genético no cromossomo 12 (Kohli et al. 2005), onde está localizado o gene da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). Esta enzima está predominantemente presente no fígado, e é responsável pela transformação do aminoácido essencial fenilalanina em tirosina, utilizando tetra-hidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) como cofator. O nível de comprometimento da atividade da PAH varia de 5% a completa ausência, que pode ser verificado

pela concentração de fenilalanina no plasma ( $\geq 1002 \mu\text{M}$ ) (Clark 1992, Guttler e Guldborg 1996). O nível de hiperfenilalaninemia (HPA) é utilizado para classificar a PKU em três tipos, de acordo com a severidade. Atualmente, já foram descritas mais de 250 mutações do gene que codifica a enzima PAH (Guldborg et al. 1996). Esses diferentes genótipos são provavelmente provenientes da mistura étnica, que são agrupados de acordo com a tolerância à ingestão do aminoácido (Guttler e Guldborg 1996). O portador de PKU clássica tem praticamente nenhuma atividade da PAH, tolerando a ingestão de 250-350 mg de fenilalanina/dia. Este grupo, que é o mais frequente, chega a apresentar HPA entre 1 e 3 mM (Scriver e Kaufman 2001). A PKU branda a moderada compreende os pacientes que toleram 350-600 mg fenilalanina/dia, devido à deficiência parcial da enzima. Outro grupo compreende as HPAs oriundas da deficiência de  $\text{BH}_4$ , onde a suplementação deste cofator mantém os níveis de fenilalanina dentro dos valores ideais, normalizando a atividade da PAH (Erlandsen e Stevens 2001).

A carência da atividade da PAH faz com que a fenilalanina se acumula e siga rotas alternativas de metabolismo, formando fenilacetato, fenilacteto e fenilpiruvato (Figura 1). Esses metabólitos, somados à própria fenilalanina, são extremamente tóxicos para o sistema nervoso central, principalmente em sua fase de desenvolvimento, apesar dos mecanismos ainda não serem completamente conhecidos (Nyhan 1984). Assim, o estado neurotóxico causado pela HPA leva a criança não diagnosticada a apresentar um quadro clínico caracterizado por microcefalia, retardo mental severo e epilepsia. Já na fase adulta, entre os 20 e os 30 anos de idade, poderá ocorrer o surgimento ou a progressão de desordem motora (Surtees e Blau 2000).

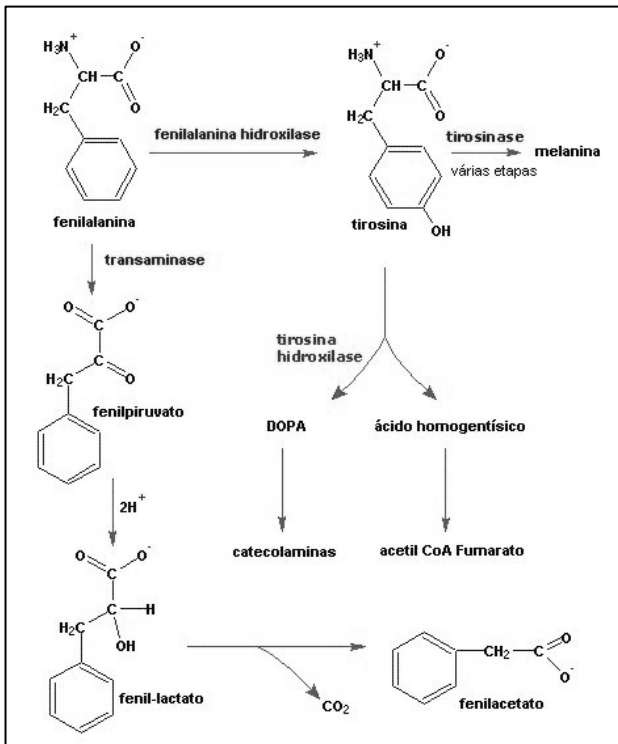


Figura 1 Possíveis rotas de metabolismo da fenilalanina. Em níveis normais, ela é convertida à tirosina pela fenilalanina hidroxilase. Na carência dessa enzima, pode sofrer metabolismo alternativo formando os metabólitos tóxicos fenilpiruvato, fenilactato e fenilacetato. (adaptado de Nyhan 1984)

O diagnóstico deve ser realizado nos primeiros dias de vida da criança, através do “Teste do Pezinho”, inicialmente elaborado em 1962 pelo médico bacteriologista Robert Guthrie para verificar doenças congênitas (Lesser 1963). A partir de 1992, o teste de triagem neonatal tornou-se obrigatório em todo o território brasileiro (Lei Federal nº 8069), sendo realizado a partir do terceiro dia de vida do recém-nascido. Assim que diagnosticada, a criança deve receber uma dieta restrita em fenilalanina para a manutenção do seu nível sanguíneo dentro da normalidade. Porém, a necessidade protéica não permite sua total eliminação da dieta, resultando em oscilações na concentração da fenilalanina plasmática.

O correto manejo da dieta durante a fase de desenvolvimento do sistema nervoso central garante uma vida normal ao paciente. Porém, a negligência do controle alimentar na adolescência e na fase adulta é muito comum (Vilaseca et al. 2010, Cotugno et al. 2011), levando o fenilcetonúrico a

apresentar níveis de fenilalanina acima do normal (Diamond et al. 1997, Artuch et al. 2004, Schulpis et al. 2004). Esta HPA moderada e contínua tem sido associada ao decréscimo da função cognitiva nestes pacientes precocemente diagnosticados (Surtees e Blau 2000, Guttler e Lou 1986, Taylor, Hommes e Stewart 1983, Gassio et al. 2008).

## **2 Estresse Oxidativo**

As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem tanto apresentar elétrons desemparelhados na sua última camada de valência, sendo também chamadas de radicais livres, como também apresentar estabilidade de elétrons. A característica principal dessas substâncias é a fácil reatividade com biomoléculas, alterando suas funções (Halliwell e Gutteridge 2007). Em condições fisiológicas normais, a respiração celular utiliza oxigênio molecular, produzindo água. Durante este processo, o oxigênio sofre redução tetravalente e são formados intermediários reativos. A produção das ERO ocorre normalmente pela respiração mitocondrial, e está envolvida na morte programada da célula, possivelmente facilitando a sinalização apoptótica (Gabai et al. 1998).

Para lidar com estes danos permanentemente produzidos, as células apresentam defesas antioxidantes. A estratégia de desintoxicar o meio fisiológico pode ser através de compostos que agem como sequestradores de ERO, ou de enzimas que os convertem em substâncias menos agressivas. A superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), são importantes enzimas antioxidantes indispensáveis para o combate às ERO. Quanto às defesas não-enzimáticas, fazem parte os antioxidantes

hidrofílicos (glutathiona, ácido ascórbico, indóis e catecóis), e os lipofílicos (bioflavonóides, carotenóides e tocoferóis) (Halliwell e Gutteridge 2007).

O controle entre produção e remoção das ERO garante a homeostase fisiológica. Porém, situações de aumento de produção desses compostos tóxicos e/ou diminuição de defesas antioxidantes (enzimáticas e não-enzimáticas) acarretam em estresse oxidativo. O aumento das ERO está associado à oxidação de biomoléculas, resultando em dano celular e comprometimento da sua função (Behl e Moosmann 2002).

O sistema nervoso central é especialmente suscetível à lipoperoxidação, devido ao seu grande consumo de oxigênio, composição rica em lipídios insaturados, alta concentração de ferro e a escassa defesa antioxidante (Halliwell e Gutteridge 2007).

### **3 Sistema Catecolaminérgico**

As catecolaminas podem ser denominadas hormônios, quando sintetizados pela medula das supra-renais (SR) e secretadas na corrente sanguínea, ou serem classificadas como neurotransmissoras, devido à sua produção e utilização no sistema nervoso central. Estas aminas dotadas de um grupamento catecol (o-di-hidroxibenzeno) são dopamina (3,4-dihidroxifenilalanina), noradrenalina e adrenalina (Figura 3). Em ambos os tecidos, são sintetizadas preferencialmente a partir do aminoácido tirosina, seguindo a cascata de reações dependendo da atividade e expressão das enzimas envolvidas. A tirosina hidroxilase é a enzima limitante na produção dessas substâncias, e também pode utilizar fenilalanina como substrato, desde que esse aminoácido esteja em concentração normal (Joseph e Dyer 2003). As



catecolaminas dificilmente atravessam a barreira hematoencefálica (Kostrzewa 2007), e apresentam funções importantes tanto ao nível cerebral como periférico.

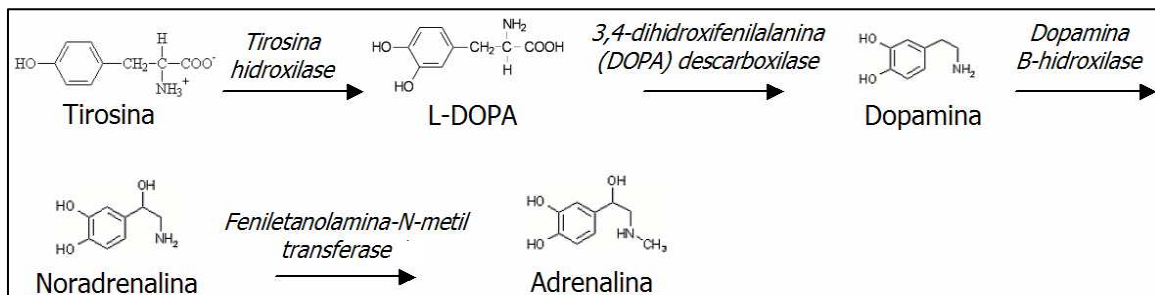


Figura 3: Síntese das catecolaminas a partir do aminoácido tirosina (adaptado de Kandel, Schwartz e Jessel 2003)

### 3. 1 Catecolaminas Periféricas

As SR também são conhecidas como adrenais devido à sua grande importância na síntese e secreção de adrenalina, uma vez que os primeiros estudos sobre patologias envolvendo o órgão utilizavam a enzima feniletanolamina-N-metil-transferase, que converte noradrenalina em adrenalina, como marcador de dano (Wong 2003). Devido à grande excreção de adrenalina, as SR expressam todas as enzimas envolvidas na conversão de tirosina, apresentando grande produção desse hormônio. Secretada em menores concentrações, a dopamina apresenta função basicamente vasomotora (da Poian e Carvalho-Alves 2002), enquanto que a noradrenalina e a adrenalina atuam nas respostas cardiovasculares e metabólicas (Litwack e Schmidt 1997). O sistema catecolaminérgico periférico é regulado por núcleos simpáticos do sistema nervoso central presentes no córtex, hipotálamo e medula espinhal (de Diego, Gandia e Garcia 2008).

Pacak e colaboradores (2001) definiram quatro categorias de

estresse que geram aumento da secreção catecolaminérgica: 1) estressores físicos, tais como frio, calor, radiação, barulho, vibração, estressores químicos, dor e imobilização; 2) estressores psicológicos que afetam processos emocionais, podendo resultar em desvios comportamentais, como ansiedade, medo, frustração, e manuseio e contenção em animais; 3) estressores sociais, refletindo em problemas de interação entre indivíduos, como desemprego, separação conjugal, morte do parceiro, dominância entre animais; 4) estressores que desafiam a homeostase cardiovascular e metabólica, como exercício físico, hipoglicemias, hemorragias. Quanto à duração, podem ser considerados estressores agudos, quando o abalo ocorre uma única vez ou em um curto período, ou estressores crônicos, quando o organismo é exposto continuamente ou por longo período de tempo a uma situação desagradável.

As SR são inervadas pelo sistema simpático que, em situação de estresse, liberam adrenalina na circulação sanguínea, atingindo os órgãos e ativando reações de luta-e-fuga (Kvetnansky, Sabban e Palkovits 2009). O estímulo simpático aumenta a entrada de sódio e cálcio na célula, alterando a permeabilidade da membrana e permitindo a entrada de glicocorticóides produzidos pelo córtex da SR. Os glicocorticóides estimulam a conversão enzimática de noradrenalina para adrenalina, que são exocitadas para a corrente sanguínea (Litwack e Schmidt 1997).

Atualmente, muitos estudos tem sido conduzidos a fim de avaliar o papel do sistema simpatoadrenérgico na saúde física e mental dos indivíduos. As SR podem responder negativamente frente a agentes estressores, diminuindo sua capacidade de sintetizar catecolaminas (Pohorecky et al. 2004, Schulpis et al. 2004). Em situação de repouso, as catecolaminas circulantes

são importantes agentes controladores da secreção de adipocinas pelo tecido adiposo, que tem função na regulação energética e nas respostas inflamatória e imunológica (Schulpis, Papakonstantinou e Tzamouranis 2000). As adipocinas mais estudadas são a leptina e a adiponectina. A primeira tem ação no hipotálamo, provocando diminuição do apetite e aumento do metabolismo energético. Sua secreção é muito importante para a manutenção da massa corporal, uma vez que a mucosa gástrica secreta o hormônio grelina, que tem atividade antagônica à leptina, induzindo o aumento do apetite e diminuição da demanda metabólica (Nelson e Cox 2008). A adiponectina apresenta ação sistêmica, estimulando o gasto energético, bem como reduzindo a glicemia. Seus níveis plasmáticos elevados estão associados à diabetes do tipo 1, anorexia nervosa e insuficiência renal crônica, enquanto que sua carência é relacionada com diabetes do tipo 2, obesidade e doença coronariana (Diez e Iglesias 2003). Assim, a correta síntese e secreção de catecolaminas periféricas são importantes na manutenção indireta de fatores inflamatórios e no controle do metabolismo energético, que podem ser alterados pela atividade endócrina dos adipócitos.

Alguns distúrbios do humor podem estar associados à incorreta secreção de catecolaminas periféricas. Indivíduos com síndrome metabólica, apresentando reduzida concentração de catecolaminas plasmáticas e, conseqüentemente, aumento de agentes pró-inflamatórios, parecem estar mais suscetíveis à depressão (Zeugmann et al. 2010). Além de afetar o metabolismo, a adequada secreção de catecolaminas periféricas tem sido recentemente relacionada com parâmetros comportamentais saudáveis (Prokopova 2010, Rief et al. 2010).

### **3.2 Catecolaminas Cerebrais**

O sistema nervoso central tem grande produção e utilização de dopamina e noradrenalina, apresentando baixa expressão da última enzima da cascata de formação de catecolaminas. Os neurônios dopaminérgicos cerebrais originam-se na substância nigra e na área tegmental ventral, sendo projetados no estriado (núcleo accumbens) (Knab e Lightfoot 2010). Esses neurônios interconectam-se com várias áreas do cérebro e, portanto, influenciam diversas funções centrais. Respostas comportamentais e cognitivas como recompensa, aprendizado, motivação, memória e movimento estão intimamente ligadas com a atividade dopaminérgica no estriado (Martynyuk, Van Spronsen e Van der Zee 2010). Já o núcleo coeruleus é o principal local de projeção dos neurônios noradrenérgicos, recebendo quase metade de todos os neurônios produtores de noradrenalina do sistema nervoso central (Aston-Jones et al. 1991).

Danos nas regiões do cérebro envolvidas com os neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos estão extremamente relacionados com a Doença de Parkinson (Isaias et al. 2011). Os distúrbios motores importantes característicos da doença são acompanhados pelo acometimento da função cognitiva e afetiva (Grossman 1999) e, ainda, muitos pacientes apresentam depressão (Leentjens 2011). Déficits catecolaminérgicos no cérebro estão intimamente ligados aos transtornos do humor, e o tratamento da depressão profunda é embasado na utilização de inibidores da recaptação e da degradação de dopamina e noradrenalina na fenda sináptica (Moret e Briley 2011). Estudos em modelo animal tem encontrados decréscimos importantes da função exploratória e cognitiva associados a danos neuronais relativos à

produção de catecolaminas (Gaykema e Goehler 2011, Li et al. 2010). Assim, cresce o número de evidências da importância do sistema catecolaminérgico para a saúde mental dos indivíduos.

#### **4 Fenilcetonúria e Estresse Oxidativo**

A PKU é caracterizada pelos altos níveis de fenilalanina no sangue e, conseqüentemente, nos tecidos, gerando danos irreversíveis na criança não tratada precocemente (Surtees e Blau 2000). Os mecanismos precisos da neurofisiopatologia da doença ainda não estão completamente esclarecidos, mas o aumento das ERO e a diminuição dos agentes antioxidantes tem sido verificados em pacientes e modelos experimentais de PKU (Wajner et al. 2004, Moraes et al. 2010, Sitta et al. 2006, Ercal et al. 2002).

O acúmulo de fenilalanina, bem como de seus metabólitos tóxicos, podem promover o desequilíbrio oxidativo no cérebro, resultando em decréscimo da atividade enzimática antioxidante (Moraes et al. 2010, Hagen et al. 2002). Com isso, as ERO produzidas não são devidamente convertidas em compostos atóxicos, podendo reagir com as biomoléculas. O sistema nervoso central apresenta grande suscetibilidade a dano oxidativo, como encontrado pelo aumento da lipoperoxidação em modelo animal da PKU (Wilke et al. 1992, Moraes et al. 2010, Martinez-Cruz et al. 2002). Além disso, o estresse oxidativo instaurado na doença pode também estar relacionado com o decréscimo cognitivo de pacientes adultos diagnosticados precocemente (Gassio et al. 2008). Assim como o pobre controle dietético pode prejudicar o *status* oxidativo do paciente, a dieta restritiva dificulta a obtenção de nutrientes importantes para a atividade adequada de enzimas antioxidantes (Artuch et al. 2004).

O envolvimento do estresse oxidativo na PKU sugere que novas terapias antioxidantes devem ser utilizadas. Atualmente, a suplementação de compostos antioxidantes como L-carnitina (Sitta et al. 2011), selênio (Wilke et al. 1992, Sitta et al. 2011) em pacientes, e a administração de ácido lipoico (Moraes et al. 2010) em modelo animal, tem se mostrado eficaz na prevenção da redução do estresse oxidativo.

## **5 Fenilcetonúria e Sistema Catecolaminérgico**

O sistema catecolaminérgico tem o aminoácido tirosina como precursor na síntese de seus hormônios/neurotransmissores. A deficiência da PAH encontrada em indivíduos PKU, leva a menor síntese desse aminoácido, assim como o próprio aumento de fenilalanina prejudica a captação de tirosina pelo tecido nervoso (Knudsen et al. 1995) e pelas adrenais (Schulpis et al. 2004). Os aminoácidos neutros, como a fenilalanina e a tirosina, competem pelos mesmos transportadores de membrana da barreira hematoencefálica (Surtees e Blau 2000). Na HPA, a fenilalanina apresenta vantagem em relação a todos os outros aminoácidos grandes neutros (LNAA), pois está em maior concentração e possui maior afinidade a estas proteínas (Knudsen et al. 1995), o que aumenta consideravelmente o seu influxo ao cérebro (Pietz et al. 1999, Binek-Singer e Johnson 1982). Apesar da tirosina hidroxilase também utilizar fenilalanina como substrato, altas concentrações de fenilalanina diminuem significativamente sua atividade (Pascucci et al. 2008, Joseph e Dyer 2003). A menor concentração de catecolaminas encontrada no plasma (Schulpis et al. 2004) e cérebro (McKean 1972) de pacientes PKU e no cérebro (Puglisi-Allegra et al. 2000, Joseph e Dyer 2003, Embury et al. 2007) do modelo animal da

doença, sugere que a disponibilidade de tirosina seja decisiva na correta atividade do sistema catecolaminérgico (Tam e Roth 1997, de Groot et al. 2010).

Mesmo em pacientes diagnosticados precocemente, os baixos níveis catecolaminérgicos acarretam no prejuízo da regulação exercida pelas catecolaminas sobre as adipocinas (Schulpis et al. 2004, Schulpis et al. 2005). Essas substâncias atuam conjuntamente regulando o apetite, e processos metabólicos e inflamatórios, sendo indispensáveis para o funcionamento adequado do organismo (Diez e Iglesias 2003).

No cérebro, a deficiência do sistema dopaminérgico é indicada como responsável por distúrbios nas funções cognitivas dos pacientes, uma vez que a HPA afeta negativamente o desempenho neurofisiológico (Gassio et al. 2008, Krause et al. 1985). A oscilação na disponibilidade de tirosina gerada pelo pobre controle da dieta restrita (Huijbregts et al. 2002) é responsável pelo comprometimento neurológico resultante da diminuição de dopamina (Diamond et al. 1997). Uma vez que os danos cognitivos são possivelmente reversíveis (Guttler e Lou 1986), estratégias concomitantes à restrição dietética devem ser estudadas a fim de encontrar uma alternativa viável para atenuar este desequilíbrio (Surtees e Blau 2000).

## **6 Estresse Oxidativo e Exercício Físico**

O exercício físico é um potente agente estressor, responsável por desafiar a homeostase de todo o organismo e, conseqüentemente, desencadear reações sistêmicas. Assim, uma sessão de exercício aumenta a produção de ERO através do incremento da demanda metabólica. A

necessidade energética dos músculos ativos acarreta aumento da atividade simpática, a fim de mobilizar substrato energético de diferentes tecidos. A sequência de reações envolvendo o incremento da inervação simpatoadrenérgica, o aumento do fluxo sanguíneo e o aumento da frequência cardíaca, contribui significativamente para a produção exacerbada de ERO e instauração do estresse oxidativo em diversos órgãos, incluindo o cérebro (Radak et al. 2007). Contudo, o exercício realizado com frequência e carga corretas pode resultar na adaptação do organismo, aperfeiçoando seu sistema antioxidante através de diferentes mecanismos. Desta maneira, indivíduos treinados podem lidar com as injúrias causadas pelas ERO de maneira mais eficiente do que os sedentários. Além de amplamente descrita para melhorar a saúde em indivíduos saudáveis (Radak et al. 2007, Aksu et al. 2009), os benefícios do exercício físico regular também tem sido relatados em doenças neurodegenerativas (Heesen et al. 2006, Um et al. 2008, White e Castellano 2008) e no envelhecimento (Goto et al. 2007).

O exercício físico controlado e sistemático é capaz de melhorar o estado oxidativo no sistema nervoso central nestas situações já claramente relacionadas com o estresse oxidativo. Portanto, esta estratégia tem cada vez mais sido proposta e estudada como neuroprotetora, sendo uma coadjuvante importante e acessível no tratamento de enfermidades que acometem o sistema nervoso central.

## **7 Sistema Catecolaminérgico e Exercício Físico**

O sistema simpático está intimamente ligado às reações de luta-e-fuga, disponibilizando substrato energético necessário para o indivíduo entrar



em atividade física (Desgorces et al. 2004, Kvetnansky et al. 2009). O estímulo simpático recebido pela medula das SR desencadeia a liberação de noradrenalina e adrenalina para a corrente sanguínea que, por sua vez, age em todos os tecidos do corpo. Tanto para indivíduos sedentários quanto para treinados, a intensidade do estresse físico é imprescindível para determinar em que quantidade esses hormônios são liberados, por isso são verificadas maiores concentrações de catecolaminas plasmáticas em resposta a exercício de alta intensidade (Ramel, Wagner e Elmadfa 2004, Kraemer et al. 1999).

A medula das SR é capaz de aumentar sua capacidade de estocar e secretar catecolaminas em resposta crônica ao treinamento físico (Tumer et al. 1999). O exercício regular gera hipertrofia das SR (Kjaer 1998) e aumento da expressão da enzima tirosina hidroxilase (Tumer et al. 2001). A necessidade catecolaminérgica de cada sessão de treino gera adaptações positivas na sua glândula produtora.

O exercício regular tem demonstrado ser útil na adequada função catecolaminérgica no sistema nervoso central. A disfunção comportamental provocada por lesão dos neurônios dopaminérgicos pode ser restaurada através do treinamento físico (Fisher et al. 2004, Smith, Goldberg e Meshul 2011). Apesar dos mecanismos ainda não serem completamente elucidados, o aumento dos neurônios da substância nigra promovido pelo exercício regular possivelmente esteja relacionado ao melhor desempenho nas tarefas comportamentais (Smith et al. 2011). Os efeitos benéficos do treinamento também tem sido encontrados na Doença de Parkinson, através do fortalecimento do sistema catecolaminérgico cerebral (Sasco et al. 1992, Dibble, Addison e Papa 2009).

Repetidas sessões de exercício físico se mostram úteis no manejo catecolaminérgico periférico e central. Em condições normais e patológicas, o exercício regular tem ganhado espaço, sendo comprovadamente benéfico até mesmo no sistema nervoso central. A necessidade de estratégias concomitantes as já utilizadas intervenções farmacológicas, aumenta ainda mais o interesse de estudar as relações dos hormônios e neurotransmissores com o exercício físico.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Verificar o efeito do exercício regular sobre parâmetros de estresse oxidativo e do sistema catecolaminérgico em ratos submetidos ao modelo HPA.

### **Objetivos Específicos**

- a) Avaliar o efeito do exercício regular aeróbico na lipoperoxidação e nas defesas antioxidante enzimáticas, através do conteúdo de TBA-RS e da atividade da SOD, CAT e GPx em cérebro total de ratos submetidos à HPA crônica;
- b) Avaliar o efeito do exercício regular aeróbico no conteúdo de catecolaminas em SR e desempenho em tarefa comportamental de campo aberto em ratos submetidos à HPA crônica;
- c) Avaliar agudamente o efeito do modelo de HPA utilizado, quantificando a concentração de LNAA em plasma e cérebro total.

## Parte II

## CAPÍTULO I

### Artigo aceito

# REGULAR EXERCISE PREVENTS OXIDATIVE STRESS IN THE BRAIN OF HYPERPHENYLALANINEMIC RATS

Metabolic Brain Disease

Manuscript draft

Data de aceite: 08 de Setembro de 2011

---

**Data:** 8 Sep 2011 12:49:22 -0400 [08-09-2011 13:49:22 BRT]

---

**De:** Gregory Konat <gkonat@wvu.edu>

---

**Para:** Carlos Severo Dutra-Filho <dutra@ufrgs.br>

---

**Assunto:** MEBR: Your manuscript entitled Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats

---

Ref.: MS. No. MEBR-D-11-00052R1  
Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of  
hyperphenylalaninemic rats  
Metabolic Brain Disease

Dear Dr. Dutra-Filho,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Metabolic Brain Disease.

It was accepted on 08-09-2011.

Thank you for submitting your work to this journal.

with kind regards

Gregory Konat  
Editor-in-Chief  
Metabolic Brain Disease

Reviewer #1: In my opinion, the revised version of the manuscript is acceptable for publication.

## **Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats**

Priscila Nicolao Mazzola<sup>2</sup>, Melaine Terra<sup>1</sup>, Andrea Pereira Rosa<sup>2</sup>, Caroline Paula Mescka<sup>2</sup>, Tarsila Barros Moraes<sup>2</sup>, Bruna Piccoli<sup>1</sup>, Carlos Eduardo Jacques<sup>1</sup>, Giovana Dalazen<sup>1</sup>, Marcelo Xavier Cortes<sup>2</sup>, Juliana Coelho<sup>2</sup>, Carlos Severo Dutra-Filho<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, , Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

\* Corresponding author:

Carlos Severo Dutra-Filho  
Departamento de Bioquímica  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo  
90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.  
Telephone number: +55 51 33085575  
Fax number: +55 51 33085535  
E-mail: dutra@ufrgs.br

## **Abstract**

Phenylketonuria (PKU) is caused by deficiency of phenylalanine hydroxylase, leading to accumulation of phenylalanine and its metabolites. Clinical features of PKU patients include mental retardation, microcephaly, and seizures. Oxidative stress has been found in these patients, and is possibly related to neurophysiopathology of PKU. Regular exercise can lead to adaptation of antioxidant system, improving its capacity to detoxify reactive species. The aim of this study was to verify the effects of regular exercise on oxidative stress parameters in the brain of hyperphenylalaninemic rats. Animals were divided into sedentary (Sed) and exercise (Exe) groups, and subdivided into saline (SAL) and hyperphenylalaninemia (HPA). HPA groups were induced HPA through administration of alpha-methylphenylalanine and phenylalanine for 17 days, while SAL groups (n=16-20) received saline. Exe groups conducted 2-week aerobic exercise for 20 min/day. At 18th day, animals were killed and the brain was homogenized to determine thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) content, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities. Soleus muscles were collected to determine glycogen content as a marker of oxidative adaptation. Exe groups showed enhanced glycogen content. HPA condition caused an increase in TBA-RS and SOD, and reduces CAT and GPx. Exercise was able to prevent all changes seen in the HPA group, reaching control values, except for SOD activity. No changes were found in the ExeSAL group compared to SedSAL. Hyperphenylalaninemic rats were more responsive to the benefits provided by regular exercise. Physical training may be an interesting strategy to restore the antioxidant system in HPA.

**Keywords:** Phenylketonuria, hyperphenylalaninemia, oxidative stress, physical exercise

## **Introduction**

Phenylketonuria (PKU) is the most common inborn error of the amino acid metabolism, presenting a frequency of 1:14,000 births (Walter et al. 2002). In these patients, mutations in the gene that express phenylalanine hydroxylase, located in the chromosome 12 (Kohli et al. 2005), leads to deficiency of this enzymatic activity which impairs the conversion of phenylalanine to tyrosine. So, phenylalanine accumulates and follows alternatives metabolic pathways producing phenylpyruvate, phenyllactate and phenylacetate. Increased concentrations of phenylalanine and its metabolites in the blood and other tissues, including central nervous system, provokes impairments of brain function by mechanisms not yet completely understood (Perez-Duenas et al. 2006; Gassio et al. 2008) and untreated patients present microcephaly, mental retardation and seizures (Surtees and Blau 2000) among other neurological features. To avoid brain damage, it is important to early diagnose and treat these children subjecting them to a special phenylalanine-restricted diet. However, adherence of the dietary treatment is difficult to achieve and previous studies have been shown that even in early diagnosed patients, phenylalanine levels can oscillate above the adequate values (Diamond et al. 1997; Artuch et al. 2004; Schulpis et al. 2004). Recently, our group and other researchers have reported that hyperphenylalaninemia (HPA) can produce oxidative stress in rat brain (Hagen et al. 2002; Ercal et al. 2002) which may contribute to the pathophysiological mechanisms of PKU. Indeed, alterations of several oxidative stress parameters have already been observed in PKU patients as well (Sierra et al. 1998; Artuch et al. 2004; Sirtori et al. 2005; Sitta et al. 2006). Cell respiration normally produces free radicals and reactive species of oxygen and nitrogen, which are neutralized by the antioxidant defenses. In normal condition, these species are useful for



activation of gene expression of various proteins like enzymes and other repair proteins and inflammation-related proteins Radak et al. 2007). Oxidative stress is characterized by an imbalance in production and/or removal of these substances, favoring the accumulation of reactive species (Halliwell and Gutteridge 2007). The central nervous system is especially sensitive to oxidative stress due to its high oxygen consumption, low activity of the antioxidant system, lipid constitution (specially polyunsaturated fatty acids) and high iron content (Halliwell and Gutteridge 2007).

The physical exercise can exacerbate the production of reactive species by increasing metabolic demand. The need for fuel by the exercised muscles leads to entire body stimulus and responses. Increased blood flow, provided by enhanced sympathetic stimulus and heart rate, contribute significantly to produce oxidative stress to several systems, including the brain Radak et al. 2007). However, exercise performed in a correct load and frequency can lead to adaptation of the organism, increasing its antioxidant system through different mechanisms. Thus, trained subjects can manage better than sedentary ones the injuries caused by reactive species of oxygen. Besides widely described to improve health in normal subjects (Radak et al. 2007; Aksu et al. 2009), the benefits of regular exercise have also been reported in neurodegenerative diseases (Heesen et al. 2006; Um et al. 2008; White and Castellano 2008) and aging (Goto et al. 2007). Considering the impairment of the antioxidant system in HPA, regular exercise may be useful in the PKU condition. So, the objective of this study was to verify the effects of regular exercise on oxidative stress markers in the brain of an animal model of HPA.

## **Materials and Methods**

## Reagents and equipments

All chemicals were purchased from Sigma/Aldrich (St. Louis, MO, USA). For centrifugation procedures, an Eppendorf 5417R (refrigerated version) and Eppendorf 5403 were used. A spectrophotometer Beckman DU®800 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA), and a SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA) were used for the measurements.

## Animals

Fifteen day-old Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, UFRGS, were used according to sample size calculation with 80% power at the 0.05 level of significance (MiniTab®). We used both male and female rats since they have not yet developed secondary sexual characteristics at the age of the experiments. Rats stayed with their dams until weaning at the 21 days of life. The dams and puppies had free access to water and to a standard commercial chow (Germani, Porto Alegre, RS, Brazil). Temperature was maintained at  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ , with a 12:12 h light/dark cycle. The Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication #85-23, revised 1985) were followed in all the experiments. Animals were equally divided by sex into the groups Sedentary (Sed) and Exercise (Exe), and then subdivided in Saline (SAL) and Hyperphenylalaninemia (HPA).

## Chemically induced HPA

HPA was induced in rats as described by Hagen et al. (2002). Suckling animals received subcutaneous injections of 2.1  $\mu\text{mol}$  Phe plus 1.6  $\mu\text{mol}$  MePhe per gram body weight.

The substances were dissolved in saline by heating. Controls (SAL groups) received equivalent volumes of saline. The model consisted of seventeen injections of MePhe from 15th to 35th day of life. MePhe was administered once a day and Phe two times daily (with a 9 h interval). Rats were killed 14 h after the last injection of Phe.

#### Exercise protocol

At the first 3 days of injections, animals of Exe groups (n=16–20 in each group) were habituated with the treadmill apparatus to minimize novelty stress. Only two rats refused to run and so they were placed in the Sed group. In the 4<sup>th</sup> day, the Exe groups performed the exercise protocol of 14 days of 20 min sessions, between 5:00 and 7:00 p.m. on a motorized rodent treadmill (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brazil) at aerobic intensity of 12 m/min (Meeusen et al. 1996). The non-exercised groups (Sed) were kept into their cages while the Exe groups were running.

#### Tissue preparation

Animals were killed by decapitation without anesthesia and the brain was immediately removed. The olfactory bulbs and pons/medulla were discarded. The rest of the brain (forebrain or cerebrum) was weighted and kept chilled until homogenization. The brain was homogenized and centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4°C, and the supernatant was used for the measurements. Both soleus muscles were also removed, weighted and glycogen measurements were immediately performed.

#### Glycogen content

To measure glycogen, soleus muscles were boiled for 20 min into 1 ml of 30% KOH. After washed with alcohol 70°, an aliquot was collected and added to the color reagent iodine to be read at 460 nm in a spectrophotometer (Krisman 1962).

#### Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS was measured according to Ohkawa et al. (1979). Briefly, to glass tubes samples and reagents were added in the following order: 500  $\mu$ L of tissue supernatant; 50  $\mu$ L of SDS 8.1%; 1500  $\mu$ L of 20% acetic acid in aqueous solution (v/v) pH 3.5; 1500  $\mu$ L of 0.8% thiobarbituric acid; and 700  $\mu$ L 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. TBA-RS were calculated as nmol TBA-RS/mg protein.

#### Superoxide dismutase (SOD) activity assay

The assay of SOD activity was carried out as previous described (Marklund 1985). Cerebral tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 50 mM Tris-HCl buffer containing 1 mM EDTA (pH 8.2). This method is based on capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide radical. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm, using a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001). A calibration curve was performed with purified SOD as standard. A 50% inhibition of pyrogallol autoxidation is defined as one unit of SOD and the specific activity is represented as units per mg protein.

#### Catalase (CAT) activity assay

CAT activity was assayed using a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001). This method is based on the disappearance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL (Aebi 1984). One CAT unit is defined as 1 μmol of hydrogen peroxide consumed/min and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

#### Glutathione peroxidase (GPx) activity assay

GPx activity was measured using tert-butyl-hydroperoxide as substrate (Wendel 1981). NADPH disappearance was monitored at 340 nm using a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001). The medium contained 2 mM glutathione, 0.15 U/mL glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl-hydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GPx unit is defined as 1 μmol of NADPH consumed/min and the specific activity is represented as GPx units/ mg protein.

#### Protein level determination

Protein was measured by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

#### Statistical analysis

After confirmation of normality of data and homogeneity of variances, the statistical analyses were performed by Student's *t*-test or two-way ANOVA followed by the Tukey test for multiple comparisons using the Statistical Package for the Social

Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer. A value of  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

We measured the glycogen content of soleus muscles to verify if 14-day regular exercise was effective, in other words, to check the oxidative impact of the training conducted. The exercised groups showed increased levels of muscle glycogen content ( $t_{(38)}=4.78$ ;  $p < 0.001$ ;  $n=20$  per group) comparing to the sedentary groups (Sed  $1.57 \pm 0.34$  mg/g tissue; and Exe  $2.22 \pm 0.47$  mg/g tissue), showing a peripheral adaptation caused by the aerobic exercise, as was expected. The measurement of lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities were carried out to verify oxidative stress parameters in the brain of rats subjected to HPA model under regular exercise. Representing the products of lipid peroxidation, TBA-RS content (Figure 1) was increased by the HPA condition and this oxidative change was prevented by the regular exercise ( $F_{(3,36)}=10.46$ ,  $p < 0.001$ ). Regarding antioxidant enzymatic defense, we measured the activities of SOD, CAT and GPx, three important enzymes that act in detoxification of superoxide and hydrogen peroxide. Figure 2 shows that SOD activity was increased by HPA model, while regular exercise was able to avoid this alteration ( $F_{(3,36)}=12.35$ ,  $p < 0.001$ ). CAT (Figure 3) and GPx (Figure 4) activities were reduced by HPA and these activities were restored in the regular exercised group ( $F_{(3,28)}=9.18$ ,  $p < 0.001$  and  $F_{(3,28)}=8.59$ ,  $p < 0.001$ , respectively). No statistical differences were found comparing ExeSAL groups to control values (SedSAL group) for all oxidative stress parameters analyzed.

## **Discussion**

HPA has been associated to oxidative stress (Sierra et al. 1998; Hagen et al. 2002; Artuch et al. 2004; Moraes et al. 2010), although its mechanisms are not completely understood. The moderate but continuous increase of phenylalanine levels appears to be harmful even after maturation of the central nervous system of PKU patients (Huijbregts et al. 2002; Sitta et al. 2009), highlighting the need for concomitant strategies additionally to the restricted dietary treatment. Animal studies of HPA (Hagen et al. 2002; Moraes et al. 2010) have shown increased oxidative stress due to decreased activity of enzymes responsible for detoxifying reactive substances in cells. Similar results were also observed in PKU patients and may be related with the impairments of mental health reported (Gassio et al. 2008).

Free radicals and reactive species are normally produced by cell respiration, mainly in the mitochondria, by process of oxidative phosphorylation, but also by various cytosolic enzymes (Balaban et al. 2005). The exercise is certainly a great stressor, increasing the production of free radicals and reactive species in whole body. Sympathoadrenal stimulation triggers a series of reactions to provide energy substrate to active muscles, increasing energy demand and cellular respiration. However, regular and systematic physical exercise can lead to adaptation of the organism, improving peripheral (Pinho et al. 2006) and central aspects (Warburton et al. 2006; Salim et al. 2010). Daily physical training in a treadmill for 14 days has already been described as neuroprotector in rats (Scopel et al. 2006; Cechetti et al. 2008). In addition, this protocol was effective to increase the peripheral oxidative metabolism, as suggested by the highest levels of muscle glycogen content of the exercised rats (Pinho et al. 2006).

Scopel et al. (2006) reported that regular exercise, at correct intensity and load that can provide adaptations, enables the achievement of favorable effects including improvement of the antioxidant system after training. Reactive species formed repeatedly at each exercise session are capable of generating positive adaptations in the antioxidant system of these individuals, facilitating the handling of reactive species at rest and submaximal activities (Powers and Jackson 2008). Thus, individuals who exercise regularly will be able to deal better with the reactive species normally produced.

TBA-RS are a known marker of lipid peroxidation, assessing the products of this process such as malondialdehyde. Concerning PKU model, the findings of this study showed increase damage to lipids in the brain related to high phenylalanine levels, as was expected (Martinez-Cruz et al. 2002; Moraes et al. 2010).

Moreover, regular exercise prevented the increase of TBA-RS in the HPA group. Interestingly, while some authors have found decreased levels of lipid peroxidation in total brain (Coelho et al. 2010) and specific brain areas (Husain and Somani 1998), Aksu et al. (2009) did not find any change in this parameter analyzing different brain areas. All these previous studies were conducted with healthy animals that had exercised for about two months, but using distinct intensities. It seems that the protocol chosen for training influences the adaptation obtained, thus, it is necessary to generate a particular stimuli to achieve a specific adaptation. Hence, the protocol may be responsible for some different results that have been showed in the literature about exercise effects (Radak et al. 2007).

The activity of SOD was increased only in sedentary HPA group comparing to control, which probably may represent an adaptation to enhanced levels of superoxide. Physical exercise did not alter this activity in both exercised groups, probably keeping



the consumption capacity of superoxide. Some authors (Somani et al. 1995; Coelho et al. 2010) found increased activity of SOD in response to physical training in healthy animals, depending of brain areas. Gomez-Cabrera et al. (2008) also found an increase in the expression of SOD in response to physical training achieved by exercising at moderate intensity but not by exhaustive sessions of exercise. Although SOD is an antioxidant enzyme, which represents an important protection of the cells from damage caused by superoxide anion, its increased activity produces hydrogen peroxide, another reactive species that has to be handled by CAT and GPx.

The reduction in activities of CAT and GPx caused by HPA has already been demonstrated (Hagen et al. 2002; Moraes et al. 2010), although the mechanisms are not yet completely clear. These enzymes act converting the hydrogen peroxide, which was probably increased by the increased SOD activity, in water and oxygen. CAT and GPx are especially important for the maintenance of hydrogen peroxide degradation, once this toxic metabolite is one of the main reactive species that leads to imbalance in oxidative system (Halliwell and Gutteridge 2007). In addition, Baud et al. (2004) found that these enzymes act together in a cooperative way in the central nervous system, avoiding the increase of their shared harmful substrate.

Taking together, the increase of SOD activity along with the decrease of CAT and GPx activities observed in sedentary HPA rats was prevented in exercised HPA group (Figure 5). Thus, we can speculate that exercise may avoid the destination of hydrogen peroxide producing hydroxyl radical, which would react with lipids of cell membranes and myelin sheath, as observed in the reduced levels of TBA-RS found when the HPA rats were exercised comparing to sedentary group.

In this study, the stimuli provided by a 14-day aerobic training were not able to change any oxidative stress parameter which can be seen comparing exercised saline

group (ExeSAL) to values of sedentary rats (SedSAL). Although muscle glycogen content was increased, the stimulus of the physical exercise per se was not sufficient to modify the antioxidant system in the brain of healthy rats. On the other hand, the alterations on oxidative stress parameters observed in HPA sedentary rats were prevented by exercise. It can be hypothesized that regular exercise of only 14 days was not able to improve the antioxidant system above the normal condition, but can avoid the decrease found in a pathological condition, as HPA. We cannot rule out that other parameters of oxidative stress not measured in this work were improved by exercise and so helped to maintain oxidative status at normal levels in HPA rats. In addition, these effects may depend on individual characteristics, resulting in different optimal doses of exercise for each subject. Thereby, the HPA condition showed a greater responsiveness to the benefits provided by regular exercise than healthy rats (saline groups).

The study of new therapeutic strategies additionally to the dietary approach may be very helpful for the PKU patient. This study has shown that regular exercise was effective to prevent alterations of some parameters of oxidative stress found in the HPA condition in rats. More studies are necessary to verify the effects of exercise in this pathological condition and the possible benefits using this strategy to contribute to prevent the oxidative stress status in PKU.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

(FAPERGS) and FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net #01.06.0842-00).

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **References**

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126
- Aksu I, Topcu A, Camsari UM, Acikgoz O (2009) Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett* 452: 281-285. DOI: 10.1016/j.neulet.2008.09.029
- Artuch R, Colome 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. DOI: 10.1016/S0009912003001991
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120: 483-495. DOI: 10.1016/j.cell.2005.02.001
- Baud O, Greene AE, Li J, Wang H, Volpe JJ, Rosenberg PA (2004) Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci* 24: 1531-1540. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3989-03.2004
- Cechetti F, Fochesatto C, Scopel D, Nardin P, Goncalves CA, Netto CA, Siqueira IR (2008) Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. *Brain Res* 1188: 182-188

- Coelho BL, Rocha LG, Scarabelot KS, Scheffer DL, Ronsani MM, Silveira PC, Silva LA, Souza CT, Pinho RA (2010) Physical exercise prevents the exacerbation of oxidative stress parameters in chronic kidney disease. *J Ren Nutr* 20: 169-175
- Diamond A, Prevor MB, Callender G, Druin DP (1997) Prefrontal cortex cognitive deficits in children treated early and continuously for PKU. *Monogr Soc Res Child Dev* 62: i-v, 1-208
- Ercal N, Aykin-Burns N, Gurer-Orhan H, McDonald JD (2002) Oxidative stress in a phenylketonuria animal model. *Free Radic Biol Med* 32: 906-911. DOI: S0891584902007815
- Gassio R, Artuch R, Vilaseca MA, Fuste E, Colome R, Campistol J (2008) Cognitive functions and the antioxidant system in phenylketonuric patients. *Neuropsychology* 22: 426-431. DOI: 10.1037/0894-4105.22.4.426
- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Vina J (2008) Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med* 44: 126-131
- Goto S, Naito H, Kaneko T, Chung HY, Radak Z (2007) Hormetic effects of regular exercise in aging: correlation with oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 948-953. DOI: 10.1139/h07-092
- Hagen MEK, Pederzolli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wannmacher CM, Wyse AT, Dutra-Filho CS (2002) Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1586: 344-352. DOI: S0925443901001120
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press

- Heesen C, Romberg A, Gold S, Schulz KH (2006) Physical exercise in multiple sclerosis: supportive care or a putative disease-modifying treatment. *Expert Rev Neurother* 6: 347-355. DOI 10.1586/14737175.6.3.347
- Huijbregts SC, de Sonnevile LM, van Spronsen FJ, Licht R, Sergeant JA (2002) The neuropsychological profile of early and continuously treated phenylketonuria: orienting, vigilance, and maintenance versus manipulation-functions of working memory. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 697-712. DOI S0149763402000404
- Husain K, Somani SM (1998) Effect of exercise training and chronic ethanol ingestion on cholinesterase activity and lipid peroxidation in blood and brain regions of rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22: 411-423. DOI S027858469800013X
- Kohli S, Saxena R, Thomas E, Rao P, Verma IC (2005) Prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Indian J Med Res* 122: 400-403
- Krisman CR (1962) A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal Biochem* 4:17-23
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Marklund SL (1985) Pyrogallol Autoxidation. In: Greenwald RA (ed) *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, pp. 243-247
- 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 Neur Res* 69: 550-558
- Meeusen R, Thorre K, Chaouloff F, Sarre S, De Meirleir K, Ebinger G, Michotte Y (1996) Effects of tryptophan and/or acute running on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in the hippocampus of food-deprived rats. *Brain Res* 740: 245-252

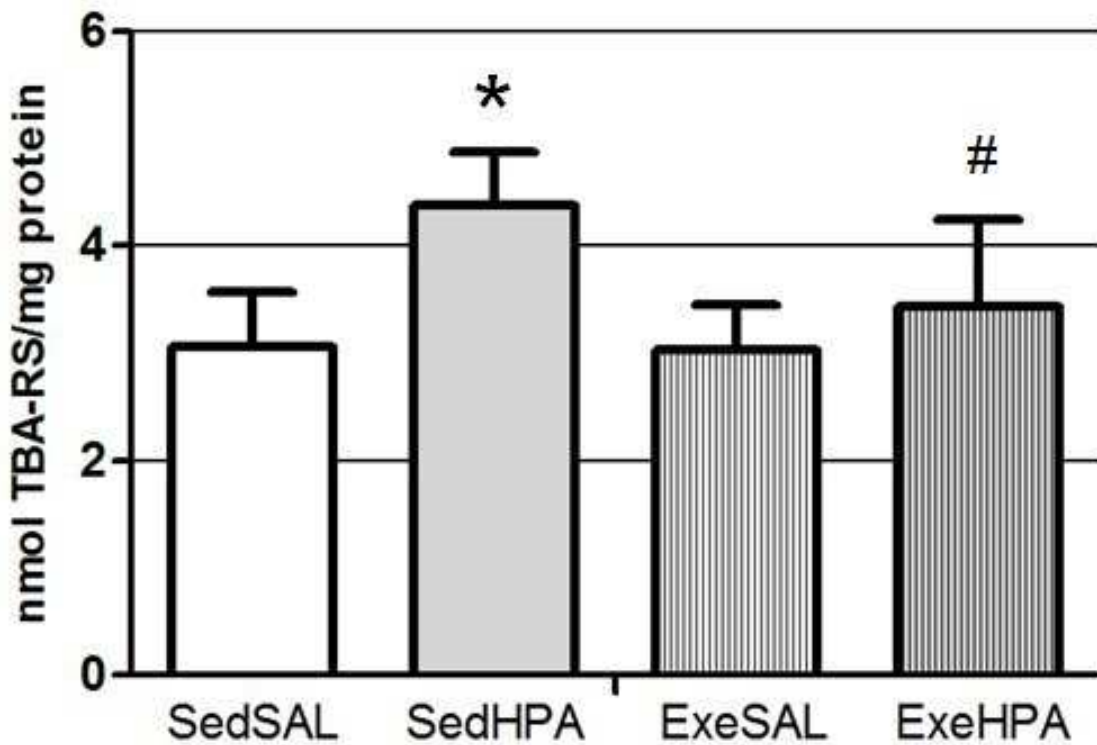
- Moraes TB, Zanin F, da Rosa A, de Oliveira A, Coelho J, Petrillo F, Wajner M, Dutra-Filho CS (2010) Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *J Neurol Sci* 292: 89-95
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358
- Perez-Duenas B, Pujol J, Soriano-Mas C, Ortiz H, Artuch R, Vilaseca MA, Campistol J (2006) Global and regional volume changes in the brains of patients with phenylketonuria. *Neurology* 66: 1074-1078. DOI: 10.1212/01.wnl.0000204415.39853.4a
- Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, Dal-Pizzol F, Moreira JC (2006) Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int* 30: 848-853. DOI: 10.1016/j.cellbi.2006.03.011
- Powers SK, Jackson MJ (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88: 1243-1276
- Radak Z, Kumagai S, Taylor AW, Naito H, Goto S (2007) Effects of exercise on brain function: role of free radicals. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 942-946. DOI: 10.1139/h07-081
- Salim S, Sarraj N, Taneja M, Saha K, Tejada-Simon MV, Chugh G (2010) Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behav Brain Res* 208: 545-552
- Schulpis KH, Papassotiriou I, Vounatsou M, Karikas GA, Tsakiris S, Chrousos GP (2004) Morning preprandial plasma ghrelin and catecholamine concentrations in patients with phenylketonuria and normal controls: evidence for catecholamine-

- mediated ghrelin regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3983-3987. DOI: 10.1210/jc.2004-0311
- Scopel D, Fochesatto C, Cimarosti H, Rabbo M, Bello-Klein A, Salbego C, Netto CA, Siqueira IR (2006) Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull* 71: 155-159
- Sierra C, Vilaseca MA, Moyano D, Brandi N, Campistol J, Lambruschini N, Cambra FJ, Deulofeu R, Mira A (1998) Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin Chim Acta* 276: 1-9. DOI: S0009-8981(98)00091-6
- Sirtori LR, Dutra-Filho CS, Fitarelli D, Sitta A, Haeser A, Barschak AG, Wajner M, Coelho DM, Llesuy S, Bello-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, de Souza CF, Netto C, Wajner M, Vargas CR (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
- Sitta A, Barschak AG, Deon M, Terroso T, Pires R, Giugliani R, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR (2006) Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab Brain Dis* 21: 287-296. DOI: 10.1007/s11011-006-9035-0
- Somani SM, Ravi R, Rybak LP (1995) Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol Biochem Behav* 50: 635-639. DOI: 0091305794003572
- Surtees R, Blau N (2000) The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159 Suppl 2: S109-113

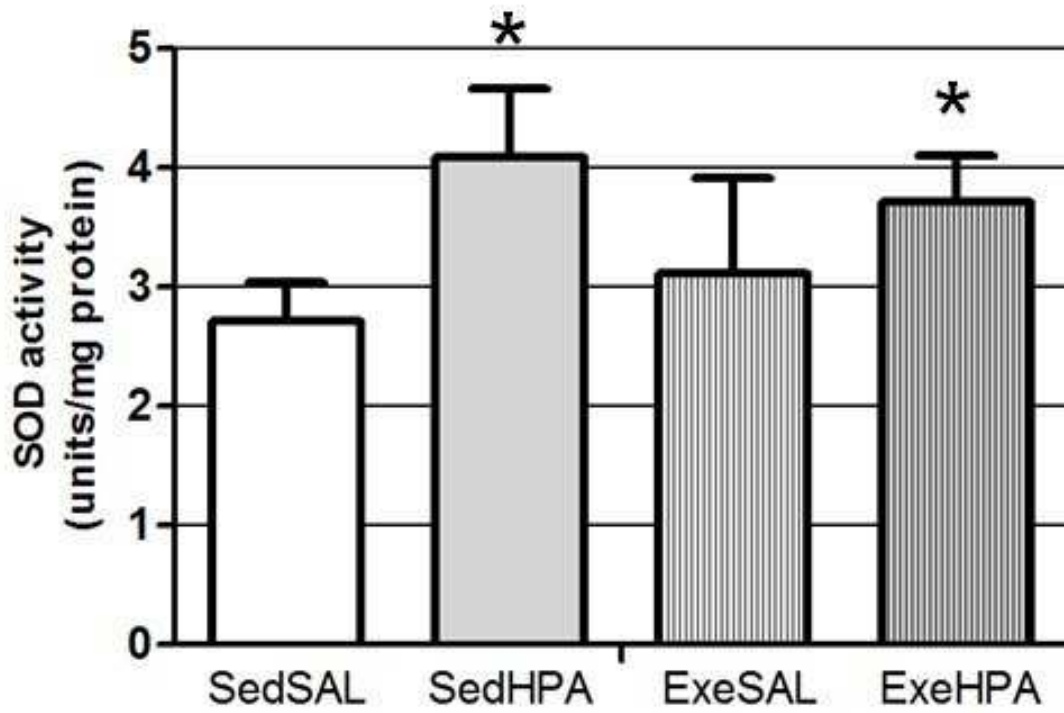
- Um HS, Kang EB, Leem YH, Cho IH, Yang CH, Chae KR, Hwang DY, Cho JY (2008) Exercise training acts as a therapeutic strategy for reduction of the pathogenic phenotypes for Alzheimer's disease in an NSE/APPsw-transgenic model. *Int J Mol Med* 22: 529-539
- Walter JH, White FJ, Hall SK, MacDonald A, Rylance G, Boneh A, Francis DE, Shortland GJ, Schmidt M, Vail A (2002) How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet* 360: 55-57. DOI: S0140673602093340
- Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS (2006) Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ* 174: 801-809
- Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77: 325-333
- White LJ, Castellano V (2008) Exercise and brain health--implications for multiple sclerosis: Part 1--neuronal growth factors. *Sports Med* 38: 91-100



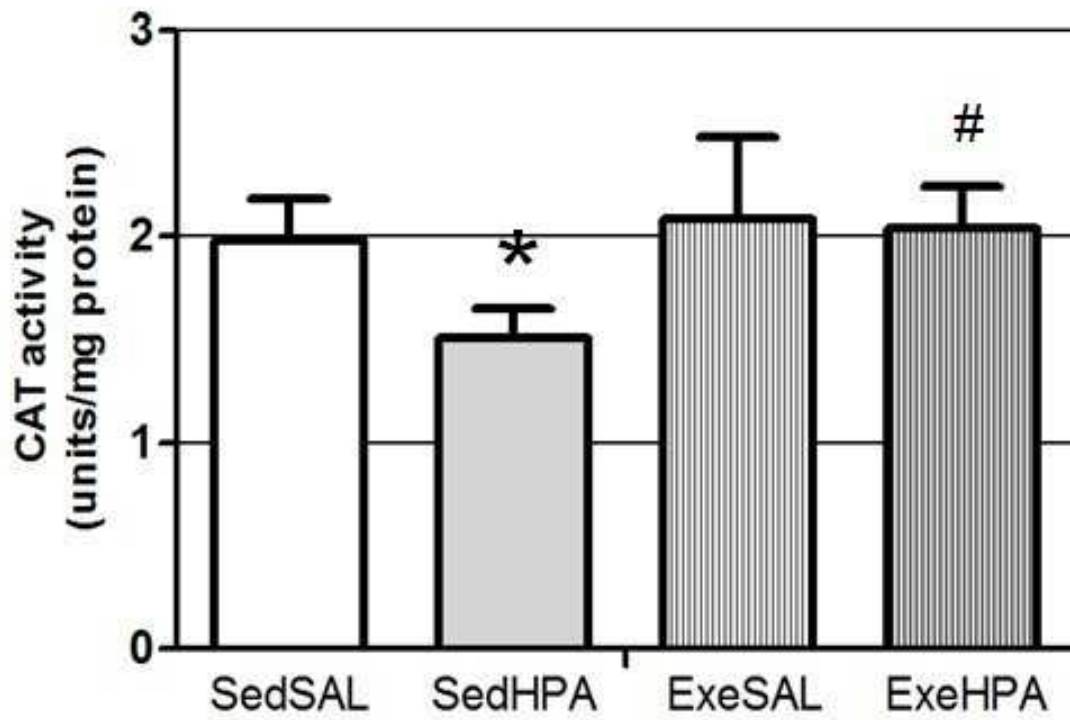
## Figures



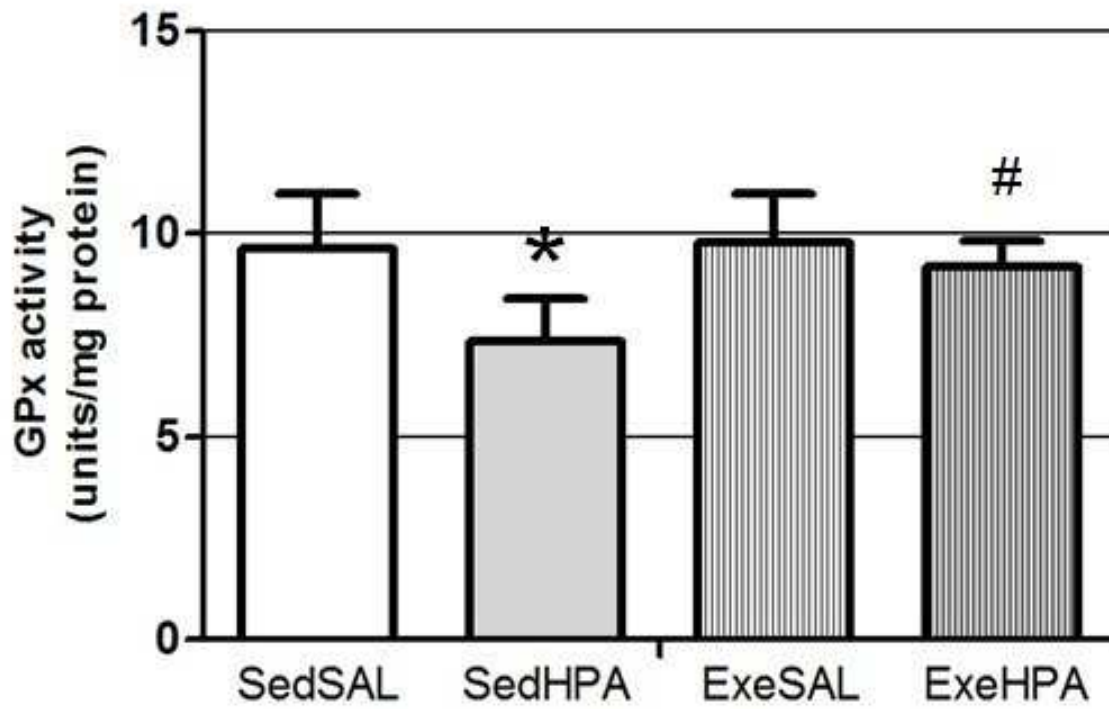
**Fig.1** Effect of regular exercise on the production of thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) in the brain from rats subjected to HPA condition. Results are mean  $\pm$  SD (n=10). \*  $p < 0.001$  compared to SedSAL; #  $p = 0.004$  compared to SedHPA (Tukey test).



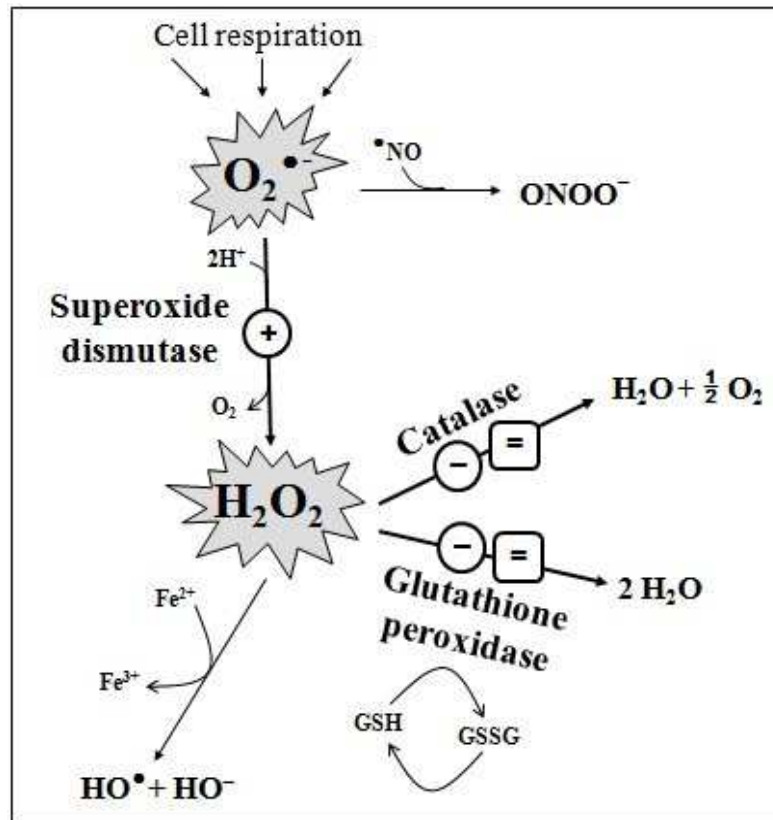
**Fig.2** Effect of regular exercise on superoxide dismutase (SOD) activity in the brain from rats subjected to HPA condition. Results are mean  $\pm$  SD (n=10). \*  $p < 0.002$  compared to SedSAL (Tukey test).



**Fig.3** Effect of regular exercise on catalase (CAT) activity in the brain from rats subjected to HPA condition. Results are mean  $\pm$  SD (n=8). \* p=0.004 compared to SedSAL; # p=0.001 compared to SedHPA (Tukey test).



**Fig.4** Effect of regular exercise on glutathione peroxidase (GPx) activity in the brain from rats subjected to HPA condition. Results are mean  $\pm$  SD (n=8). \* p=0.001 compared to SedSAL; # p=0.011 compared to SedHPA (Tukey test).



**Fig.5** Detoxification pathways of the free radical superoxide anion, provided by tissue metabolism, and the reactive species hydrogen peroxide, forming other less toxic compounds. The effects of HPA on increase or decrease enzymatic activities are showed by cycled + and -, respectively. Regular exercise in HPA rats maintain normal values of catalase and glutathione peroxidase activities (boxed =). These reactions are considered the main enzymatic antioxidant system essential to avoid oxidative stress.

## CAPÍTULO II

Artigo a ser submetido

### ***REGULAR EXERCISE PREVENTS DECREASED SUPRARENAL CATECHOLAMINE AND MEMORY DEFICIT IN HYPERPHENYLALANINEMIC RATS***

Journal of Inherited Metabolic Disease

Manuscript draft

Previsão de submissão: Outubro de 2011

**Regular exercise prevents decreased suprarenal catecholamine and  
memory deficit in hyperphenylalaninemic rats**

Priscila Nicolao Mazzola<sup>2</sup>, Marcelo Cortes<sup>2</sup>, Carlos Jacques<sup>1</sup>, Melaine Terra<sup>1</sup>, Fernanda Bitencourt<sup>1</sup>, Laila Souza<sup>1</sup>, Bruna Piccoli<sup>1</sup>, Julia Silva<sup>1</sup>, Caroline Mescka<sup>2</sup>, Andrea Rosa<sup>2</sup>, Tarsila Moraes<sup>2</sup>, Emerson Casali<sup>1</sup>, Carlos Severo Dutra-Filho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

\* Corresponding author:

Carlos Severo Dutra-Filho  
Departamento de Bioquímica  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo  
90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.  
Telephone number: +55 51 33085575  
Fax number: +55 51 33085535  
E-mail: dutra@ufrgs.br

## **Abstract**

Hyperphenylalaninemia (HPA) causes imbalance of large neutral amino acids (LNAA) uptake into brain and suprarenal glands (SR), reducing neurotransmitters and hormones production. Even early-treated PKU patients show reduced levels of peripheral and brain catecholamine. Regular exercise improves catecholamine production and storage in SR, and dopaminergic system in brain. This study assessed free amino acid levels in blood and brain in an acute HPA animal model, and evaluated the effects of regular exercise in SR catecholamine content, and behavioral performance in chronic HPA. Rats were divided into the following groups: sedentary saline (SedSAL), SedHPA, exercise saline (ExeSAL) and ExeHPA. HPA were induced through administration of alpha-methylphenylalanine plus phenylalanine for 17 days, while SAL groups received saline. Exe groups conducted 14-day aerobic exercise for 20 min/day. At 17<sup>th</sup> day, animals performed the first exposure to the open field test and, 24 hours after, the re-exposure. After this, rats were killed and SR was collected to quantify catecholaminergic content. Amino acids were quantified 1 hour after the injection. Acute HPA model increased phenylalanine and decreased tyrosine in blood and brain, reducing LNAA in the brain. Chronically, HPA reduced SR catecholamine, and impairs habituation memory. Regular exercise prevented catecholamine decrease, and normalized the number of rearing in HPA. Central and peripheral catecholamine impairments can be harmful to health, and 14-day exercise was enough to prevent peripheral decrease, indicating some improve in habitual memory. Regular exercise can be a strategy to restore catecholamine levels in HPA, and these findings highlight the importance to continue evaluating exercise effects in this condition.

Keywords: Phenylketonuria, hyperphenylalaninemia, catecholamine, dopaminergic system, physical exercise



## **Introduction**

The increased levels of phenylalanine found in phenylketonuria (PKU) is described as causing the clinical features of the disease, which is the more frequent error of amino acid metabolism (Walter et al. 2002). Early diagnosis and treatment can avoid the important sequelae of PKU, such as microcephaly, mental retardation, and seizures (Surtees and Blau 2000). Hence, patients have to follow a phenylalanine-restricted diet trying to keep this amino acid near normal levels. Since this diet is so hard to adhere, several patients maintain a poor control of phenylalanine ingestion in the adulthood, which may produce psychological (Gassio et al. 2008) and hormonal (Schulpis et al. 2004) disturbances. Hyperphenylalaninemia (HPA) leads to an imbalance in concentration of the other large neutral amino acids (LNAA) in the brain (Surtees and Blau 2000) and other tissues (Herrero et al. 1983) of PKU patients, even when they are early diagnosed and continuously treated. So, high phenylalanine levels can be responsible for the less uptake of tyrosine by the medullae of suprarenal glands (Schulpis et al. 2005; Fernstrom and Fernstrom 2007), reducing the production of catecholamine due to less availability of its precursor. The same occurs in the brain, where phenylalanine crosses the blood-brain barrier with a more favorable concentration related to tyrosine and so reducing dopamine production (Surtees and Blau 2000; Fernstrom and Fernstrom 2007) which may be related to alterations of cognitive functions (Huijbregts et al. 2002; Prokopova 2010).

Epinephrine and norepinephrine are the main hormones secreted by the adrenals that act in whole body tissues. During an aerobic exercise, these hormones are responsible mainly for lipids mobilization and adequate blood supply for active muscles, producing an increase in metabolic demand, being elevated in peripheral tissues (Smilios et al. 2003) and in the central nervous system (Kitaoka et al. 2010).

Regular exercise can improve the capacity of production and secretion of epinephrine and norepinephrine by adrenal glands (Kjaer et al. 1985; Kjaer and Galbo 1988; Levenson and Moore 1998; Erdem et al. 2002; Desgorces et al. 2004). The brain can also benefit from chronic exercise since a stimulus of production and utilization of dopamine (Fisher et al. 2004; Smith et al. 2011) have been reported in Parkinson disease (Sasco et al. 1992; Dibble et al. 2009). Considering that regular exercise may be a good strategy to restore catecholamine levels in adrenal glands and into the brain, it may also be useful in HPA condition. So, the objective of this study was to verify the effects of regular exercise on suprarenal catecholaminergic content and behavioral performance in the open field test of rats subjected to a chronic model of HPA. We also measure levels of tyrosine and other LNAA in plasma and brain to show the effect of HPA model on these substances.

## **Materials and Methods**

### Reagents and equipments

All chemicals were purchased from Sigma/Aldrich (St. Louis, MO, USA). For centrifugation procedures, an Eppendorf 5417R (refrigerated version) and Eppendorf 5403 were used. A spectrophotometer Beckman DU®800 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA), and a SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA) were used for the measurements.

### Animals

Fifteen and thirty day-old Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, UFRGS, were used according to sample size calculation with 80% power at the 0.05 level of

significance (MiniTab<sup>®</sup>). Rats stayed with their dams until weaning at 21 days of life. Animals had free access to water and to a standard commercial chow (Germani, Porto Alegre, RS, Brazil). Temperature was maintained at 24±1°C, with a 12:12 h light/dark cycle. The Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication #85-23, revised 1985) were followed in all the experiments.

#### Chemically induced HPA

We induced HPA in rats as described by Hagen et al. (2002). Suckling animals received subcutaneous injections of 2.1 µmol phenylalanine plus 1.6 µmol alpha-methylphenylalanine (phenylalanine hydroxylase inhibitor) per gram body weight. The substances were dissolved in saline by heating. Alpha-methylphenylalanine was administered once a day and phenylalanine two times daily (with a 9-h interval). Controls received equivalent volumes of saline. Chronic model consisted of seventeen days of injections (15<sup>th</sup> to 31<sup>th</sup> day of life), and killed 14 h after the last injection of phenylalanine. Acute model consisted of two days of administrations and rats were killed an hour after last injection.

#### Exercise protocol

At the first 3 days of injections, the animals of Exe groups (n=14–20 in each group) were habituated with the treadmill apparatus to minimize novelty stress. In the 4<sup>th</sup> day, Exe groups performed the exercise protocol of 14 days of 20 min sessions (Scopel et al. 2006; Cechetti et al. 2008), between 5:00 and 7:00 p.m., on a motorized rodent treadmill (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brazil) at aerobic intensity of 12 m/min (Meeusen et al. 1996). This protocol was effective to improve muscle glycogen content (Mazzola

et al. 2011) which was in accordance to an aerobic exercise training. Non-exercised groups (Sed) were kept on their cages while Exe groups were running.

#### Behavioral task (Open field)

At the morning of the last day of exercise training, rats were introduced to the open field task for anxiety-like behavior and locomotor activity. Rats were placed at the same place of a black cylinder with 120 cm diameter and allowed to freely explore it for 3 min. Next day (about 24 h later), animals were re-exposed to the task at the same conditions to evaluate the habituation memory (Thiel et al. 1998). The cylinder was virtually demarcated by the software Any-Maze<sup>®</sup> into an inner and outer zone, which was subdivided in more four spaces zones. Distance traveled, number of line crossing, and rearing actions were measured by videotape analyses by the software Any-Maze<sup>®</sup> version 4.63.

#### Catecholamine content

Total catecholamine content (adrenaline and noradrenaline) in the adrenal glands was carried out using the trihydroxyindole fluorescence method (Kelner et al. 1985; Scomparin et al. 2009). Both adrenal glands were removed and homogenized in 350  $\mu$ l 10% acetic acid and centrifuged at 10,000 g for 1 min. Fifty microliters of the supernatant fraction were mixed with 250  $\mu$ l 0.5 M phosphate buffer (pH 7.0) and 25  $\mu$ l potassium ferricyanate 0.5%, followed by 20 min incubation. The reaction was stopped with 500  $\mu$ l ascorbic acid dissolved in NaOH. A standard curve of adrenaline was used to calculate catecholamine content of the samples in a spectrofluorometer (420 nm excitation and 510 nm emission). Data were expressed as  $\mu$ g of catecholamine per gland.

### Amino acids assay

The concentration of free amino acid levels in plasma and brain deproteinized supernatants was determined by HPLC according to Joseph and Marsden (1986). The analysis was performed by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) and fluorescent detection using orthophtaldialdehyde plus mercaptoethanol (HPLC Shimadzu and fluorescence detector Shimadzu RF-535). The flow rate was 1.4 mL/min in a gradient of the mobile phase (methanol and phosphate buffer: buffer A, 20% methanol; buffer B, 80% methanol), and the duration of each analysis was 50 min. The LNAA: phenylalanine, tyrosine, valine, methionine, isoleucine, leucine, histidine, and tryptophan were quantitatively determined by calculating their chromatographic peak areas related to those obtained for a known standard mixture and to that of the internal standard homocysteic acid. Data were expressed as  $\mu\text{M}$ .

### Statistical analysis

After tested proof of normality of data and homogeneity of variances, the statistical analysis was chosen accordingly. Student's t-test, paired t-test, simple linear regression and 2-way ANOVA with Tukey posthoc were performed. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software was employed in a PC-compatible computer. A value of  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

### Results

Regarding the behavioral analysis, the exploratory parameters named distance traveled (Figure 1A), number of line crossing (Figure 1B), and rearing (Figure 1C) and showed similar results for all groups in the first exposure ( $F(3,36)=0.73$ ;  $p=0.543$ ;  $F(3,36)=1.41$ ;  $p=0.255$ , and  $F(3,32)=2.53$ ;  $p=0.075$  respectively). Distance

traveled, number of line crossings and rearing were diminished in re-exposure for SedSAL ( $t(9)=5.51$ ;  $p<0.001$ ;  $t(9)=3.80$ ;  $p=0.004$ ;  $t(9)=8.35$ ;  $p<0.001$ , respectively) and ExeSAL ( $t(9)=7.95$ ;  $p<0.001$ ;  $t(9)=5.12$ ;  $p=0.001$ ;  $t(9)=8.49$ ;  $p<0.001$ , respectively). SedHPA group had no difference between trials ( $t(9)=1.40$ ;  $p=0.194$ ;  $t(9)=0.91$ ;  $p=0.385$ ;  $t(9)=1.20$ ;  $p=0.262$ ). ExeHPA group showed diminished number of rearing in re-exposure ( $t(5)=3.48$ ;  $p=0.018$ ), and no difference in distance traveled ( $t(9)=1.35$ ;  $p=0.210$ ), and in number of line crossing ( $t(9)=1.42$ ;  $p=0.188$ ). In general, the activity was diminished at the re-exposure to the open field test comparing to the first exposure in the control groups (SedSAL and ExeSAL) which demonstrates that rats presented adequate memory habituation. On the other hand, SedHPA group presented no difference comparing re-exposure to first exposure session on all parameters measured. Exercise prevented memory habituation deficit in HPA since rats of ExeHPA group reduced rearing behavior at re-exposure in a similar way to that observed in control groups.

Total catecholamine content of SR glands was altered by the treatments [ $F(3,24)=8.97$ ;  $p<0.001$ ]. Figure 2 shows that sedentary HPA rats presented low levels of catecholamine into SR glands comparing to controls (SedSAL) while exercised HPA group had catecholamine content of SR glands significant elevated comparing to SedHPA rats and these levels were not different from control values (SedSAL and ExeSAL).

Furthermore, we evaluated the acute effect of HPA model on phenylalanine (Figure 3A) and tyrosine (Figure 3B) levels in plasma and brain 1 h after the last administration. Phenylalanine level was increased in plasma [ $t(4)=10.84$ ;  $p<0.001$ ] and in the brain [ $t(4)=5.96$ ;  $p=0.004$ ] of HPA rats. Tyrosine level was decreased in plasma ( $t(4)=4.33$ ;  $p=0.012$ ) and in the brain ( $t(4)=7.81$ ;  $p=0.001$ ) in the same animals. A

negative correlation was found in phenylalanine by tyrosine levels in plasma ( $r=-0.81$ ;  $p=0.015$ ) and brain ( $r=-0.83$ ;  $p=0.011$ ), as shown in Figure 3C. The sum of concentrations of the other LNAA showed no difference in plasma (Figure 4A) [ $t(4)=1.15$ ;  $p=0.314$ ] comparing to control group but was decreased in the brain (Figure 4B) [ $t(4)=4.89$ ;  $p=0.008$ ] of HPA group.

## **Discussion**

Even in early-treated PKU patients, a poor control of the diet can lead to impairments of brain function (Hoeksma et al. 2009). HPA causes disturbance in neurotransmitter and hormone synthesis that have neutral amino acids as precursors since high levels of phenylalanine impair their absorption into tissues. The low uptake of tyrosine into the brain (Knudsen et al. 1995) and adrenal glands (Schulpis et al. 2004) can result in reduced synthesis of dopamine, norepinephrine and epinephrine (Tam and Roth 1997; de Groot et al. 2010). Studies have demonstrated the importance of an adequate production and release of peripheral catecholamine to health by maintaining adequate levels of inflammatory substances (Schulpis et al. 2005) as well as for mood control, which is related to its peripheral secretion (Zeugmann et al. 2010). The adrenal glands are the main source of peripheral catecholamine and their correct function is indispensable to prevent these system disorders, which affect the PKU patients (Huijbregts et al. 2002; Schulpis et al. 2004; De Grandis et al. 2010; de Groot et al. 2010).

In accordance with previous postmortem studies of PKU patients (McKean 1972) and in genetic PKU mice (Smith and Kang 2000), our animal HPA model showed increased phenylalanine and decreased tyrosine concentrations in plasma and brain. Other LNAA were decreased only in the brain, probably due to the hampered

competition by the blood-brain barrier transporters. The recurrent injections of the phenylalanine hydroxylase inhibitor plus the own phenylalanine, has simulated the chronic HPA. Thereby, deficient enzymatic activity to convert phenylalanine into tyrosine leads to diminished tyrosine levels in blood which disfavor its entry into the brain (Binek-Singer and Johnson 1982; Pietz et al. 1999; Surtees and Blau 2000). Due to its high concentration and high affinity to protein transporters of blood-brain barrier (Knudsen et al. 1995), phenylalanine impairs the other LNAA uptake by the brain as shown by the negative correlation of tyrosine and other LNAA concentration to phenylalanine in the brain of HPA rats. Paans et al. (1996) evaluated tyrosine uptake by the brain in early-treated PKU patients, using a labeled tyrosine. These patients showed decreased levels of tyrosine, suggesting that poor precursor availability can hinder catecholamine synthesis in the central nervous system.

Indeed, some authors have been showed decreased plasma catecholamine in PKU patients (Schulpis et al. 2004) and brain catecholamine in animal models (Puglisi-Allegra et al. 2000; Joseph and Dyer 2003; Embury et al. 2007), but the hormone content in its major secretory tissue has not already evaluated. Therefore, with less tyrosine availability, we found decreased catecholamine content in adrenal glands of HPA rats and regular exercise was able to prevent the decreased catecholamine content in adrenal glands. Tumer et al. (1999) reported that, although without a full understanding of the mechanism, an increase in sympathetic activity and consequent increased release of acetylcholine at the endings of the sympathetic chromaffin cells of adrenal medulla eventually increased activity and expression of tyrosine hydroxylase, which is the first enzyme in catecholamine synthesis. In addition, the same researchers (Tumer et al. 2001) analyzed the expression of tyrosine hydroxylase under the influence of physical exercise in rats and found that the mRNA of this enzyme was increased.



Moreover, it is known that rats exposed to chronic mild stress showed hypertrophy of the adrenal medulla, which could be due to an increased production of catecholamines (Ulrich-Lai et al. 2006). As an example of stress, the exercise protocol of 14 days used in this work could also enable this adaptation of the adrenal tissue. Kjaer (1998) found that chronic exercise in rats results a higher concentration of catecholamines into SR glands. Whereas some works (Prokopova 2010; Rief et al. 2010) have been demonstrated that correct levels of peripheral catecholamines are related to behavioral aspects, the present results showing prevention of catecholamines decrease by exercise in HPA could improve behavioral aspects in this condition.

Exploratory behavior can be evaluated by the first exposure of animals to the open field test. These parameters were not modified by neither HPA condition nor regular exercise, demonstrating no anxiety alteration by these treatments (Prut and Belzung 2003). The 24 h re-exposure to the same open field apparatus is related to the habituation memory (Thiel et al. 1998). The habituation is a form of nonassociative memory, which is characterized by decrease of exploration face to a stimulus given in continuous or repeated times, without relation to muscle fatigue or motor impairment (Thompson and Spencer 1966; Grissom and Bhatnagar 2009). This kind of memory is part of the procedural or habit learning and memory system, which is controlled by striatum (Izquierdo et al. 2006). Martynyuk et al. (2010) highlights that this structure receives dopaminergic projections from substantia nigra, which is important for maintenance of accurate behavior flexibility. Therefore, cognition impairments found in patients and animal models of PKU may be related to abnormal activity of dopaminergic system. Regarding the rate of catecholamine utilization in striatum, Landvogt et al. (2008) analyzed a marked 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) in brain of early-treated PKU patients. They found a 41% reduction in the rate of

decarboxylation of L-DOPA. This impairment is found in Parkinson disease and, once PKU patients are asymptomatic, others mechanisms might be involved to maintenance of correct motor function. In a model of schizophrenia, the destruction of dopaminergic neurons led to impairments in behavioral tests (Li et al. 2010), demonstrating the importance of this system for the cognitive function. Kaplan et al. (1981) investigated the effects of a rat model of PKU on behavioral parameters. They found that PKU model led to hypoactivity and learning deficits. Studies that used the genetic model of PKU (*Pah<sup>enu2</sup>* mice), have found flawed latent memory (Tang et al. 1999), short-term and reference memory, habit learning, and memory for a visual stimulus (Zagreda et al. 1999; Sarkissian et al. 2000). Our results corroborate with previous studies that HPA leads to impairments in cognitive function (Smith et al. 1988; Banerjee et al. 2011) (Pietz et al. 1997; ten Hoedt et al. 2011), and impairments of catecholamine system may probably be involved. Furthermore, regular exercise was able to prevent habituation memory impairment of HPA rats, observed by rearing response in behavioral test. This exploratory parameter is especially useful to evaluate memory habituation due to its importance in information-gathering in environmental novelty (Lever et al. 2006).

Regular exercise has been widely studied due to its benefits observed for normal and special population. We demonstrated that regular exercise was able to prevent the decreased content of catecholamine in its main secretory tissue and improving habituation memory in a HPA animal model. If the present results were also observed in humans, patients with PKU can take advantage of this strategy as a complementary therapy to the restrictive diet. These results reinforce the interest to extend the evaluation of the effects of exercise in hyperphenylalaninemia.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net #01.06.0842-00).

## **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## **References**

- Banerjee P, Grange DK, Steiner RD, White DA. 2011. Executive strategic processing during verbal fluency performance in children with phenylketonuria. *Child Neuropsychol* 17: 105-117.
- Binek-Singer P, Johnson TC. 1982. The effects of chronic hyperphenylalaninaemia on mouse brain protein synthesis can be prevented by other amino acids. *Biochem J* 206: 407-414.
- Cechetti F, Fochesatto C, Scopel D, Nardin P, Goncalves CA, Netto CA, Siqueira IR. 2008. Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. *Brain Res* 1188: 182-188.
- De Grandis E, et al. 2010. Cerebrospinal fluid alterations of the serotonin product, 5-hydroxyindolacetic acid, in neurological disorders. *J Inherit Metab Dis* 33: 803-809.

- de Groot MJ, Hoeksma M, Blau N, Reijngoud DJ, van Spronsen FJ. 2010. Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of hypotheses. *Mol Genet Metab* 99 Suppl 1: S86-89.
- Desgorces FD, Chennaoui M, Gomez-Merino D, Drogou C, Bonneau D, Guezennec CY. 2004. Leptin, catecholamines and free fatty acids related to reduced recovery delays after training. *Eur J Appl Physiol* 93: 153-158.
- Dibble LE, Addison O, Papa E. 2009. The effects of exercise on balance in persons with Parkinson's disease: a systematic review across the disability spectrum. *J Neurol Phys Ther* 33: 14-26.
- Embury JE, Charron CE, Martynyuk A, Zori AG, Liu B, Ali SF, Rowland NE, Laipis PJ. 2007. PKU is a reversible neurodegenerative process within the nigrostriatum that begins as early as 4 weeks of age in Pah(enu2) mice. *Brain Res* 1127: 136-150.
- Erdem SR, Demirel HA, Broxson CS, Nankova BB, Sabban EL, Tumer N. 2002. Effect of exercise on mRNA expression of select adrenal medullary catecholamine biosynthetic enzymes. *J Appl Physiol* 93: 463-468.
- Fernstrom JD, Fernstrom MH. 2007. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr* 137: 1539S-1547S; discussion 1548S.
- Fisher BE, Petzinger GM, Nixon K, Hogg E, Bremmer S, Meshul CK, Jakowec MW. 2004. Exercise-induced behavioral recovery and neuroplasticity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse basal ganglia. *J Neurosci Res* 77: 378-390.
- Gassio R, Artuch R, Vilaseca MA, Fuste E, Colome R, Campistol J. 2008. Cognitive functions and the antioxidant system in phenylketonuric patients. *Neuropsychology* 22: 426-431.

- Grissom N, Bhatnagar S. 2009. Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiol Learn Mem* 92: 215-224.
- Hagen MEK, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wannmacher CM, Wyse AT, Dutra-Filho CS. 2002. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1586: 344-352.
- Herrero E, Aragon MC, Gimenez C, Valdivieso F. 1983. Inhibition by L-phenylalanine of tryptophan transport by synaptosomal plasma membrane vesicles: implications in the pathogenesis of phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 6: 32-35.
- Hoeksma M, Reijngoud DJ, Pruijm J, de Valk HW, Paans AM, van Spronsen FJ. 2009. Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. *Mol Genet Metab* 96: 177-182.
- Huijbregts SC, de Sonnevile LM, van Spronsen FJ, Licht R, Sergeant JA. 2002. The neuropsychological profile of early and continuously treated phenylketonuria: orienting, vigilance, and maintenance versus manipulation-functions of working memory. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 697-712.
- Izquierdo I, Bevilacqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Da Silva WC, Medina JH, Cammarota M. 2006. The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: a review of recent findings. *Neurotox Res* 10: 113-121.
- Joseph B, Dyer CA. 2003. Relationship between myelin production and dopamine synthesis in the PKU mouse brain. *J Neurochem* 86: 615-626.
- Joseph MH, Marsden CA. 1986. Amino acids and small peptides. Pages 13-27 in LIM CK, ed. *HPLC of small peptides.*, Oxford.

- Kaplan H, Triano T, Donadio M. 1981. Behavioral deficit in phenylketonuric rats: role of aromatic acid metabolites of phenylalanine. *Dev Psychobiol* 14: 201-207.
- Kelner KL, Levine RA, Morita K, Pollard HB. 1985. A comparison of trihydroxyindole and HPLC/electrochemical methods for catecholamine measurement in adrenal chromaffin cells. *Neurochem Int* 7: 373-378.
- Kitaoka R, Fujikawa T, Miyaki T, Matsumura S, Fushiki T, Inoue K. 2010. Increased noradrenergic activity in the ventromedial hypothalamus during treadmill running in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 56: 185-190.
- Kjaer M. 1998. Adrenal medulla and exercise training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 77: 195-199.
- Kjaer M, Galbo H. 1988. Effect of physical training on the capacity to secrete epinephrine. *J Appl Physiol* 64: 11-16.
- Kjaer M, Christensen NJ, Sonne B, Richter EA, Galbo H. 1985. Effect of exercise on epinephrine turnover in trained and untrained male subjects. *J Appl Physiol* 59: 1061-1067.
- Knudsen GM, Hasselbalch S, Toft PB, Christensen E, Paulson OB, Lou H. 1995. Blood-brain barrier transport of amino acids in healthy controls and in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 18: 653-664.
- Landvogt C, et al. 2008. Reduced cerebral fluoro-L-dopamine uptake in adult patients suffering from phenylketonuria. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 824-831.
- Levenson CW, Moore JB. 1998. Response of rat adrenal neuropeptide Y and tyrosine hydroxylase mRNA to acute stress is enhanced by long-term voluntary exercise. *Neurosci Lett* 242: 177-179.
- Lever C, Burton S, O'Keefe J. 2006. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev Neurosci* 17: 111-133.

- Li Z, Boules M, Williams K, Gordillo A, Li S, Richelson E. 2010. Similarities in the behavior and molecular deficits in the frontal cortex between the neurotensin receptor subtype 1 knockout mice and chronic phencyclidine-treated mice: relevance to schizophrenia. *Neurobiol Dis* 40: 467-477.
- Martynyuk AE, van Spronsen FJ, Van der Zee EA. 2010. Animal models of brain dysfunction in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 99 Suppl 1: S100-105.
- Mazzola PN, Terra M, Rosa AP, Mescka CP, Moraes TB, Piccoli B, Jacques CE, Dalazen G, Cortes MX, Coelho J, Dutra-Filho CS. 2011. Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. *Metab Brain Dis* IN PRESS.
- McKean CM. 1972. The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism in the human brain. *Brain Res* 47: 469-476.
- Meeusen R, Thorre K, Chaouloff F, Sarre S, De Meirleir K, Ebinger G, Michotte Y. 1996. Effects of tryptophan and/or acute running on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in the hippocampus of food-deprived rats. *Brain Res* 740: 245-252.
- Paans AM, Pruijm J, Smit GP, Visser G, Willemsen AT, Ullrich K. 1996. Neurotransmitter positron emission tomographic-studies in adults with phenylketonuria, a pilot study. *Eur J Pediatr* 155 Suppl 1: S78-81.
- Pietz J, Fatkenheuer B, Burgard P, Armbruster M, Esser G, Schmidt H. 1997. Psychiatric disorders in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Pediatrics* 99: 345-350.
- Pietz J, Kreis R, Rupp A, Mayatepek E, Rating D, Boesch C, Bremer HJ. 1999. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest* 103: 1169-1178.
- Prokopova I. 2010. [Noradrenaline and behavior]. *Cesk Fysiol* 59: 51-58.

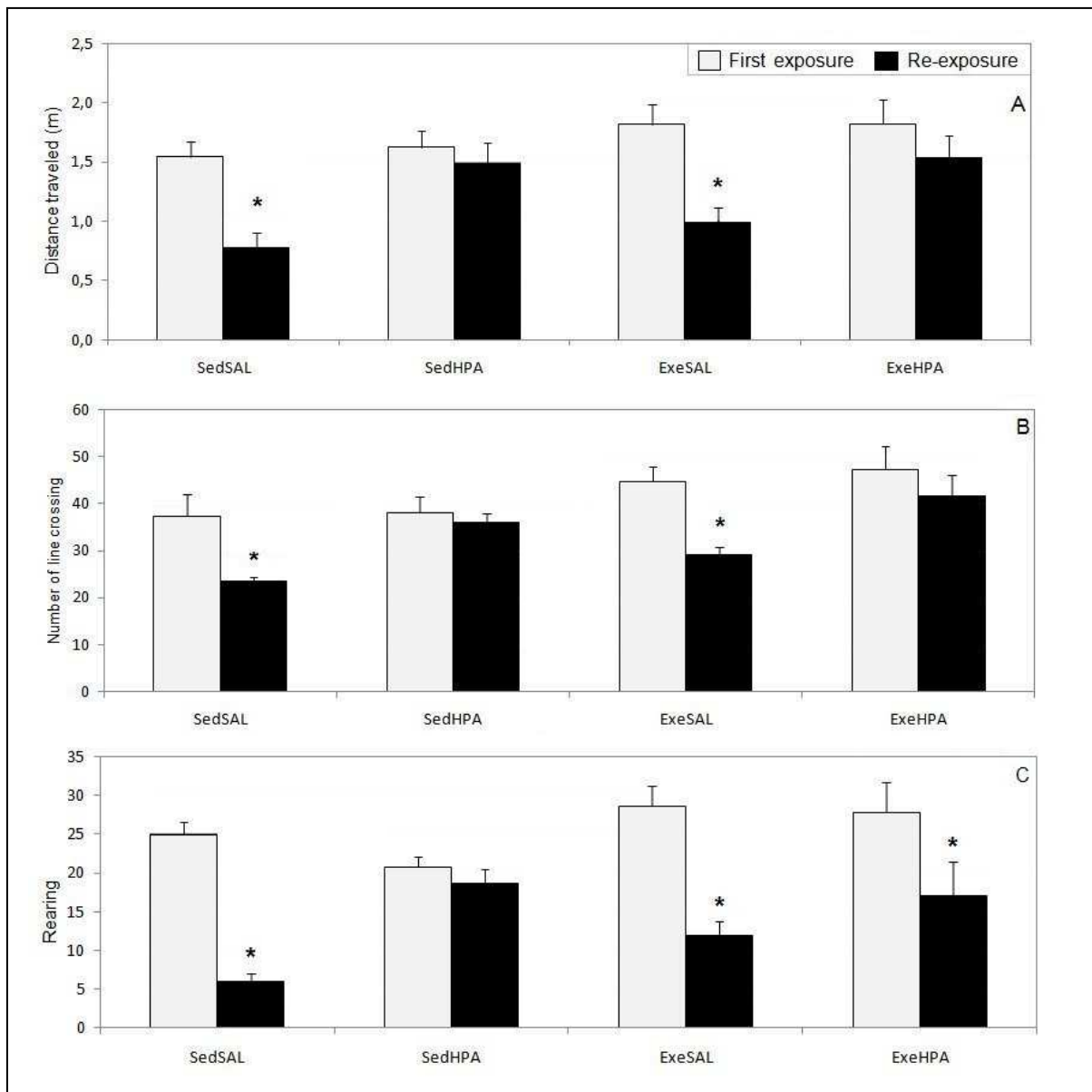
- Prut L, Belzung C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463: 3-33.
- Puglisi-Allegra S, Cabib S, Pascucci T, Ventura R, Cali F, Romano V. 2000. Dramatic brain aminergic deficit in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport* 11: 1361-1364.
- Rief W, Mills PJ, Ancoli-Israel S, Ziegler MG, Pung MA, Dimsdale JE. 2010. Overnight changes of immune parameters and catecholamines are associated with mood and stress. *Psychosom Med* 72: 755-762.
- Sarkissian CN, Boulais DM, McDonald JD, Scriver CR. 2000. A heteroallelic mutant mouse model: A new orthologue for human hyperphenylalaninemia. *Mol Genet Metab* 69: 188-194.
- Sasco AJ, Paffenbarger RS, Jr., Gendre I, Wing AL. 1992. The role of physical exercise in the occurrence of Parkinson's disease. *Arch Neurol* 49: 360-365.
- Schulpis KH, Papassotiriou I, Tsakiris S, Vounatsou M, Chrousos GP. 2005. Increased plasma adiponectin concentrations in poorly controlled patients with phenylketonuria normalize with a strict diet: evidence for catecholamine-mediated adiponectin regulation and a complex effect of phenylketonuria diet on atherogenesis risk factors. *Metabolism* 54: 1350-1355.
- Schulpis KH, Papassotiriou I, Vounatsou M, Karikas GA, Tsakiris S, Chrousos GP. 2004. Morning preprandial plasma ghrelin and catecholamine concentrations in patients with phenylketonuria and normal controls: evidence for catecholamine-mediated ghrelin regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3983-3987.
- Scomparin DX, Gomes RM, Grassioli S, Rinaldi W, Martins AG, de Oliveira JC, Gravena C, de Freitas Mathias PC. 2009. Autonomic activity and glycemic



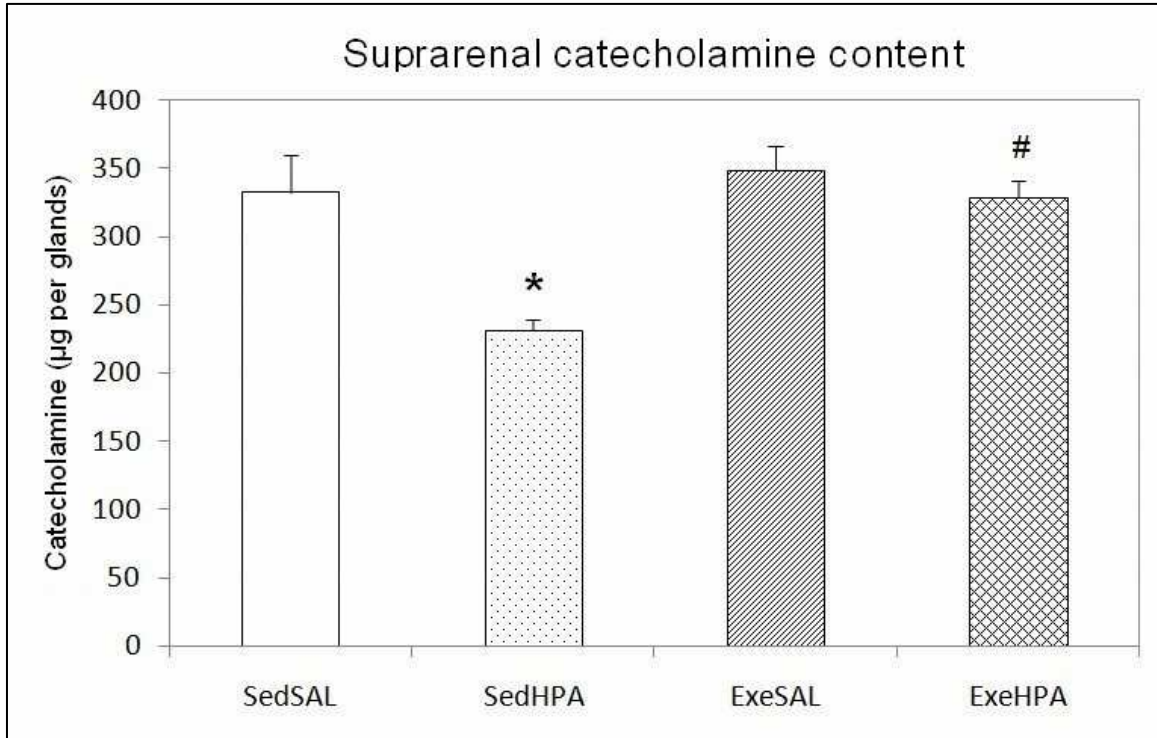
- homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. *Endocrine* 36: 510-517.
- Scopel D, Fochesatto C, Cimarosti H, Rabbo M, Bello-Klein A, Salbego C, Netto CA, Siqueira IR. 2006. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull* 71: 155-159.
- Smilios I, Pilianidis T, Karamouzis M, Tokmakidis SP. 2003. Hormonal responses after various resistance exercise protocols. *Med Sci Sports Exerc* 35: 644-654.
- Smith BA, Goldberg NR, Meshul CK. 2011. Effects of treadmill exercise on behavioral recovery and neural changes in the substantia nigra and striatum of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse. *Brain Res*.
- Smith CB, Kang J. 2000. Cerebral protein synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11014-11019.
- Smith I, Beasley MG, Wolff OH, Ades AE. 1988. Behavior disturbance in 8-year-old children with early treated phenylketonuria. Report from the MRC/DHSS Phenylketonuria Register. *J Pediatr* 112: 403-408.
- Surtees R, Blau N. 2000. The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159 Suppl 2: S109-113.
- Tam SY, Roth RH. 1997. Mesoprefrontal dopaminergic neurons: can tyrosine availability influence their functions? *Biochem Pharmacol* 53: 441-453.
- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ. 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401: 63-69.
- ten Hoedt AE, de Sonnevile LM, Francois B, ter Horst NM, Janssen MC, Rubio-Gozalbo ME, Wijburg FA, Hollak CE, Bosch AM. 2011. High phenylalanine levels directly affect mood and sustained attention in adults with

- phenylketonuria: a randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Inherit Metab Dis* 34: 165-171.
- Thiel CM, Huston JP, Schwarting RK. 1998. Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience* 85: 1253-1262.
- Thompson RF, Spencer WA. 1966. Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol Rev* 73: 16-43.
- Tumer N, Broxson CS, LaRochelle JS, Scarpace PJ. 1999. Induction of tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y by carbachol: modulation with age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54: B418-423.
- Tumer N, Demirel HA, Serova L, Sabban EL, Broxson CS, Powers SK. 2001. Gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes following exercise: modulation by age. *Neuroscience* 103: 703-711.
- Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP. 2006. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E965-973.
- Walter JH, White FJ, Hall SK, MacDonald A, Rylance G, Boneh A, Francis DE, Shortland GJ, Schmidt M, Vail A. 2002. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet* 360: 55-57.
- Zagreda L, Goodman J, Druin DP, McDonald D, Diamond A. 1999. Cognitive deficits in a genetic mouse model of the most common biochemical cause of human mental retardation. *J Neurosci* 19: 6175-6182.
- Zeugmann S, Quante A, Heuser I, Schwarzer R, Anghelescu I. 2010. Inflammatory biomarkers in 70 depressed inpatients with and without the metabolic syndrome. *J Clin Psychiatry* 71: 1007-1016.

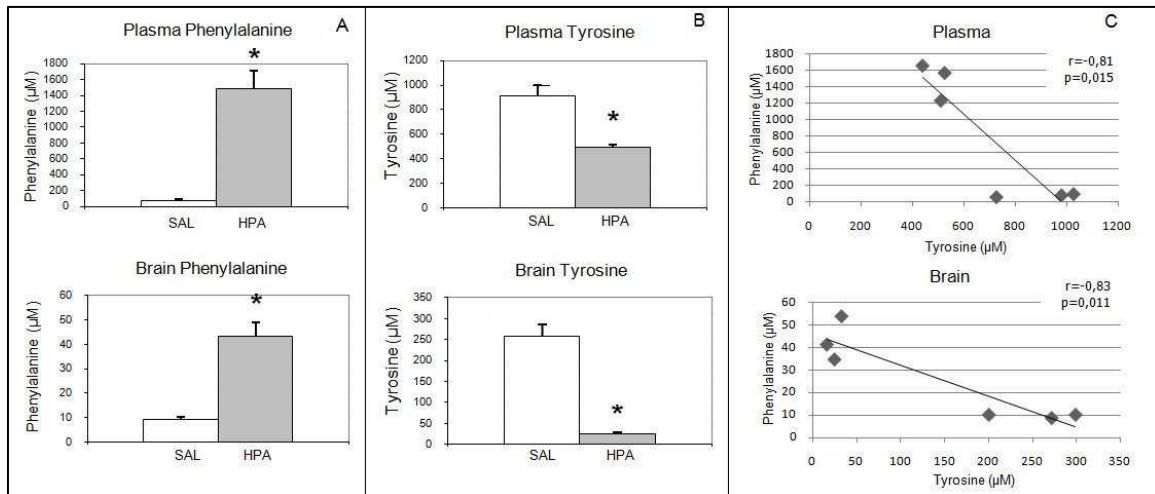
## Figures



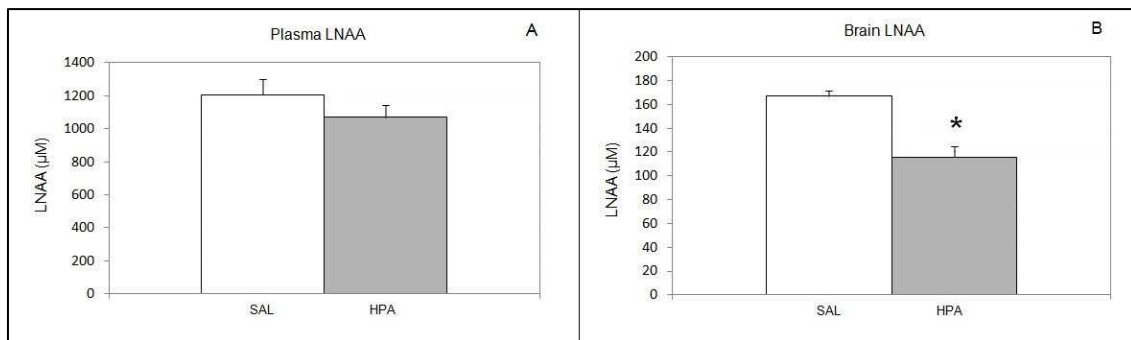
**Figure 1** Effect of Hyperphenylalaninemia (HPA) and regular exercise (Exe) on (A) distance traveled, (B) number of line crossing and (C) rearing of first exposure and re-exposure in the open field test. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=6-10). \*  $p < 0.05$  compared to the first exposure (paired t-test).



**Figure 2** Effect of chronic HPA and regular exercise on catecholamine content in the suprarenal glands. Data are expressed by mean  $\pm$  S.E.M. (n=7), \*  $p < 0.01$  compared to Sedentary Saline (SedSAL); #  $p < 0.01$  compared to Sedentary Hyperphenylalaninemia (SedHPA) (Tukey test).



**Figure 3** Phenylalanine (A) and tyrosine (B) concentrations and their correlation (C) in the brain and plasma of acute Hyperphenylalaninemia (HPA) in rats. Data are expressed by mean  $\pm$  S.E.M. (n=3), \*  $p < 0.05$  compared to Saline (SAL).



**Figure 4** Effect of acute Hyperphenylalaninemia (HPA) in plasma (A) and in the brain (B) on total concentration of other large neutral amino acids (LNAA): valine, methionine, isoleucine, leucine, histidine, and triptophan ( $\mu\text{M}$ ). Data are expressed by mean  $\pm$  S.E.M. (n=3), \*  $p < 0.01$  compared to Saline (SAL).

## Parte III

## DISCUSSÃO

O estado hiperfenilalaninêmico, característico da PKU, gera desequilíbrios no sistema oxidativo e na captação de aminoácidos pelos tecidos. O estresse oxidativo, encontrado nesta condição, sugere que a maior produção de ERO e a diminuição dos agentes antioxidantes estejam envolvidas na fisiopatologia da doença (Wajner et al. 2004). Além disso, o aumento da fenilalanina prejudica a concentração relativa dos outros LNAA em plasma e cérebro, diminuindo a sua captação para síntese de hormônios e neurotransmissores (Tam e Roth 1997).

Estudos anteriores em nosso laboratório já demonstraram que o modelo de PKU utilizado resulta em aumento dos parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos (Moraes et al. 2010, Hagen et al. 2002). Em pacientes, são encontrados decréscimos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em plasma e eritrócitos (Artuch et al. 2004, Sierra et al. 1998, Sirtori et al. 2005, Sitta et al. 2006). As ERO são normalmente produzidas pela respiração celular, principalmente nas mitocôndrias, pelo processo de fosforilação oxidativa, mas também por várias enzimas citosólicas (Balaban, Nemoto e Finkel 2005). O exercício é certamente um grande estressor, aumentando a produção de ERO em todos os tecidos e sistemas. O estímulo simpático desencadeia uma série de reações para fornecer substrato energético para os músculos ativos, aumentando a demanda energética e a respiração celular. No entanto, a prática regular e sistemática de exercícios físicos pode levar à adaptação do organismo, aprimorando aspectos periféricos (Pinho et al. 2006) e centrais (Warburton, Nicol e Bredin 2006, Salim et al. 2010). Em ratos, o treinamento físico diário em esteira por 14 dias já foi



descrito como neuroprotetor (Scopel et al. 2006, Cechetti et al. 2008). Além disto, este protocolo foi eficaz para aumentar o metabolismo oxidativo periférico, como sugerido pelos altos níveis de glicogênio muscular dos ratos exercitados, corroborando achados anteriores (Pinho et al. 2006). Scopel e colaboradores (2006) relataram que o exercício regular, na intensidade correta, pode proporcionar adaptações favoráveis, como a melhoria do sistema antioxidante após o treinamento. A exposição repetida à grande quantidade de ERO formadas em cada sessão de treino é capaz de aumentar o sistema antioxidante desses indivíduos, facilitando o manejo destes compostos tóxicos em repouso e em atividades submáximas (Powers e Jackson 2008). Assim, os indivíduos que regularmente se exercitam são capazes de lidar melhor com as ERO produzidas normalmente.

O conteúdo de TBA-RS é um conhecido marcador de lipoperoxidação, permitindo avaliar produtos deste processo, tais como o malondialdeído. Acerca do modelo PKU, os resultados deste estudo mostraram aumento de dano a lipídios no cérebro relacionados com altos níveis de fenilalanina, como já era esperado (Martinez-Cruz et al. 2002, Moraes et al. 2010). Além disto, o exercício regular impediu o aumento de TBA-RS no grupo HPA. Curiosamente, enquanto alguns autores encontraram diminuição dos níveis de lipoperoxidação no cérebro total (Coelho et al. 2010) e em áreas específicas do cérebro (Husain e Somani 1998), Aksu e colaboradores (2009) não encontraram qualquer mudança nesse parâmetro ao analisar diferentes áreas cerebrais. Todos estes estudos anteriores foram realizados com animais saudáveis que se exercitaram por cerca de dois meses, porém utilizando intensidades distintas. O protocolo escolhido para o treinamento parece

influenciar a adaptação obtida e, portanto, é necessário gerar um estímulo específico para se alcançar uma adaptação específica. Deste modo, o protocolo pode ser responsável por alguns resultados diferentes que são encontrados na literatura sobre os efeitos do exercício regular (Radak et al. 2007).

A atividade da SOD foi aumentada apenas nos grupos HPA, o que provavelmente pode representar uma adaptação a níveis elevados de ânion superóxido. O treinamento físico não alterou a atividade dessa enzima em ambos os grupos exercitados, provavelmente mantendo a capacidade de consumo de superóxido. Alguns autores (Somani, Ravi e Rybak 1995, Coelho et al. 2010) encontraram aumento da atividade da SOD em resposta ao exercício regular em animais saudáveis, dependendo da área do cérebro investigada. Ademais, Gomez-Cabrera e colaboradores (2008) encontraram aumento na expressão da SOD em resposta ao treinamento físico de intensidade moderada, o que não ocorreu quando os animais foram submetidos a sessões exaustivas de treino. Apesar de ser uma enzima antioxidante, o que representa uma importante proteção celular a danos provocados pelo superóxido, a atividade aumentada da SOD produz peróxido de hidrogênio, outra ERO que deve ser convertida pela CAT ou GPx a produtos menos tóxicos.

A redução nas atividades da CAT e da GPx causada pela HPA já foi demonstrada anteriormente (Hagen et al. 2002, Moraes et al. 2010), apesar dos mecanismos ainda não serem completamente conhecidos. Essas enzimas agem convertendo o peróxido de hidrogênio, que estava provavelmente aumentado devido à intensa atividade da SOD, em água e oxigênio. A CAT e a

GPx são especialmente importantes para a manutenção da degradação de peróxido de hidrogênio, uma vez que este metabólito tóxico é uma das principais espécies reativas que leva a um desequilíbrio no sistema oxidativo (Halliwell e Gutteridge 2007). Além disto, Baud e colaboradores (2004) relataram que essas enzimas agem em conjunto de forma cooperativa no sistema nervoso central, evitando o aumento prejudicial de seu substrato comum.

A diminuição das atividades da CAT e da GPx, observadas nos ratos SedHPA, foram prevenidas no grupo exercitado (ExeHPA). Portanto, podemos especular que o exercício evitou que o peróxido de hidrogênio reagisse com os lipídios das membranas celulares e da bainha de mielina, como observado na redução dos níveis de TBA-RS encontrados quando os ratos HPA foram exercitados, em comparação ao grupo sedentário.

Neste estudo, os estímulos fornecidos pelo treinamento aeróbico de 14 dias não foram capazes de alterar nenhum parâmetro de estresse oxidativo entre os animais controles, que pode ser verificado comparando o grupo exercitado (ExeSAL) aos valores do seu respectivo sedentário (SedSAL). Apesar do aumento no conteúdo de glicogênio muscular, o estímulo do exercício físico em si não foi suficiente para modificar o sistema antioxidante no cérebro de ratos saudáveis. Por outro lado, as alterações nos parâmetros de estresse oxidativo observadas em ratos SedHPA foram prevenidas pelo exercício. Assim, a condição HPA mostrou uma maior susceptibilidade aos benefícios fornecidos pelo exercício regular do que os ratos saudáveis (grupos salina).

Além dos parâmetros de estresse oxidativo alterados, a PKU é caracterizada por déficits cognitivos relacionados com prejuízos do sistema catecolaminérgico (Huijbregts et al. 2002). A HPA causa distúrbios na síntese de hormônios e neurotransmissores que possuem LNAA como precursores, uma vez que o alto nível de fenilalanina prejudica a sua absorção nos tecidos. Mesmo em pacientes precocemente tratados, o descuido na dieta pode levar à deficiência da função cognitiva (Hoeksma et al. 2009). A menor captação de tirosina pelo sistema dopaminérgico no cérebro (Knudsen et al. 1995), bem como nas glândulas adrenais (Schulpis et al. 2004) pode resultar em redução da síntese de dopamina, noradrenalina e adrenalina (Tam e Roth 1997, de Groot et al. 2010). Alguns pesquisadores tem demonstrado a importância da produção adequada das catecolaminas periféricas para a saúde, tanto pela manutenção dos níveis de substâncias relacionadas a processos inflamatórios (Schulpis et al. 2005), como para o controle de humor (Zeugmann et al. 2010). As SR são a principal fonte de catecolaminas periféricas e seu correto funcionamento é indispensável para evitar esses distúrbios sistêmicos, que afetam os pacientes de PKU (Huijbregts et al. 2002, Schulpis et al. 2004, De Grandis et al. 2010, de Groot et al. 2010).

Assim como em estudos anteriores *postmortem* em pacientes de PKU (McKean 1972) e em camundongos geneticamente modificados para a doença (Smith e Kang 2000), o nosso modelo animal de HPA levou ao aumento da concentração de fenilalanina no plasma e no cérebro, ao passo que diminuiu a de tirosina em ambas as amostras analisadas uma hora após a administração da injeção. Os outros LNAA foram reduzidos apenas no cérebro, provavelmente devido à desfavorável concorrência na barreira

hematoencefálica. As injeções recorrentes do inibidor da PAH juntamente com a própria fenilalanina, simularam a HPA crônica. Assim, a carência na atividade enzimática para converter fenilalanina em tirosina, levou ao menor nível de tirosina no sangue e, provavelmente, prejudicou sua entrada no cérebro (Binek-Singer e Johnson 1982, Pietz et al. 1999, Surtees e Blau 2000). Em maior concentração e com mais afinidade aos transportadores de proteína da barreira hematoencefálica (Knudsen et al. 1995), a fenilalanina prejudica a absorção dos outros LNAA, como verificado na correlação negativa com tirosina e outros LNAA no cérebro dos ratos com HPA aguda. A fim de verificar as causas da menor produção de catecolaminas, Paans e colaboradores (1996) avaliaram a captação de tirosina pelo cérebro em pacientes de PKU tratados precocemente, usando o aminoácido marcado. Estes indivíduos apresentaram diminuição dos níveis de tirosina, provando que a disponibilidade do precursor pode levar a menor síntese de catecolaminas no sistema nervoso central.

Deste modo, com a menor disponibilidade de tirosina, encontramos um menor conteúdo de catecolaminas nas SR dos ratos hiperfenilalanêmicos. Alguns autores tem encontrado menores níveis de catecolaminas plasmáticas em pacientes de PKU (Schulpis et al. 2004) e catecolaminas no cérebro em modelos animais da doença (Puglisi-Allegra et al. 2000, Joseph e Dyer 2003, Embury et al. 2007), porém nenhum estudo ainda havia avaliado o conteúdo deste hormônio em seu órgão secretor principal. O exercício físico regular foi capaz de impedir a redução do conteúdo de catecolaminas nas SR. Tumer e colaboradores (1999) relataram que, mesmo sem um entendimento completo do mecanismo responsável, o aumento da atividade simpática e o consequente aumento na liberação de acetilcolina nas terminações nervosas simpáticas nas

células cromafins das SR, parece aumentar a atividade e a expressão da tirosina hidroxilase. Esta é a primeira enzima da cascata de síntese de catecolaminas, e pode utilizar fenilalanina como substrato, desde que esta esteja em níveis adequados (Joseph e Dyer 2003). Anos mais tarde, estes mesmos pesquisadores (Tumer et al. 2001) analisaram a expressão da tirosina hidroxilase sob a influência do exercício físico em ratos, encontrando um aumento no mRNA desta enzima nas SR. Além disso, sabe-se que ratos expostos ao estresse crônico leve por 14 dias apresentaram hipertrofia da medula das SR, o que poderia ser devido a um aumento da produção de catecolaminas (Ulrich-Lai et al. 2006). Como um exemplo de estresse, o protocolo de exercício de 14 dias foi capaz de proporcionar a adaptação deste tecido. Kjaer (1998) verificou que o exercício crônico em ratos resulta em maior concentração de catecolaminas nas SR. Ao passo que alguns estudos (Prokopova 2010, Rief et al. 2010) tem demonstrado que as catecolaminas periféricas estão relacionadas a aspectos comportamentais, a prevenção do seu decréscimo proporcionado pelo exercício na HPA poderia melhorar parâmetros comportamentais nesta condição.

Na primeira exposição à tarefa de campo aberto (open field, em inglês) é possível avaliar o desempenho motor dos animais (Prut e Belzung 2003). Esse parâmetro não foi alterado pela condição HPA nem pelo exercício regular, demonstrando que nenhum dos tratamentos prejudicou a deambulação dos ratos. A re-exposição à mesma tarefa, aparelho e horário do dia, com 24 h de intervalo, está relacionada com a memória de habituação (Thiel, Huston e Schwarting 1998). A habituação é uma forma de memória não-associativa, que se caracteriza pela diminuição da atividade exploratória frente a um

determinado estímulo dado continuamente ou repetidamente, sem relação com fadiga muscular ou déficit motor (Thompson e Spencer 1966, Grissom e Bhatnagar 2009). Este tipo de memória faz parte do sistema de aprendizado e memória processual (ou de hábito), que é controlado pelo estriado (Izquierdo et al. 2006). Martynyuk e colaboradores (2010) destacam que esta estrutura recebe projeções dopaminérgicas da substância nigra, sendo importante para a manutenção dos padrões comportamentais normais. Portanto, as diferentes deficiências encontradas na cognição de pacientes e em modelos animais de PKU podem estar relacionadas com a atividade anormal do sistema dopaminérgico. Quanto à taxa de utilização de catecolaminas no estriado, Landvogt e colaboradores (2008) analisaram a 3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) marcada no cérebro de pacientes de PKU tratados precocemente. Eles encontraram uma redução de 41% na taxa de descarboxilação de L-DOPA. Este comprometimento é encontrado na Doença de Parkinson e, uma vez que os pacientes de PKU não apresentam parkinsonismo, outros mecanismos podem estar envolvidos para a manutenção da correta função motora. Em um modelo de esquizofrenia, a destruição dos neurônios dopaminérgicos levou à deficiências nas tarefas comportamentais (Li et al. 2010), demonstrando a importância deste sistema para a função cognitiva. Kaplan e colaboradores (1981) investigaram os efeitos de um modelo animal de PKU e os metabólitos da fenilalanina isoladamente sobre os parâmetros comportamentais. Eles encontraram que o modelo de PKU levou a hipoatividade e ao déficit de memória, enquanto que os metabólitos isolados não acarretaram na mesma diminuição. Os estudos que utilizaram o modelo genético de PKU (camundongos Pah<sup>enu2</sup>), encontraram decréscimo na memória latente (Tang et

al. 1999), na memória de curto prazo e de referência, na memória de habituação, e memória de estímulo visual (Zagreda et al. 1999, Sarkissian et al. 2000). Tem sido descrito que pacientes de PKU tratados precocemente apresentam deficiências cognitivas desde a infância (Smith et al. 1988, Banerjee et al. 2011) até à idade adulta (Pietz et al. 1997, ten Hoedt et al. 2011). O exercício regular tem se mostrado eficiente na restauração dos níveis dopaminérgicos no sistema nervoso central, refletindo em melhoras comportamentais. Em modelo animal de lesão dos neurônios dopaminérgicos, o treinamento físico foi capaz de restaurar os padrões comportamentais saudáveis, devido ao incremento da atividade catecolaminérgica (Fisher et al. 2004). A prática regular de exercícios está associada à prevenção da Doença de Parkinson, possivelmente pela proteção ao sistema catecolaminérgico no cérebro, que é o mais afetado na doença (Sasco et al. 1992, Dibble et al. 2009).

Os resultados deste estudo corroboram achados anteriores que verificaram prejuízos na memória causada pela HPA, provavelmente por deficiências do sistema catecolaminérgico. Além disso, o exercício regular nesta condição foi efetivo ao diminuir o número de *rearings* na re-exposição ao teste de campo aberto, demonstrando melhora na memória de habituação desses animais. Este parâmetro é especialmente útil para avaliar memória de habituação devido à sua importância na coleta de informações em ambientes desconhecidos (Lever et al. 2006). Assim, o exercício regular mostrou perspectivas positivas para a prevenção de déficit na memória de habituação.

O exercício físico regular tem sido amplamente estudado devido aos seus benefícios observados para a população comum e especial. A utilização



de uma estratégia relativamente barata, concomitante à dieta restritiva de difícil aderência (Bilginsoy et al. 2005, Cotugno et al. 2011), pode ser muito vantajoso na HPA. O estímulo de apenas 14 dias foi capaz de prevenir o estresse oxidativo e impedir a diminuição do conteúdo de catecolaminas em seu órgão secretor, melhorando um parâmetro de memória de habituação. Estes resultados estendem o interesse na continuidade da avaliação dos efeitos do exercício na HPA.

## CONCLUSÕES

O estudo de novas estratégias terapêuticas, adicionalmente com a abordagem dietética, pode ser muito útil para os pacientes PKU. Este estudo concluiu que o exercício regular foi capaz de prevenir danos importantes associados à condição HPA, como:

### a) Capítulo I: Artigo aceito

- preveniu importantes alterações de parâmetros de estresse oxidativo relacionados à hiperfenilalaninemia;

### b) Capítulo II: Artigo a ser submetido

- preveniu a redução no conteúdo de catecolaminas nas supra-renais, ao mesmo tempo que melhorou a memória de habituação dos ratos hiperfenilalaninêmicos.

Este trabalho mostrou que o exercício regular foi eficaz ao evitar importantes alterações prejudiciais periféricas e centrais causadas pela hiperfenilalaninemia. Mais estudos são necessários para verificar os efeitos do exercício nesta condição patológica e os possíveis benefícios desta estratégia em pacientes de PKU.

## **PERSPECTIVAS**

- a) Avaliar outros parâmetros comportamentais em ratos exercitados com HPA;
- b) Verificar níveis de catecolaminas em plasma, líquido e cérebro de animais exercitados com HPA;
- c) Analisar as respostas metabólicas frente a exercício agudo e crônico em pacientes fenilcetonúricos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aksu, I., A. Topcu, U. M. Camsari & O. Acikgoz (2009) Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett*, 452, 281-285.

Artuch, R., C. Colome, C. Sierra, N. Brandi, N. Lambruschini, J. Campistol, D. Ugarte & M. A. Vilaseca (2004) A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin Biochem*, 37, 198-203.

Aston-Jones, G., M. T. Shipley, G. Chouvet, M. Ennis, E. van Bockstaele, V. Pieribone, R. Shiekhattar, H. Akaoka, G. Drolet, B. Astier & et al. (1991) Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog Brain Res*, 88, 47-75.

Balaban, R. S., S. Nemoto & T. Finkel (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120, 483-495.

Banerjee, P., D. K. Grange, R. D. Steiner & D. A. White (2011) Executive strategic processing during verbal fluency performance in children with phenylketonuria. *Child Neuropsychol*, 17, 105-117.

Baud, O., A. E. Greene, J. Li, H. Wang, J. J. Volpe & P. A. Rosenberg (2004) Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci*, 24, 1531-1540.

Behl, C. & B. Moosmann (2002) Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med*, 33, 182-191.

Bilginsoy, C., N. Waitzman, C. O. Leonard & S. L. Ernst (2005) Living with phenylketonuria: perspectives of patients and their families. *J Inherit Metab Dis*, 28, 639-649.

Binek-Singer, P. & T. C. Johnson (1982) The effects of chronic hyperphenylalaninaemia on mouse brain protein synthesis can be prevented by other amino acids. *Biochem J*, 206, 407-414.

Cechetti, F., C. Fochesatto, D. Scopel, P. Nardin, C. A. Goncalves, C. A. Netto & I. R. Siqueira (2008) Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. *Brain Res*, 1188, 182-188.

Clark, B. J. (1992) After a positive Guthrie--what next? Dietary management for the child with phenylketonuria. *Eur J Clin Nutr*, 46 Suppl 1, S33-39.

Coelho, B. L., L. G. Rocha, K. S. Scarabelot, D. L. Scheffer, M. M. Ronsani, P. C. Silveira, L. A. Silva, C. T. Souza & R. A. Pinho (2010) Physical exercise prevents the exacerbation of oxidative stress parameters in chronic kidney disease. *J Ren Nutr*, 20, 169-175.

Cotugno, G., R. Nicolo, S. Cappelletti, B. Goffredo, C. Dionisi Vici & V. Di Ciommo (2011) Adherence to diet and quality of life in patients with phenylketonuria. *Acta Paediatr*, 100, 1144-1149.

Da Poian, A. T. & P. C. De Carvalho-Alves. 2002. Hormônios e Metabolismo: Integração e Correlações Químicas. Brasil.

de Diego, A. M., L. Gandia & A. G. Garcia (2008) A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol (Oxf)*, 192, 287-301.

de Grandis, E., M. Serrano, B. Perez-Duenas, A. Ormazabal, R. Montero, E. Veneselli, M. Pineda, V. Gonzalez, F. Sanmarti, C. Fons, A. Sans, B. Cormand, L. Puelles, A. Alonso, J. Campistol, R. Artuch & A. Garcia-Cazorla (2010) Cerebrospinal fluid alterations of the serotonin product, 5-hydroxyindolacetic acid, in neurological disorders. *J Inherit Metab Dis*, 33, 803-809.

de Groot, M. J., M. Hoeksma, N. Blau, D. J. Reijngoud & F. J. van Spronsen (2010) Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of hypotheses. *Mol Genet Metab*, 99 Suppl 1, S86-89.

Desgorces, F. D., M. Chennaoui, D. Gomez-Merino, C. Drogou, D. Bonneau & C. Y. Guezennec (2004) Leptin, catecholamines and free fatty acids related to reduced recovery delays after training. *Eur J Appl Physiol*, 93, 153-158.

Diamond, A., M. B. Prevor, G. Callender & D. P. Druin (1997) Prefrontal cortex cognitive deficits in children treated early and continuously for PKU. *Monogr Soc Res Child Dev*, 62, i-v, 1-208.

Dibble, L. E., O. Addison & E. Papa (2009) The effects of exercise on balance in persons with Parkinson's disease: a systematic review across the disability spectrum. *J Neurol Phys Ther*, 33, 14-26.

Diez, J. J. & P. Iglesias (2003) The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol*, 148, 293-300.

Embury, J. E., C. E. Charron, A. Martynyuk, A. G. Zori, B. Liu, S. F. Ali, N. E. Rowland & P. J. Laipis (2007) PKU is a reversible neurodegenerative process within the nigrostriatum that begins as early as 4 weeks of age in Pah(enu2) mice. *Brain Res*, 1127, 136-150.

Ercal, N., N. Aykin-Burns, H. Gurer-Orhan & J. D. McDonald (2002) Oxidative stress in a phenylketonuria animal model. *Free Radic Biol Med*, 32, 906-11.

Erlandsen, H. & R. C. Stevens (2001) A structural hypothesis for BH<sub>4</sub> responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninaemia and phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis*, 24, 213-230.

Fisher, B. E., G. M. Petzinger, K. Nixon, E. Hogg, S. Bremmer, C. K. Meshul & M. W. Jakowec (2004) Exercise-induced behavioral recovery and neuroplasticity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse basal ganglia. *J Neurosci Res*, 77, 378-390.

Gabai, V. L., A. B. Meriin, J. A. Yaglom, V. Z. Volloch & M. Y. Sherman (1998) Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett*, 438, 1-4.

Gassio, R., R. Artuch, M. A. Vilaseca, E. Fuste, R. Colome & J. Campistol (2008) Cognitive functions and the antioxidant system in phenylketonuric patients. *Neuropsychology*, 22, 426-431.

Gaykema, R. P. & L. E. Goehler (2011) Ascending caudal medullary catecholamine pathways drive sickness-induced deficits in exploratory behavior: brain substrates for fatigue? *Brain Behav Immun*, 25, 443-460.

Giugliani, R. (1998) Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. *Life Sciences*, 78, 29-40.

Gomez-Cabrera, M. C., E. Domenech & J. Vina (2008) Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*, 44, 126-131.

Goto, S., H. Naito, T. Kaneko, H. Y. Chung & Z. Radak (2007) Hormetic effects of regular exercise in aging: correlation with oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab*, 32, 948-953.

Grissom, N. & S. Bhatnagar (2009) Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiol Learn Mem*, 92, 215-224.

Grossman, M. (1999) Sentence processing in Parkinson's disease. *Brain Cogn*, 40, 387-413.

Guldberg, P., H. L. Levy, W. B. Hanley, R. Koch, R. Matalon, B. M. Rouse, F. Trefz, F. de la Cruz, K. F. Henriksen & F. Guttler (1996) Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: report from the Maternal PKU Collaborative Study. *Am J Hum Genet*, 59, 84-94.

Guttler, F. & P. Guldberg (1996) The influence of mutations of enzyme activity and phenylalanine tolerance in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Eur J Pediatr*, 155 Suppl 1, S6-10.



Guttler, F. & H. Lou (1986) Dietary problems of phenylketonuria: effect on CNS transmitters and their possible role in behaviour and neuropsychological function. *J Inherit Metab Dis*, 9 Suppl 2, 169-177.

Hagen, M. E. K., C. D. Pederzoli, A. M. Sgaravatti, R. Bridi, M. Wajner, C. M. Wannmacher, A. T. Wyse & C. S. Dutra-Filho (2002) Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta*, 1586, 344-352.

Halliwell, B. & J. M. Gutteridge. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press.

Heesen, C., A. Romberg, S. Gold & K. H. Schulz (2006) Physical exercise in multiple sclerosis: supportive care or a putative disease-modifying treatment. *Expert Rev Neurother*, 6, 347-455.

Hoeksma, M., D. J. Reijngoud, J. Pruijm, H. W. de Valk, A. M. Paans & F. J. van Spronsen (2009) Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. *Mol Genet Metab*, 96, 177-182.

Huijbregts, S. C., L. M. de Sonnevile, F. J. van Spronsen, R. Licht & J. A. Sergeant (2002) The neuropsychological profile of early and continuously treated phenylketonuria: orienting, vigilance, and maintenance versus manipulation-functions of working memory. *Neurosci Biobehav Rev*, 26, 697-712.

Husain, K. & S. M. Somani (1998) Effect of exercise training and chronic ethanol ingestion on cholinesterase activity and lipid peroxidation in blood and brain regions of rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 22, 411-423.

Isaias, I. U., G. Marotta, G. Pezzoli, O. Sabri, J. Schwarz, P. Crenna, J. Classen & P. Cavallari (2011) Enhanced catecholamine transporter binding in the locus coeruleus of patients with early Parkinson disease. *BMC Neurol*, 11, 88.

Izquierdo, I., L. R. Bevilaqua, J. I. Rossato, J. S. Bonini, W. C. Da Silva, J. H. Medina & M. Cammarota (2006) The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: a review of recent findings. *Neurotox Res*, 10, 113-121.

Jardim, L. B., R. Palma-Dias, L. C. Silva, P. Ashton-Prolla & R. Giugliani (1996) Maternal hyperphenylalaninaemia as a cause of microcephaly and mental retardation. *Acta Paediatr*, 85, 943-946.

Joseph, B. & C. A. Dyer (2003) Relationship between myelin production and dopamine synthesis in the PKU mouse brain. *J Neurochem*, 86, 615-626.

Kandel, E. R., J. H. Schwartz & T. M. Jessel. 2003. *Princípios da Neurociência*. São Paulo/SP.

Kaplan, H., T. Triano & M. Donadio (1981) Behavioral deficit in phenylketonuric rats: role of aromatic acid metabolites of phenylalanine. *Dev Psychobiol*, 14, 201-207.

Katz, H. P. & J. H. Menkes (1964) Phenylketonuria Occurring in an American Negro. *J Pediatr*, 65, 71-74.

Kjaer, M. (1998) Adrenal medulla and exercise training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 77, 195-199.

Knab, A. M. & J. T. Lightfoot (2010) Does the difference between physically active and couch potato lie in the dopamine system? *Int J Biol Sci*, 6, 133-150.

Knudsen, G. M., S. Hasselbalch, P. B. Toft, E. Christensen, O. B. Paulson & H. Lou (1995) Blood-brain barrier transport of amino acids in healthy controls and in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis*, 18, 653-664.

Kohli, S., R. Saxena, E. Thomas, P. Rao & I. C. Verma (2005) Prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Indian J Med Res*, 122, 400-403.

Kostrzewa, R. M. (2007) The blood-brain barrier for catecholamines - revisited. *Neurotox Res*, 11, 261-171.

Kraemer, W. J., S. J. Fleck, C. M. Maresh, N. A. Ratamess, S. E. Gordon, K. L. Goetz, E. A. Harman, P. N. Frykman, J. S. Volek, S. A. Mazzetti, A. C. Fry, L. J. Marchitelli & J. F. Patton (1999) Acute hormonal responses to a single bout of heavy resistance exercise in trained power lifters and untrained men. *Can J Appl Physiol*, 24, 524-537.

Krause, W., M. Halminski, L. McDonald, P. Dembure, R. Salvo, D. Freides & L. Elsas (1985) Biochemical and neuropsychological effects of elevated plasma phenylalanine in patients with treated phenylketonuria. A model for the study of phenylalanine and brain function in man. *J Clin Invest*, 75, 40-48.

Kvetnansky, R., E. L. Sabban & M. Palkovits (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*, 89, 535-606.

Landvogt, C., E. Mengel, P. Bartenstein, H. G. Buchholz, M. Schreckenberger, T. Siessmeier, A. Scheurich, R. Feldmann, J. Weglage, P. Cumming, F. Zepp & K. Ullrich (2008) Reduced cerebral fluoro-L-dopamine uptake in adult patients suffering from phenylketonuria. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28, 824-831.

Leentjens, A. F. (2011) The role of dopamine agonists in the treatment of depression in patients with Parkinson's disease: a systematic review. *Drugs*, 71, 273-286.

Lei Federal n° 8069 de 13 de Julho de 1990, Estatuto da Criança e do Adolescente, inciso III do Artigo 10. Brasil.

Lesser, A. J. (1963) Phenylketonuria and the Guthrie Test. *Pediatrics*, 32, 940.

Lever, C., S. Burton & J. O'Keefe (2006) Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev Neurosci*, 17, 111-133.

Li, Z., M. Boules, K. Williams, A. Gordillo, S. Li & E. Richelson (2010) Similarities in the behavior and molecular deficits in the frontal cortex between the neurotensin receptor subtype 1 knockout mice and chronic phencyclidine-treated mice: relevance to schizophrenia. *Neurobiol Dis*, 40, 467-477.

Litwack, G. & T. J. Schmidt. 1997. *Biochemistry of Hormones I: Polypeptide Hormones*. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, ed. T. M. Devlin. New York: Wiley-Liss.

Martinez-Cruz, F., D. Pozo, C. Osuna, A. Espinar, C. Marchante & J. M. Guerrero (2002) Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: Prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C. *J Neurosci Res*, 69, 550-508.

Martynyuk, A. E., F. J. van Spronsen & E. A. Van der Zee (2010) Animal models of brain dysfunction in phenylketonuria. *Mol Genet Metab*, 99 Suppl 1, S100-5.

McKean, C. M. (1972) The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism in the human brain. *Brain Res*, 47, 469-476.

Monteiro, L. T. B. & L. M. B. Cândido (2006) Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Revista de Nutrição*, 19, 381-387.

Moraes, T. B., F. Zanin, A. da Rosa, A. de Oliveira, J. Coelho, F. Petrillo, M. Wajner & C. S. Dutra-Filho (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.

Moret, C. & M. Briley (2011) The importance of norepinephrine in depression. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 7, 9-13.

Nelson, M. D. L. & M. Cox. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*. USA: Freeman.

Nyhan, W. L. 1984. *Abnormalities in amino acid metabolism in clinical medicine*. Norwalk: Appleton-century Crofts.

Paans, A. M., J. Pruijm, G. P. Smit, G. Visser, A. T. Willemsen & K. Ullrich (1996) Neurotransmitter positron emission tomographic-studies in adults with phenylketonuria, a pilot study. *Eur J Pediatr*, 155 Suppl 1, S78-81.

Pacak, K. & M. Palkovits (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev*, 22, 502-48.

Pascucci, T., D. Andolina, R. Ventura, S. Puglisi-Allegra & S. Cabib (2008) Reduced availability of brain amines during critical phases of postnatal development in a genetic mouse model of cognitive delay. *Brain Res*, 1217, 232-238.

Penrose, L. & J. H. Quastel (1937) Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochem J*, 31, 266-274.

Pietz, J., B. Fatkenheuer, P. Burgard, M. Armbruster, G. Esser & H. Schmidt (1997) Psychiatric disorders in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Pediatrics*, 99, 345-350.

Pietz, J., R. Kreis, A. Rupp, E. Mayatepek, D. Rating, C. Boesch & H. J. Bremer (1999) Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest*, 103, 1169-1178.

Pinho, R. A., M. E. Andrades, M. R. Oliveira, A. C. Pirola, M. S. Zago, P. C. Silveira, F. Dal-Pizzol & J. C. Moreira (2006) Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int*, 30, 848-853.

Pohorecky, L. A., G. G. Blakley, L. Kubovcakova, O. Krizanova, P. Patterson-Buckendahl & R. Kvetnansky (2004) Social hierarchy affects gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes in rat adrenal glands. *Neuroendocrinology*, 80, 42-51.

Powers, S. K. & M. J. Jackson (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, 88, 1243-1276.

Prokopova, I. (2010) [Noradrenaline and behavior]. *Cesk Fysiol*, 59, 51-58.

Prut, L. & C. Belzung (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, 463, 3-33.

Puglisi-Allegra, S., S. Cabib, T. Pascucci, R. Ventura, F. Cali & V. Romano (2000) Dramatic brain aminergic deficit in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport*, 11, 1361-1164.

Radak, Z., S. Kumagai, A. W. Taylor, H. Naito & S. Goto (2007) Effects of exercise on brain function: role of free radicals. *Appl Physiol Nutr Metab*, 32, 942-946.

Ramel, A., K. H. Wagner & I. Elmadfa (2004) Correlations between plasma noradrenaline concentrations, antioxidants, and neutrophil counts after submaximal resistance exercise in men. *Br J Sports Med*, 38, E22.

Rief, W., P. J. Mills, S. Ancoli-Israel, M. G. Ziegler, M. A. Pung & J. E. Dimsdale (2010) Overnight changes of immune parameters and catecholamines are associated with mood and stress. *Psychosom Med*, 72, 755-762.

Salim, S., N. Sarraj, M. Taneja, K. Saha, M. V. Tejada-Simon & G. Chugh (2010) Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behav Brain Res*, 208, 545-552.

Sarkissian, C. N., D. M. Boulais, J. D. McDonald & C. R. Scriver (2000) A heteroallelic mutant mouse model: A new orthologue for human hyperphenylalaninemia. *Mol Genet Metab*, 69, 188-194.

Sasco, A. J., R. S. Paffenbarger, Jr., I. Gendre & A. L. Wing (1992) The role of physical exercise in the occurrence of Parkinson's disease. *Arch Neurol*, 49, 360-365.

Saudubray, J. M. & C. Charpentier. 2001. Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, eds. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly & D. Valle. New York: MacGraw-Hill.

Schulpis, K. H., E. D. Papakonstantinou & J. Tzamouranis (2000) Plasma leptin concentrations in phenylketonuric patients. *Horm Res*, 53, 32-35.

Schulpis, K. H., I. Papassotiriou, S. Tsakiris, M. Vounatsou & G. P. Chrousos (2005) Increased plasma adiponectin concentrations in poorly controlled patients with phenylketonuria normalize with a strict diet: evidence for catecholamine-mediated adiponectin regulation and a complex effect of phenylketonuria diet on atherogenesis risk factors. *Metabolism*, 54, 1350-1355.

Schulpis, K. H., I. Papassotiriou, M. Vounatsou, G. A. Karikas, S. Tsakiris & G. P. Chrousos (2004) Morning preprandial plasma ghrelin and catecholamine



concentrations in patients with phenylketonuria and normal controls: evidence for catecholamine-mediated ghrelin regulation. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 3983-3987.

Scopel, D., C. Fochesatto, H. Cimarosti, M. Rabbo, A. Bello-Klein, C. Salbego, C. A. Netto & I. R. Siqueira (2006) Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull*, 71, 155-159.

Scriver, C. R. (2008) Garrod's Croonian Lectures (1908) and the charter 'Inborn Errors of Metabolism': albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008. *J Inherit Metab Dis*, 31, 580-598.

Scriver, C. R. & S. Kaufman. 2001. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In *The Metabolic & Molecular Inherited Disease*, eds. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly & D. Walle, 1667-1724. New York: McGraw-Hill.

Sierra, C., M. A. Vilaseca, D. Moyano, N. Brandi, J. Campistol, N. Lambruschini, F. J. Cambra, R. Deulofeu & A. Mira (1998) Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin Chim Acta*, 276, 1-9.

Sirtori, L. R., C. S. Dutra-Filho, D. Fitarelli, A. Sitta, A. Haeser, A. G. Barschak, M. Wajner, D. M. Coelho, S. Llesuy, A. Bello-Klein, R. Giugliani, M. Deon & C. R. Vargas (2005) Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta*, 1740, 68-73.

Sitta, A., A. G. Barschak, M. Deon, T. Terroso, R. Pires, R. Giugliani, C. S. Dutra-Filho, M. Wajner & C. R. Vargas (2006) Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab Brain Dis*, 21, 287-296.

Sitta, A., C. S. Vanzin, G. B. Biancini, V. Manfredini, A. B. de Oliveira, C. A. Wayhs, G. O. Ribas, L. Giugliani, I. V. Schwartz, D. Bohrer, S. C. Garcia, M. Wajner & C. R. Vargas (2011) Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol*, 31, 429-436.

Smith, B. A., N. R. Goldberg & C. K. Meshul (2011) Effects of treadmill exercise on behavioral recovery and neural changes in the substantia nigra and striatum of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse. *Brain Res*.

Smith, C. B. & J. Kang (2000) Cerebral protein synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 11014-11019.

Smith, I., M. G. Beasley, O. H. Wolff & A. E. Ades (1988) Behavior disturbance in 8-year-old children with early treated phenylketonuria. Report from the MRC/DHSS Phenylketonuria Register. *J Pediatr*, 112, 403-408.

Somani, S. M., R. Ravi & L. P. Rybak (1995) Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 50, 635-639.

Surtees, R. & N. Blau (2000) The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr*, 159 Suppl 2, S109-113.

Tam, S. Y. & R. H. Roth (1997) Mesoprefrontal dopaminergic neurons: can tyrosine availability influence their functions? *Biochem Pharmacol*, 53, 441-453.

Tang, Y. P., E. Shimizu, G. R. Dube, C. Rampon, G. A. Kerchner, M. Zhuo, G. Liu & J. Z. Tsien (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401, 63-69.

Taylor, E. H., F. A. Hommes & D. E. Stewart (1983) Effect of experimental hyperphenylalaninemia on biogenic amine synthesis at later stages of brain development. *Biochem Med*, 29, 307-317.

ten Hoedt, A. E., L. M. de Sonnevile, B. Francois, N. M. ter Horst, M. C. Janssen, M. E. Rubio-Gozalbo, F. A. Wijburg, C. E. Hollak & A. M. Bosch (2011) High phenylalanine levels directly affect mood and sustained attention in adults with phenylketonuria: a randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Inherit Metab Dis*, 34, 165-171.

Thiel, C. M., J. P. Huston & R. K. Schwarting (1998) Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience*, 85, 1253-1262.

Thompson, R. F. & W. A. Spencer (1966) Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol Rev*, 73, 16-43.

Tumer, N., C. S. Broxson, J. S. LaRochelle & P. J. Scarpace (1999) Induction of tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y by carbachol: modulation with age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 54, B418-423.

Tumer, N., H. A. Demirel, L. Serova, E. L. Sabban, C. S. Broxson & S. K. Powers (2001) Gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes following exercise: modulation by age. *Neuroscience*, 103, 703-711.

Ulrich-Lai, Y. M., H. F. Figueiredo, M. M. Ostrander, D. C. Choi, W. C. Engeland & J. P. Herman (2006) Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291, E965-673.

Um, H. S., E. B. Kang, Y. H. Leem, I. H. Cho, C. H. Yang, K. R. Chae, D. Y. Hwang & J. Y. Cho (2008) Exercise training acts as a therapeutic strategy for reduction of the pathogenic phenotypes for Alzheimer's disease in an NSE/APPsw-transgenic model. *Int J Mol Med*, 22, 529-539.

Vilaseca, M. A., N. Lambruschini, L. Gomez-Lopez, A. Gutierrez, E. Fuste, R. Gassio, R. Artuch & J. Campistol (2010) Quality of dietary control in phenylketonuric patients and its relationship with general intelligence. *Nutr Hosp*, 25, 60-66.

Wajner, M., A. Latini, A. T. Wyse & C. S. Dutra-Filho (2004) The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis*, 27, 427-448.

Walter, J. H., F. J. White, S. K. Hall, A. MacDonald, G. Rylance, A. Boneh, D. E. Francis, G. J. Shortland, M. Schmidt & A. Vail (2002) How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet*, 360, 55-57.

Warburton, D. E., C. W. Nicol & S. S. Bredin (2006) Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*, 174, 801-809.

White, L. J. & V. Castellano (2008) Exercise and brain health--implications for multiple sclerosis: Part 1--neuronal growth factors. *Sports Med*, 38, 91-100.

Wilke, B. C., M. Vidailhet, A. Favier, C. Guillemin, V. Ducros, J. Arnaud & M. J. Richard (1992) Selenium, glutathione peroxidase (GSH-Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. *Clin Chim Acta*, 207, 137-142.

Wong, D. L. (2003) Why is the adrenal adrenergic? *Endocr Pathol*, 14, 25-36.

Zagreda, L., J. Goodman, D. P. Druin, D. McDonald & A. Diamond (1999) Cognitive deficits in a genetic mouse model of the most common biochemical cause of human mental retardation. *J Neurosci*, 19, 6175-6182.

Zeugmann, S., A. Quante, I. Heuser, R. Schwarzer & I. Angheliescu (2010) Inflammatory biomarkers in 70 depressed inpatients with and without the metabolic syndrome. *J Clin Psychiatry*, 71, 1007-1016.