

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

EFEITOS DA FENILALANINA EM CULTURA DE ASTRÓCITOS SOBRE
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E DA REDE DE
TRANSFERÊNCIA DE GRUPOS FOSFORILA

THALES PREISSLER

ORIENTADOR: PROF. DR. CLOVIS MILTON DUVAL WANNMACHER

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Preissler, Thales

Efeitos da fenilalanina em cultura de astrócitos sobre parâmetros de estresse oxidativo e da rede de transferência de grupos fosforila / Thales

Preissler. -- 2015.

61 f.

Orientador: Clovis Milton Duval Wannmacher.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Fenilcetonúria. 2. PKU. 3. Estresse Oxidativo. 4. HPLC. 5. Rede transferência de Grupos Fosforila. I. Duval Wannmacher, Clovis Milton, orient. II. Título.

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

EFEITOS DA FENILALANINA EM CULTURA DE ASTRÓCITOS SOBRE
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E DA REDE DE
TRANSFERÊNCIA DE GRUPOS FOSFORILA

THALES PREISSLER

ORIENTADOR: PROF. DR. CLOVIS MILTON DUVAL WANNMACHER

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

PORTO ALEGRE

2015

“O maior inimigo do conhecimento não é ignorância, mas a ilusão do conhecimento.”

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Clovis Wannmacher, pela convivência, ensinamentos e orientações.

Obrigado à banca examinadora, em especial à Professora Janice, pela sua agilidade de profissionalismo.

Aos meus colegas de laboratório, que tornaram sempre uma convivência tranquila e agradável. Denise, Elenara, Itiane, Rodrigo, Simone, Tanise, Vanessa e Vivian, sou muito grato a vocês!

Meu sincero agradecimento à Bruna, à Elissa e à Ivi, que muito me ajudaram neste trabalho.

Meu muito obrigado também ao Professor José Cláudio Fonseca Moreira por disponibilizar o local para trabalhar com cultura.

Agradeço também à Marina e à Maria (do lab. 33), por me ensinarem a cultura com astrócitos.

Aos meus grandes amigos, Daniel, Menguer e Fernando, pelo apoio em diversos momentos.

Meu sincero obrigado à minha namorada Cristiane, por acreditar e me incentivar sempre!

Obrigado à minha família!

Obrigado ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	1
1.2 FENILCETONÚRIA	2
1.2.1 HISTÓRICO.....	5
1.2.2 DIAGNÓSTICO.....	6
1.2.3 TRATAMENTO.....	7
1.2.4 CLASSIFICAÇÃO PKU.....	8
1.3 ESPÉCIES REATIVAS E ESTRESSE OXIDATIVO.....	9
1.4 REDE DE TRANSFERÊNCIA DE GRUPOS FOSFORILA.....	13
1.4.1 CREATINA-CINASE.....	13
1.4.2 PIRUVATO-CINASE.....	14
1.4.3 ADENILATO-CINASE.....	14
1.5 ASTRÓCITOS.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
ARTIGO	19
DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÕES.....	35
PERSPECTIVAS.....	37
REFERÊNCIAS.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AK: adenilato-cinase

AKU: alcaptonúria

BH2: di-hidrobiopterina

BH4: tetra-hidrobiopterina

BHE: barreira hematoencefálica

CAT: catalase

CK: creatina-cinase

CKc: creatina-cinase citosólica

CKm: creatina-cinase mitocondrial

cPKU: fenilcetonúria clássica

DCFH - 2,7-diclorofluoresceína

EIM: erros inatos do metabolismo

ER: espécies reativas

ERN: espécies reativas de nitrogênio

ERO: espécies reativas de oxigênio

GPx: glutationa peroxidase

MA: ácido mandélico

mPKU: fenilcetonúria materna

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

PAA: ácido fenilacético

Pah: fenilalanina hidroxilase

PEA: feniletilamina

Phe: fenilalanina

PK: piruvato-cinase

PKU: fenilcetonúria

PPA: fenilpiruvato

QI: quociente de inteligência

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

Tyr: tirosina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hidroxilação da fenilalanina pela enzima fenilalanina-hidroxilase, enzima que tem como cofator a tetra-hidrobiopterina (BH₄). – página 3

Figura 2: Via alternativa do metabolismo da fenilalanina – página 3

Figura 3: Defesas enzimáticas antioxidantes – página 11

Figura 4: Estrutura da glutathione – página 12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos resultados dos parâmetros de estresse oxidativo nos grupos tratados com Phe de 0,5 a 1,5 mM comparados com o controle – página 32

RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é o erro inato do metabolismo dos aminoácidos mais comum. Ela é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene da fenilalanina hidroxilase (Pah) que é responsável por converter a fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr), que acaba elevando os níveis de Phe e seus metabólitos no sangue e tecidos. Se não tratada, a PKU pode desenvolver problemas neurológicos como convulsões, distúrbios motores e retardo mental. O objetivo deste estudo é investigar os efeitos da Phe em alguns parâmetros do metabolismo, estresse oxidativo e viabilidade celular em cultura de astrócitos de ratos Wistar. Os astrócitos foram cultivados sob quatro condições: controle (com 0,4 mM de Phe no meio de cultura) e outros três grupos com concentrações finais de Phe de 0,5, 1,0 e 1,5 mM. Após 72 horas, os astrócitos foram coletados para análises bioquímicas. Nós observamos que os teste de brometo de tetrazolium (MTT) e lactato desidrogenase mostraram alterações na viabilidade celular em todas as doses testadas. Também foram notadas alterações em parâmetros de estresse oxidativo, indicando que a Phe pode induzir a produção de radicais livres, mas não encontramos diferenças significativas nos parâmetros do metabolismo como a creatina-cinase, piruvato-cinase e adenilato-cinase. Estes resultados sugerem que a fenilalanina nas concentrações encontradas na PKU pode induzir estresse oxidativo e consequente morte celular em cultura de astrócitos. Considerando a importâncias dessas células para a manutenção da homeostase cerebral, é possível que estas alterações estejam relacionadas com os problemas neurológicos encontrados em pacientes com PKU.

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is the most common inborn error of amino acid metabolism. It is an autosomal recessive disease caused by mutations in the gene that expresses phenylalanine hydroxylase enzyme (Pah) that converts phenylalanine (Phe) into tyrosine (Tyr), that leads to high levels of Phe and its metabolites in blood and tissues. If left untreated, PKU can develop neurological problems as seizures, motor disturbances and severe mental retardation. The aim of this study is to investigate the effects of Phe on oxidative stress, some metabolic parameters and cell viability in astrocytes culture of Wistar rats. Astrocytes were cultured under four conditions: control (0.4 mM Phe in the medium), and other three groups with final Phe concentration of 0.5, 1.0 and 1.5 mM. After 72 hours, astrocytes were collected for biochemical measurements. We observed that tetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase (LDH) assays indicated that Phe decreased cell viability at all tested doses. Alterations on oxidative stress parameters indicated that Phe could induce free radicals production, but we didn't find significant differences on metabolic parameters as creatine, pyruvate and adenylate kinases. Those results suggest that phenylalanine at concentrations found in PKU can induce oxidative stress and consequently cell death in astrocytes cultures. Considering the importance of astrocytes in brain homeostasis, it is possible that these changes may be related to neurological problems seen in PKU patients.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios hereditários causados por deficiência de uma proteína, geralmente uma enzima, que causam defeito em uma rota metabólica, aumentando a concentração de substâncias tóxicas e/ou diminuindo a formação de substâncias essenciais (Mak et al., 2013).

O termo foi criado em 1908 por Archibald Garrod durante estudos com pacientes com alcaptonúria (AKU), uma doença na qual o paciente excreta ácido homogentísico pela urina (Aquaron, 2013).

Garrod observou que era comum um ou mais indivíduos da mesma família serem afetados pela alcaptonúria, mesmo que os pais não tivessem a doença. Além disso, foi observada uma frequência maior quando havia cosanguinidade nos pais dos pacientes. Assim, Garrod e o geneticista Bateson, baseados nos princípios de Mendel, propuseram que essa doença seria de herança autossômica recessiva (Waber, 1990).

Desde essa época, mais de 500 diferentes distúrbios de proteínas envolvidas na síntese, degradação, armazenamento e transporte de moléculas já foram descritas (Jimenez-Sanchez and Barton Childs, 2001), porém seu diagnóstico muitas vezes é dificultado, pois suas manifestações ocorrem normalmente na infância com sintomatologia muitas vezes parecidas com as de outras doenças infantis (Holtzman, 1978).

Os EIM estão presentes em todas as etnias e sua frequência isolada é baixa, mas conjuntamente, eles atingem 0,1% da população, representando cerca de 10% das doenças genéticas. Um dos principais problemas dos EIM são as alterações no

desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Aproximadamente 1/3 dos EIM correspondem aos erros inatos do metabolismo dos aminoácidos (aminoacidopatias), sendo a fenilcetonúria a de maior incidência (Hoffman, 1994).

1.2 FENILCETONÚRIA

A fenilalanina (Phe) é um aminoácido essencial, importante na síntese proteica dos tecidos. Cerca de 80% da Phe é convertida a tirosina (Tyr), um aminoácido não essencial, por hidroxilação pela enzima fenilalanina hidroxilase (Pah)(Schuck et al., 2015)(Figura 1). A Pah está presente no fígado e é uma etapa limitante no catabolismo da Phe, tendo como cofator a tetra-hidrobiopterina (BH_4), a qual é oxidada a di-hidrobiopterina (BH_2) e deve ser reduzida de volta a BH_4 para que a fenilalanina continue formando tirosina (Figura 1). A fenilcetonúria (PKU) resulta de deficiência da Pah (forma clássica), da BH_4 ou de enzimas da via de biossíntese de BH_2 . A PKU é uma desordem genética autossômica recessiva (Costello et al. 1994b), que leva ao acúmulo de fenilalanina, resultando em hiperfenilalaninemia e anormalidades no metabolismo de muitos compostos derivados de aminoácidos aromáticos.

Quando a rota está bloqueada, a conversão de Phe para outros metabólitos torna-se significativa. A Phe é então descarboxilada a feniletilamina (PEA), 90% da qual é oxidada a ácido fenilacético (PAA) e o restante a ácido mandélico (MA). A Phe pode ainda ser transaminada a fenilpiruvato (PPA), que é convertido em fenilacetato e fenilactato (Figura 2). Em fenilcetonúricos, estes metabólitos são encontrados elevados e também são excretados na urina (Clemens et al., 1990; Langenbeck et al., 1992). As concentrações séricas destes compostos podem variar de 3 a 84 μM (Langenbeck et al., 1992).

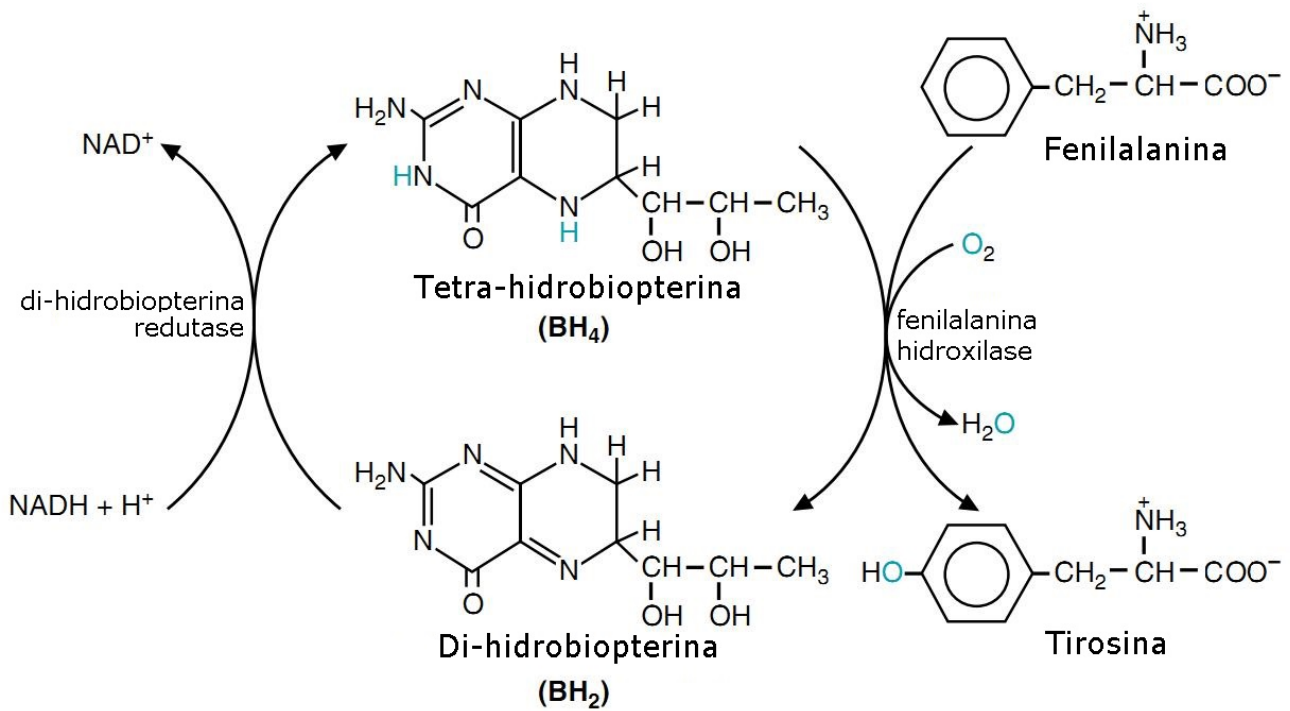


Figura 1. Hidroxilação da fenilalanina pela enzima fenilalanina-hidroxilase, enzima que tem como cofator a tetra-hidrobiopterina (BH_4). Adaptada de Smith et al., 2007.

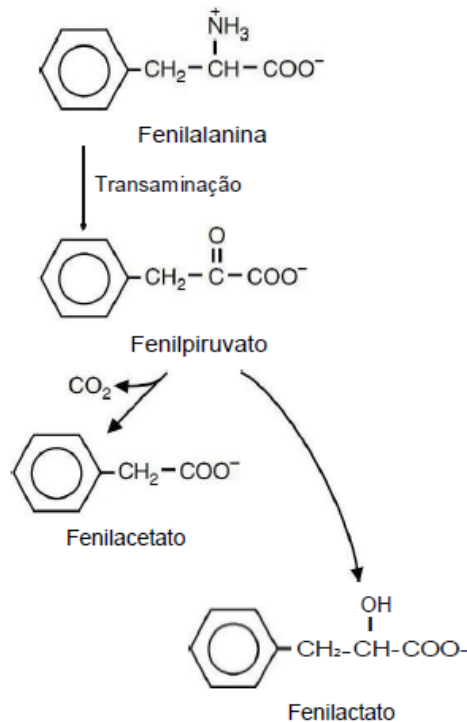


Figura 2. Via alternativa do metabolismo da fenilalanina. Adaptada de Smith et al., 2007.

Na doença, a atividade enzimática residual pode ser de 25% ou tão baixa que pode não ser detectável (Smith et al., 1991). A frequência entre populações caucasianas pode variar entre 1 a cada 10 a 15 mil e a frequência de portadores de mutações é de aproximadamente 1 em cada 50 indivíduos (Bickel et al., 1981).

Pacientes com PKU apresentam diminuição na pigmentação da íris, dos pelos e da pele. A severidade dos sintomas está diretamente correlacionada com os níveis séricos de fenilalanina, que por sua vez é inversamente proporcional à atividade da enzima Pah (Schuck et al., 2015).

Sabe-se que níveis altos de Phe e seus metabólitos são tóxicos ao SNC, sobretudo durante o desenvolvimento. Pacientes fenilcetonúricos não tratados podem desenvolver retardo mental severo, alterações comportamentais, como hiperatividade com características autistas, retardo no crescimento, convulsões e ansiedade (Waisbren and Zaff, 1994). Os mecanismos envolvidos no prejuízo das funções do SNC ainda não foram completamente elucidados (Hood et al., 2015), mas sabe-se que há envolvimento de estresse oxidativo, tanto em pacientes com PKU (Sanayama et al., 2011; Schulpis et al., 2003) quanto em modelos animais da doença (Kienzle Hagen et al., 2002; Martínez-Cruz et al., 2006). No entanto, ainda não está bem esclarecida a participação de cada tipo celular do SNC - astrócitos, neurônios, microglia - na fisiopatologia da doença, sendo necessárias abordagens que enfoquem cada célula individualmente. Uma vez que as disfunções do funcionamento do encéfalo podem ser definidas como uma falência na homeostase deste órgão, fica claro que cada tipo celular tem um papel, tanto durante processos fisiológicos quanto patológicos (Parpura et al., 2013; Verkhatsky et al., 2015).

1.2.1 HISTÓRICO

A PKU foi observada primeiramente por Asbjörn Fölling em 1934 (Fölling, 1934a, 1934b). Ele observou que dois irmãos com retardo mental possuíam um odor diferente na urina, a qual mudava de cor quando misturada com cloreto férrico. A substância, até então desconhecida e responsável por estas alterações, era o ácido fenilpirúvico. Mais tarde, ele fez o mesmo teste com outros 430 pacientes com retardo mental e encontrou oito que possuíam o mesmo ácido na urina. Dos 10 pacientes detectados, 4 pares eram de irmãos, sugerindo uma condição hereditária para o desenvolvimento da doença. Suspeitando que a Phe pudesse ser a provável fonte do ácido fenilpirúvico, Fölling descobriu que doses altas de Phe e proteínas aumentavam a excreção do ácido fenilpirúvico. Assim, ele propôs que seria uma doença autossômica recessiva do metabolismo da Phe e a chamou de *imbecillitas phenylpyrouvica* (imbecilidade fenilpirúvica). Um ano depois, Penrose confirmou as suspeitas de Fölling e em função dos altos níveis de fenilpiruvato, que é uma fenilcetona, criando o termo Fenilcetonúria (Penrose, 1935).

Apenas em 1947 o mecanismo bioquímico da PKU começou a ser elucidado. Jervis observou que a administração de Phe causava elevação nos níveis de Tyr em pessoas normais, mas não em fenilcetonúricos (Jervis, 1947). Em 1952 é que foi identificada a Pah, a enzima responsável pela conversão da Phe em Tyr (Udenfriend and Cooper, 1952). Em 1953, Jervis mostrou que amostras de fígado de pessoas saudáveis eram capazes de converter a Phe em Tyr, mas as de fenilcetonúricos não (Jervis, 1953).

O tratamento baseado em dieta com baixa Phe, foi idealizado por Woolf em 1951 (Woolf et al., 1951). Foi primeiramente testada em uma criança portadora de PKU no Reino Unido. O paciente não conseguia sentar, caminhar ou falar e passava boa

parte do tempo gritando e balançando a cabeça. Com o tratamento com baixa Phe, notou-se melhora no seu estado cognitivo. Ele aprendeu a andar, engatinhar, parou de balançar a cabeça e seu cabelo foi crescendo mais escuro. Quando adicionaram 5g de Phe na sua dieta, os sintomas ressurgiram e progrediram em poucas horas (Bickel et al., 1953; Woolf et al., 1955).

1.2.2 DIAGNÓSTICO

O primeiro método de triagem diagnóstica implantado nos Estados Unidos da América e depois em outros países era baseado no teste do cloreto férrico (Centerwall, 1959; Gibbs and Woolf, 1959). Por limitações metodológicas, como falsos negativos, este teste foi substituído por um outro teste baseado na inibição bacteriana, que possibilitava análises de grande número de amostras para a triagem de todos os recém-nascidos (Guthrie and Susi, 1963). Com o tempo, métodos utilizando espectrometria de massa foram se tornando o padrão para a determinação dos níveis de Phe (Zerjav Tansek et al., 2015).

O melhor momento para a coleta de amostra de sangue é do terceiro até o sétimo dia de vida. O sangue é coletado do calcanhar do bebê, local bem vascularizado, e armazenado em papel filtro. O diagnóstico leva em conta as concentrações de Phe e Tyr. Bebês normais possuem concentrações de Phe e Tyr aproximadas de 0,18 mM e 0,2 mM respectivamente, enquanto bebês com PKU têm concentrações de 0,9 mM ou maior e Tyr em torno de 0,03 mM (Clayton BE, Jenkins P, 1980). No Brasil, é feita a triagem neonatal também conhecida como teste do pezinho, onde a PKU é testada obrigatoriamente desde 1992, junto com os testes para outras doenças: hipotireoidismo congênito, anemia falciforme, hiperplasia congênita da supra-adrenal, deficiência da

biotinidase, fibrose cística, galactosemia e toxoplasmose, por metodologias fluorimétricas, enzimáticas ou espectrometria de massa (Nunes et al., 2013; Sparks, 2013).

1.2.3 TRATAMENTO

O tratamento consiste basicamente em retirar a Phe da dieta, deixando uma quantidade mínima que permita o crescimento saudável. A dieta para PKU consiste em restrição de proteínas da dieta e suplementação com fórmulas especiais que contenham vitaminas, minerais e todos os aminoácidos essenciais, com Phe em quantidades baixas, mas suficientes para o desenvolvimento saudável. Esta dieta é extremamente eficaz na prevenção de danos neurológicos durante o desenvolvimento, mas ainda não é ideal. No uso das primeiras fórmulas, foram relatados casos de deficiências de minerais e vitamina B12, além de atrasos no crescimento. A dieta é também de difícil manutenção, devido à grande restrição de alimentos que ela exige e também pela falta de palatabilidade das fórmulas, as quais têm sido melhoradas para tentar promover maior aderência. Nesta dieta alimentos com alto teor de proteína, como carnes, soja, leite, ovos e farinha de trigo, são proibidos. Alimentos que possuem até 20mg de Phe por 100g, como geleias, arroz, café, doces, mel são liberados.

Alguns pacientes respondem bem a outro tipo de terapia, a qual utiliza o cofator necessário para o funcionamento da Pah (BH_4). Nestes casos, pacientes recebem dicloridrato de sapropterina, a forma sintética da BH_4 , na dose de 20mg/Kg/dia (Hegge et al., 2009). Ela atua como uma chaperona molecular, estabilizando a enzima na conformação correta. A diminuição de 30% ou mais nos níveis basais de Phe indica resposta a esta terapia e geralmente pacientes com PKU moderada se mostram

responsivos a esta alternativa terapêutica, permitindo liberá-los da dieta específica (Christ et al., 2013).

Quanto mais precocemente a doença for diagnosticada e o tratamento iniciado, menores serão os danos causados ao SNC, podendo o paciente ter um desenvolvimento muito próximo ao normal. Um estudo mostrou uma queda progressiva de 4 pontos no QI (quociente de inteligência) a cada 4 semanas de atraso no início do tratamento em crianças aos 4 anos de idade (Smith et al., 1990). Outro estudo mostrou que crianças com níveis de Phe abaixo de 0,36 mM não apresentavam diferença significativa de crianças saudáveis no escore de testes de QI que medeiam a atenção, tempo de reação a estímulos e estímulos visuais (Burgard et al., 1997). Porém, mesmo com o rápido diagnóstico e início imediato do tratamento, os pacientes podem mostrar um déficit no QI quando comparados com pessoas saudáveis, o que mostra que esses pacientes poderiam realizar testes de desenvolvimento intelectual para que possam ser tomadas medidas médicas ou educacionais, caso sejam necessárias (Aghasi et al., 2015; Burgard et al., 1996).

A duração do tratamento é motivo de muitas discussões, mas acredita-se que a dieta deva ser levada por toda a vida. Alguns estudos relatam problemas com pessoas que abandonaram o tratamento em diferentes idades. Em um paciente que abandonou a dieta aos seis anos, surgiram complicações, como espasticidade (rigidez dos músculos) e aumento na frequência de convulsões. Em outro, que abandonou a dieta aos 12 anos, houve prejuízos no seu desempenho escolar e concentração, além de alterações comportamentais (Villasana et al., 1989).

1.2.4 CLASSIFICAÇÃO PKU

A fenilcetonúria pode ser dividida em quatro categorias com base nas concentrações séricas de Phe (Hanley, 2004).

- Fenilcetonúria ou PKU clássica (cPKU): os níveis de Phe são maiores que 1,2 mM, podendo chegar a 6 mM. A enzima apresenta praticamente nenhuma atividade, ficando em torno de 0,3% ou menos do que o normal. Em torno de 80% dos pacientes se encaixam nesta categoria.
- PKU moderada: apresenta níveis entre 0,9-1,2 mM e a atividade enzimática em torno de 2%.
- PKU leve: pacientes apresentam níveis de Phe entre 0,6 - 0,9 mM e atividade enzimática que pode chegar a 5% do normal.
- Hiperfenilalaninemia não PKU: níveis de Phe entre 0,12 - 0,6 mM, que geralmente não requer tratamento.

Os pacientes com níveis intermediários podem eventualmente excretar ácido fenilpirúvico pela urina, dependendo da ingesta das proteínas e podem desenvolver problemas cognitivos leves. Com base nesses dados, estudos recomendam que crianças com concentrações acima de 0,4 mM sigam a dieta com baixa Phe (Costello et al., 1994; van Spronsen, 2011).

Também existe a síndrome conhecida como fenilcetonúria materna (mPKU), que ocorre quando mães fenilcetonúricas apresentam níveis plasmáticos elevados de Phe durante a gravidez. A Phe possui efeitos teratogênicos, podendo o bebê nascer com retardo mental, dismorfias e microcefalia (Lyon et al., 1996). Recomenda-se que os níveis de fenilalanina estejam sob controle entre 2-3 meses antes da concepção.

1.3 ESPÉCIES REATIVAS E ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres (RL) é o termo usado para qualquer átomo ou molécula que contenha ao menos um elétron desemparelhado. Assim, essas espécies reativas (ER) são muito instáveis e podem reagir com outras moléculas, causando dano celular (Valko et al., 2007).

As ER são produzidas naturalmente pelos processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em reações bioquímicas. As mitocôndrias configuram como principal local de produção de ER, e o fazem durante a respiração celular. Durante o metabolismo aeróbico, o oxigênio molecular recebe quatro elétrons, resultando na formação de água (Bergendi et al., 1999). Entre 0,1 e 4% do oxigênio que não é reduzido à água na cadeia respiratória pode gerar espécies reativas de oxigênio (ERO). Essa quantidade é mais do que o suficiente para ter efeitos letais, a não ser que este radical livre seja rapidamente neutralizado (Kaminsky and Zhivotovsky, 2014).

Entre as principais formas de ERO está o ânion superóxido (O_2^-), que apresenta uma baixa capacidade oxidativa. Já o radical hidroxila ($OH\bullet$) é mais reativo, mas com menor poder de difusão, quando comparado com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio pode participar da reação de Fenton, na qual reage com o Fe^{2+} formando Fe^{3+} e radical hidroxila. Também pode sofrer a reação Haber-Weiss, na qual, juntamente com o ânion superóxido, gera o radical $OH\bullet$ (Anderson, 1996). Entre as formas de espécies reativas de nitrogênio (ERN) está o óxido nítrico (NO).

Em excesso, as ER podem causar danos à estrutura celular, DNA, lipídeos e proteínas, sendo que as alterações podem ocorrer em sítios ativos de enzimas ou alterar a conformação de proteínas, causando perda de sua função.

O estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção de ERO e de ERN ultrapassa a capacidade de remoção pelos mecanismos de defesa celular, causando danos a biomoléculas que podem levar à morte celular.

As células possuem mecanismos antioxidantes que tentam minimizar ou prevenir estes possíveis danos provocados pelas ER. A remoção de ER pode ocorrer por defesas enzimáticas e não enzimáticas.

Estas defesas antioxidantes podem ficar comprometidas quando as enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e a glutaciona peroxidase (GPx) encontram-se com suas atividades diminuídas. Ou ainda, quando ocorre a diminuição da ingesta de moléculas com ação antioxidante, como vitamina A, vitamina C, resveratrol, entre outras. A SOD remove o ânion superóxido gerando oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, que é removido pela CAT e GPx (Figura 3). A GPx remove este peróxido de hidrogênio, oxidando a glutaciona reduzida, que é transformada novamente em GSH pela glutaciona redutase (Figura 3).

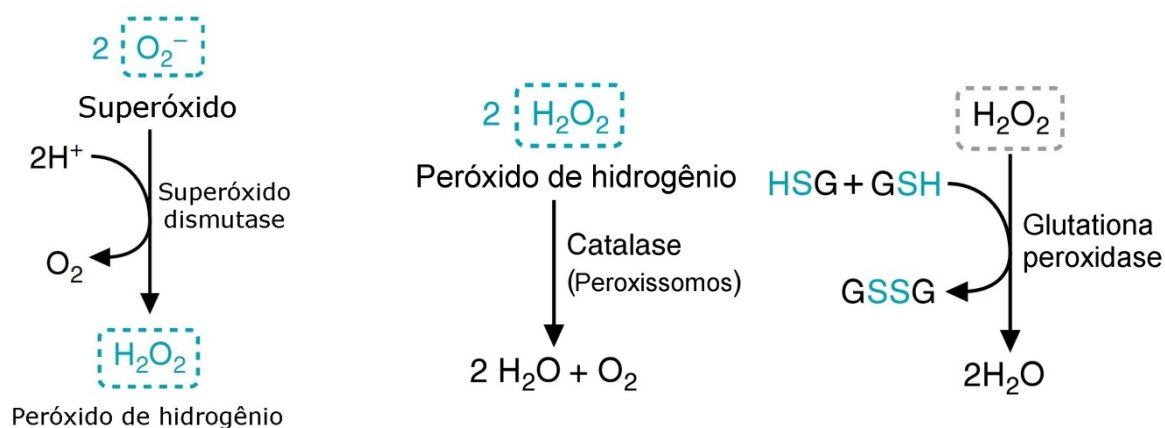


Figura 3. Defesas enzimáticas antioxidantes. A superóxido-dismutase converte superóxido em peróxido de hidrogênio. A catalase reduz o peróxido de hidrogênio. A glutaciona-peroxidase transfere elétrons da glutaciona (GSH) para o peróxido de hidrogênio. Adaptada de Smith et al., 2007.

A glutathiona reduzida (GSH) (Figura 4) é a defesa antioxidante não enzimática mais importante do sistema nervoso central. Ela pode atuar neutralizando espécies reativas de oxigênio, como o H_2O_2 , ou ainda servir como substrato da glutathiona-peroxidase (GPx), que atua reduzindo peróxido de hidrogênio a água. Os astrócitos possuem níveis de GSH 10 vezes maiores do que os neurônios, demonstrando sua importância na defesa antioxidante no cérebro. A GSH pode ser obtida na dieta ou pela síntese endógena, utilizando os aminoácidos glutamato, glicina e cisteína, pela ação da enzima glutathiona-sintetase.

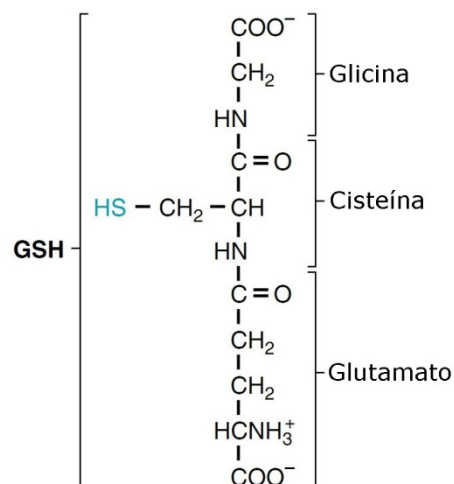


Figura 4. Estrutura da glutathiona. O grupamento sulfidrila da glutathiona, o que é oxidado a um dissulfeto, está representado em azul. Adaptada de Smith et al., 2007.

Na PKU, o estresse oxidativo tem sido bem documentado, tanto em pacientes quanto em modelos animais. Apesar do seu mecanismo não estar bem elucidado, ele parece tender para o estresse oxidativo por EROs. Um estudo em eritrócitos de pacientes não tratados com a dieta específica mostrou diminuição das defesas antioxidantes (conteúdo de GSH e atividade de GPx) e aumento de dano a lipídeos e proteínas (Sitta et al., 2009). No cérebro de ratos tratados com Phe também foram

encontradas alterações nas enzimas antioxidantes, além de redução na atividade de GPx e CAT (Mazzola et al., 2011). Outro trabalho, também em cérebro de ratos, mostrou que a Phe inibiu a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx, além de diminuir a quantidade de GSH, sendo que essas inibições foram revertidas pela administração de ácido lipóico (Moraes et al., 2010).

1.4 REDE DE TRANSFERÊNCIA DE GRUPOS FOSFORILA

A rede de transferência de grupos fosforila é uma rede que tem como função suprir as necessidades metabólicas dos tecidos. O cérebro é um dos órgãos que mais utiliza energia, entre 15-20% do total do organismo. Assim, esta rede intracelular, composta por enzimas como a creatina-cinase, a adenilado-cinase e enzimas glicolíticas, como a piruvato-cinase, atua em processos de disponibilização e manutenção de ATP de acordo com o consumo celular, sendo muito importante para a manutenção da homeostase cerebral (Dzeja, 2003; Zhu et al., 2012).

1.4.1 CREATINA-CINASE

A creatina-cinase (CK) é uma das enzimas mais importantes da rede de transferência de grupos fosforila. Ela está presente em diferentes isoformas na mitocôndria (CKm) e no citosol (CKc), em diversos tecidos, como músculo, coração e encéfalo. CKm está localizada na membrana mitocondrial interna e está acoplada à fosforilação oxidativa. A CKm facilita o transporte de grupos fosfato de alta energia (ATP) da mitocôndria para o citosol (Mm et al., 2015; Stadhouders et al., 1994). A CKm catalisa reversivelmente a síntese de fosfocreatina (PCr) a partir de ATP e Creatina (Cr), fornecendo uma fonte de fosfato de alta energia para o citosol, onde a

PCr será utilizada pela CKc, a qual catalisará a reação no sentido inverso, liberando de ATP + Cr, estando acoplada aos processos de consumo energético da célula.

Alguns trabalhos mostram que alterações da CK estão relacionadas com doenças neurodegenerativas e EIM, incluindo a PKU (Tonin et al., 2009; Zhang et al., 2011).

1.4.2 PIRUVATO-CINASE

A piruvato-cinase (PK) catalisa a última etapa da glicólise, a transferência do fosforil do fosfoenolpiruvato (PEP) ao ADP, formando piruvato e ATP.

A glicólise é uma via muito importante e universal do catabolismo da glicose. Alguns tecidos, como a medula renal e os eritrócitos, utilizam a quebra glicolítica como única fonte de energia. Já no encéfalo, a via glicolítica é o principal substrato energético.

Existem quatro tipos de isoenzimas da piruvato-cinase: a isoenzima L (mais encontrada no fígado), a isoenzima tipo R (encontrada nos eritrócitos), a isoenzima tipo M2 (encontrada em tecidos indiferenciados) e a isoenzima tipo M1 (encontrada em tecidos diferenciados, entre eles, músculo esquelético e tecido cerebral) (Dabrowska et al., 1998; Verhagen et al., 1985).

Alguns estudos mostram que o acúmulo de Phe ou outros aminoácidos é capaz de inibir a atividade desta enzima e, conseqüentemente, a produção de energia (de Andrade et al., 2012; Feksa et al., 2005, 2002).

1.4.3 ADENILATO-CINASE

A adenilato-cinase (AK) é capaz de repor ATP através de uma reação reversível em que utiliza duas moléculas de ADP e forma uma de ATP + AMP. A AK regula as atividades de enzimas da glicólise e glicogenólise em respostas às demandas energéticas pelas células (Dzeja and Terzic, 2009).

A AK juntamente com as outras enzimas da rede de transferência de grupos fosforila transportam o grupamento fosforila do ATP da mitocôndria ao citosol, suprindo as necessidades energéticas dos tecidos (Ames, 2000).

Alguns estudos apontam que EIM como a doença do xarope do bordo e a tirosinemia do tipo II podem estar relacionadas com alterações no funcionamento da AK (de Andrade et al., 2012; de Franceschi et al., 2013).

1.5 ASTRÓCITOS

As células do sistema nervoso central são divididas em dois grandes grupos: os neurônios e as células gliais. As células gliais dividem-se em microglia e macroglia, composta por oligodendrócitos e astrócitos, que são as células em maior número no cérebro. Estes últimos são ainda subdivididos em astrócitos protoplasmáticos (presentes na substância cinzenta) e astrócitos fibrosos (presentes na substância branca) (Sofroniew and Vinters, 2010).

Os astrócitos são mais do que apenas células de suporte para neurônios, eles desempenham muitas funções em processos fisiológicos como a regulação de íons,

neurotransmissores, manutenção do metabolismo, plasticidade e transmissão sináptica, atuando o astrócitos como um terceiro elemento, juntamente com os neurônios pré e pós sinápticos (Perea et al., 2009). Também fazem parte da barreira hematoencefálica, que protege o encéfalo da entrada de certas moléculas, com base no tamanho e na polaridade das mesmas (Miner and Diamond, 2015).

Como são bem posicionados, conectados a vasos e também a axônios, facilmente captam glicose da corrente sanguínea e fornecem metabólitos energéticos para diferentes células da substância branca. Além disso, são capazes de armazenar grandes quantidades de glicogênio, que podem ser utilizadas como energia através da glicogénólise e posterior formação de lactato para os neurônios, que necessitam de grandes quantidades de ATP para manter suas funções metabólicas (Falkowska et al., 2015). Os neurônios são mais suscetíveis à diminuição energética e os astrócitos auxiliam durante períodos de hipoglicemia ou de grande atividade neuronal (Suh et al., 2007). Acredita-se que durante alta atividade dos neurônios ocorra prejuízo na glicólise neuronal, tornando-se o lactato provido pelo astrócitos como o combustível preferido pelo neurônio (Occhipinti et al., 2009). Ainda, os astrócitos cooperam com a síntese de glutathiona pelos neurônios, e assim têm um importante papel na proteção dos neurônios contra o excesso de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (Fernandez-Fernandez et al., 2012). Também são capazes de atuar na regulação do fluxo sanguíneo cerebral, liberando mediadores como prostaglandinas e óxido nítrico que aumentam ou diminuem o diâmetro dos vasos de maneira coordenada (Iadecola and Nedergaard, 2007).

Além do papel dos astrócitos em inúmeros aspectos fisiológicos do SNC, o envolvimento destas células em processos patológicos também tem sido desvendado, abrindo caminho para que novas estratégias terapêuticas sejam desenvolvidas. Após um acidente vascular cerebral isquêmico, por exemplo, os astrócitos podem tanto agravar a

lesão, através de resposta inflamatória, como promover neuroproteção, diminuindo os efeitos excitotóxicos (Liu and Chopp, 2015).

A disfunção das células gliais também já foi descrita em doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (Cabezas et al., 2014) e a doença de Alzheimer (Carter et al., 2012), e alguns trabalhos já apontam a utilização de abordagens terapêuticas que têm como alvo as disfunções astrocíticas (Finsterwald et al., 2015). Também na PKU já foi descrito o envolvimento das células gliais, através de disfunções no processo de mielinização por oligodendrócitos (Dyer et al., 1996). Além disso, possíveis alterações no metabolismo dos astrócitos, causados pela elevação na concentração de aminoácidos, nos erros inatos do metabolismo, poderiam contribuir para o dano neuronal e disfunções no funcionamento do SNC.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da fenilalanina sobre parâmetros de estresse oxidativo, viabilidade celular, metabolismo energético e concentração dos aminoácidos fenilalanina e tirosina em cultura de astrócitos corticais de ratos Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos de Phe (0,5, 1,0 e 1,5 mM) em cultura de astrócitos corticais de ratos Wistar sobre:

- Viabilidade celular: ensaio MTT e dosagem de LDH no meio de cultura.
- Estresse oxidativo: determinar a oxidação de 2'7'-diclorofluoresceína (DCF), quantificar GSH, medir a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase
- Rede de transferência de grupos fosforila: avaliar a atividade das enzimas creatina-quinase citosólica e mitocondrial, adenilato-quinase e piruvato-quinase.
- Quantificar os aminoácidos fenilalanina e tirosina

Artigo publicado na revista Metabolic Brain Disease

PHENYLALANINE INDUCES OXIDATIVE STRESS AND DECREASES THE VIABILITY OF RAT ASTROCYTES: POSSIBLE RELEVANCE FOR THE PATHPHYSIOLOGY OF NEURODEGENERATION IN PHENYLKETONURIA

Thales Preissler, Ini Juliana Bristot, Bruna May Lopes Costa, Elissa Kerli Fernandes, Elenara Rieger, Vanessa Trindade Bortoluzzi, Itiane Diehl de Franceschi, Carlos Severo Dutra filho, José Claudio Fonseca Moreira e Clovis Milton Duval Wannmacher.

Phenylalanine induces oxidative stress and decreases the viability of rat astrocytes: possible relevance for the pathophysiology of neurodegeneration in phenylketonuria

Thales Preissler¹ · Ivi Juliana Bristot¹ · Bruna May Lopes Costa¹ ·
Elissa Kerli Fernandes¹ · Elenara Rieger¹ · Vanessa Trindade Bortoluzzi¹ ·
Ítiane Diehl de Franceschi¹ · Carlos Severo Dutra-Filho¹ ·
José Claudio Fonseca Moreira¹ · Clovis Milton Duval Wannmacher¹

Received: 1 September 2015 / Accepted: 9 November 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract The aim of this study was to investigate the effects of phenylalanine on oxidative stress and some metabolic parameters in astrocyte cultures from newborn Wistar rats. Astrocytes were cultured under four conditions: control (0.4 mM phenylalanine concentration in the Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) solution), Phe addition to achieve 0.5, 1.0 or 1.5 mM final phenylalanine concentrations. After 72 h the astrocytes were separated for the biochemical measurements. Overall measure of mitochondrial function by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and cell viability measured by lactate dehydrogenase (LDH) assays indicated that phenylalanine induced cell damage at the three concentrations tested. The alteration on the various parameters of oxidative stress indicated that phenylalanine was able to induce free radicals production. Therefore, our results strongly suggest that Phe at concentrations usually found in PKU induces oxidative stress and consequently cell death in astrocytes cultures. Considering the importance of the astrocytes for brain function, it is possible that these astrocytes alterations may contribute to the brain damage found in PKU patients.

Keywords Astrocytes · Phenylalanine · Oxidative stress

✉ Clovis Milton Duval Wannmacher
clovisdw@ufrgs.br

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, CEP, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

Introduction

Phenylketonuria (PKU) is the most common inborn error of amino acid metabolism. It is caused by mutations in the gene that expresses phenylalanine hydroxylase enzyme (PH) that converts phenylalanine (Phe) to tyrosine (Tyr). Partial or complete enzyme inactivity leads to high levels of phenylalanine in tissues, blood, and other biological fluids (Mitchell et al. 2011). PKU can be divided into four categories based on Phe levels. Classic PKU is defined as blood Phe levels greater than 1.2 mM; moderate PKU is characterized by blood Phe levels between 0.9 and 1.2 mM; mild/atypical PKU present blood Phe levels between 0.6 and 0.9 mM; non PKU hyperphenylalaninemia is characterized by blood Phe levels of 0.12–0.6 mM which may not require treatment (Hanley 2004). The main neurological problems can include seizures, motor disturbances and mental retardation. A few untreated patients can reach adulthood without too many problems (Pietz 1998; Mitchell et al. 2011).

The treatment of PKU has three important steps: start of treatment, quality, and duration of blood Phe level control. It is of primary importance for successful treatment, that it should start as early as possible within the first weeks of life, showing the importance of neonatal screening. Treatment is very difficult as it consists of a restrictive, semi-synthetic diet. This diet is based on vegetarian fare (no ingestion of meat, eggs, cheese, milk), but with supplementation of medical formulas that contain amino acids (except Phe), vitamins and minerals (Feillet and Agostoni 2010; Vilaseca et al. 2010).

Oxidative stress is an imbalance that occurs between reactive species (RS) that can be from oxygen (ROS) or nitrogen (RNS) and antioxidant defenses. This overproduction of RS can cause oxidative damage to biomolecules, such as proteins, carbohydrates and DNA, leading to cell injury or death (Halliwell 2007).

Cellular energy homeostasis involving ATP production and consumption process are critical for nervous system function. Mitochondrial activity, creatine kinase (CK), adenylate kinase (AK) and glycolytic enzymes, as pyruvate kinase (PK), and other enzymes are part of this important process (Dzeja 2003).

Many studies showing alterations in oxidative stress parameters in a significant number of inborn errors of metabolism have been carried out not only in animal models, but also in patients (Sitta et al. 2011; Rojas et al. 2012; de Franceschi et al. 2013; Gemelli et al. 2013). Additionally, several studies have reported that those metabolic diseases are also linked to alterations of energy metabolism in brain, showing a shift in the activity of some enzymes of the energy homeostasis, like pyruvate, adenylate and creatine kinase, in animal models of tyrosinemia type II, phenylketonuria, histidinemia, maple syrup urine disease, and β -alaninemia (Feksa et al. 2005; de Andrade et al. 2012; Rojas et al. 2012; de Franceschi et al. 2013; Gemelli et al. 2013).

Astrocytes are a sub-type of glia cells, and the most abundant cells in the brain. They perform many functions in the central nervous system, in structural, metabolic support to neurons, synaptic transmission modulation, regulation of extracellular ions homeostasis, pH buffering of the brain microenvironment, defense against oxidative stress, and repair of nervous system (Allen and Barres 2005; Hertz et al. 2007; Obara et al. 2008; Slemmer et al. 2008; Fuller et al. 2010). Alterations in the cellular redox and metabolic state can affect the metabolism of astrocytes and subsequently neurons.

Considering that there is little information about the effects of phenylalanine on astrocytes oxidative stress and energy metabolism, and that the mechanism of neurocognitive disorders in PKU is not well-understood, the aim of this study was to investigate the effects of Phe on oxidative stress and some metabolic parameters in astrocytes cultures from Wistar rats.

Materials and methods

Animals

Newborn Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil were used in the experiments. The rats had free access to water and to a standard commercial chow (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil) containing 20.5 % protein (predominantly soybean supplemented with methionine), 54 % carbohydrate, 4.5 % fiber, 4 % lipids, 7 % ash and 10 % moisture. Temperature was maintained at 24 ± 1 °C, with a 12–12 h light–dark cycle. The “Principles of Laboratory Animal Care” (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication no. 80–23, revised 1996; <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>) were followed in all the experiments, and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee For Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul.

Astrocyte cultures

Primary astrocyte cultures were prepared as previously described (Gottfried et al. 1999). Briefly, cerebral cortices of new-born Wistar rats (1–2 days old) were removed, placed in a Ca^{2+} and Mg^{2+} free balanced salt solution (CMF-BSS) pH 7.4, containing 137 mM NaCl; 5.36 mM KCl; 0.27 mM Na HPO₄; 1.1 mM KH PO₄ and 6.1 mM glucose, cleaned of meninges and mechanically dissociated by sequential passage through a Pasteur pipette. The cell suspension was allowed to settle for 4–5 min and the supernatant was transferred to another tube. The cells sediment were suspended in CMF-BSS and dissociated again. The two supernatants were combined and the resulting cell suspension centrifuged at 1000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded, the pellet resuspended in DMEM (dulbecco’s modified eagle medium) (pH 7.6), supplemented with 8.39 mM HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-Ethane Sulfonic Acid); 23.8 mM NaHCO₃; 0.1 % fungisone; 0.032 % garamycin and 10 % fetal calf serum. The cells were plated at a density of 1.5×10^5 cells/cm² into 24-well plates pre-treated with poly-L-lysine. Cultures were maintained in 5 % CO₂/95 % air at 37 °C and allowed to grow to confluence 2 weeks. Medium was changed every 3–4 days. Immediately before medium changes, plates were briefly shaken manually to remove non-adherent cells.

Treatment of the cultures

After confluence, cell cultures were separated into four groups: control (0.4 mM Phe concentration in the DMEM solution), Phe addition to achieve 0.5, 1.0 or 1.5 mM final Phe concentrations. Astrocytes were treated for 72 h with DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) (pH 7.6), supplemented with 8.39 mM HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-Ethane Sulfonic Acid); 23.8 mM NaHCO₃; 0.1 % fungisone; 0.032 % garamicine and 5 % fetal calf serum.

MTT reduction assay

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added to the medium at a concentration of 50 ng/mL and cells were incubated for 30 min at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO₂/95 % air. Subsequently, the medium was removed and the MTT crystals were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). Absorbance values were measured at 560 nm and 650 nm. The results are expressed as percentages of the control (Leite et al. 2009).

Lactate dehydrogenase assay

Lactate dehydrogenase (LDH) assay was carried out using 50 μL of culture medium with a colorimetric assay from Doles (Goiania, Brazil) (Leite et al. 2009).

Measurements of oxidative stress parameters

2',7'-Dihydrodichlorofluorescein (DCF) Oxidation Assay.

The production of oxygen and nitrogen reactive species was performed according to LeBel et al. (LeBel et al. 1992) by using reduced 2',7'-dihydrodichlorofluoresceindiacetate (DCF-DA). Briefly, 30 μ L samples were incubated for 30 min at 37 °C in the dark with 30 μ L of 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 with 140 mM KCl and 240 μ L of 100 μ M reduced 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) solution in a 96 wells plate. H₂DCF-DA is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases and H₂DCF formed is oxidized by reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS) presenting in samples to DCF. The DCF fluorescence intensity parallels to the amount of reactive species formed. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 480 and 535 nm, respectively. Calibration curve was performed with standard DCF (0.25–10 μ M) and the levels of reactive species were expressed as nmol of DCF formed per mg of protein..

Reduced glutathione (GSH) content

The most important non-enzymatic antioxidant present in the cells is glutathione (GSH). GSH reduces peroxides, mainly through GPx activity, scavenging superoxide and hydroxyl radicals, and regenerates oxidized C vitamin. GSH levels were measured according to Browne and Armstrong (Browne and Armstrong 1998) which is based on the reaction of GSH with the fluorophore o-phthalaldehyde (OPT) after the sample be deproteinized with metaphosphoric acid. Then, 150 μ L of the samples were incubated with an equal volume of o-phthaldialdehyde (1 mg/mL of methanol) by 15 min at 37 °C. After that, fluorescence was measured using excitation of 350 nm and emission of 420 nm wavelengths. Calibration curve was performed with standard GSH (1 mM), and the tissue supernatant concentrations were expressed as nmol of GSH per mg of protein.

Catalase (CAT) activity

The activity of CAT was assayed according to Aebi (Aebi 1984) by measuring the absorbance decrease of H₂O₂ at 240 nm of H₂O₂. The reaction medium contained 20 mM H₂O₂, 0.1 % Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 and 10 μ L of the supernatants. CAT is responsible for transformation of H₂O₂ in H₂O. Hydrogen peroxide can react with thiol and methionyl groups of enzymes and other proteins, and form the high reactive hydroxyl radicals. One CAT unit is defined as 1 μ mol of hydrogen peroxide consumed per min and the specific activity is calculated as CAT units per mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity

Activity of SOD is responsible for dismutation of superoxide free radicals in hydrogen peroxide, a less reactive substance. SOD activity was determined as described earlier (Marklund et al. 1985). This assay is based on the 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. 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 was expressed as SOD units per mg of protein.

Glutathione peroxidase (GPx) activity

Activity of GPx was measured according to Wendel (Wendel 1981) using tert-butyl-hydroperoxide as substrate. The enzyme activity was determined by monitoring the nicotinamide

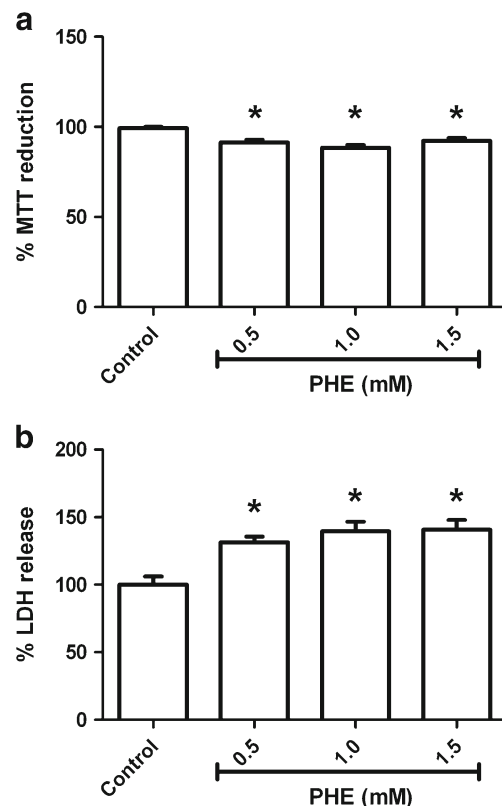


Fig. 1 Effect of phenylalanine on MTT reduction by astrocyte (a) and on LDH release in the medium of astrocyte cultures (b) from Wistar rats. Astrocytes were treated with phenylalanine (0.5–1.5 mM) for 72 h in DMEM (dulbecco's modified eagle medium) with 5 % serum. Data are mean \pm SEM for 10 animals per group and are expressed as percentage of the controls. Astrocytes were treated with phenylalanine (0.5–1.5 mM) for 72 h in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) with 5 % serum MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide); LDH (lactate dehydrogenase). * p < 0.05 compared to control (one-way ANOVA followed by the Tukey test)

adenosine dinucleotide phosphate (NADPH) disappearance at 340 nm in a medium containing 100 mM potassium phosphate buffer 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 7.7, 2 mM glutathione, 0.15 U/mL glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl-hydroperoxide, 0.1 mM NADPH, and 10 μ L supernatants. One GPx unit is defined as 1 μ mol of NADPH consumed per minute. The specific activity was expressed as micromole of NADPH consumed per minute per mg of protein.

Measurements of kinases activities

Creatine kinase (CK) activity

Creatine kinase activity was assayed in the reaction mixture contained the following final concentrations: 65 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 7 mM phosphocreatine, 9 mM MgSO₄, and 1 μ g of protein in a final volume of 0.1 mL. After 10 min of pre-incubation at 37 °C, the reaction was started by the addition of 0.3 μ mol of ADP. The reaction was stopped after 10 min by

the addition of 1 μ mol of p-hydroxymercuribenzoic acid. The reagent concentrations and the incubation time were chosen to assure linearity of the enzymatic reaction. Appropriate controls were carried out to measure chemical hydrolysis of phosphocreatine. The creatine formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes (Hughes 1962). The color was

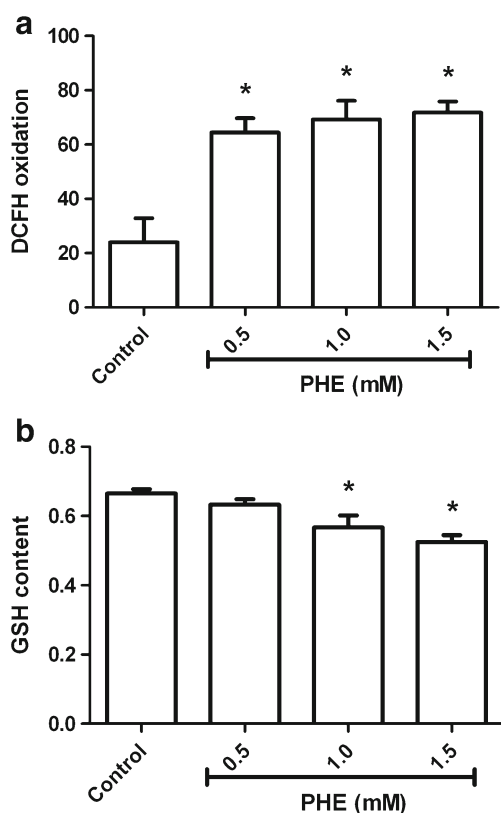


Fig. 2 Effect of phenylalanine on DCFH oxidation (a) and on GSH content (b) in astrocytes from Wistar rats. Data are expressed as mean \pm SEM for 8 animals per group. Data from DCFH (reduced: 2',7'-dihydrodichlorofluorescein) oxidation are expressed as nmol of DCF (2',7'-dihydrodichlorofluorescein) formed per mg of protein. Data of GSH (reduced glutathione) content are expressed as nmol of GSH per mg of protein. Astrocytes were treated with phenylalanine (0.5–1.5 mM) for 72 h in DMEM (dulbecco's modified eagle medium) with 5 % serum. * p < 0.05 compared to control (one-way ANOVA followed by the Tukey test)

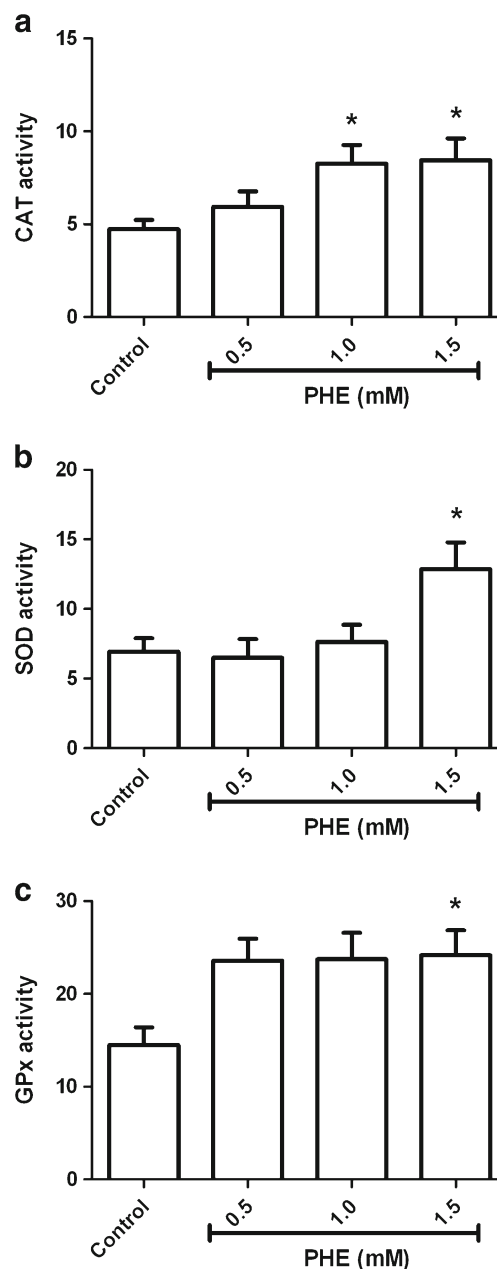


Fig. 3 Effect of phenylalanine on CAT (a), SOD (b) and GPx (c) activities in astrocytes from Wistar rats. Data are expressed as mean \pm SEM for 8 animals per group. Data from CAT (catalase) are expressed as units of CAT per mg of protein; data from SOD (superoxide dismutase) are expressed as units of SOD per mg of protein; data from GPx (glutathione peroxidase) are expressed as units of GPx per mg of protein. Astrocytes were treated with phenylalanine (0.5–1.5 mM) for 72 h in DMEM (dulbecco's modified eagle medium) with 5 % serum. * p < 0.05 compared to control (one-way ANOVA followed by the Tukey test)

Table 1 Activities of the enzymes of the energy homeostasis in astrocyte cultures from Wistar rats incubated with phenylalanine

	Control	0.5 mM Phe	1.0 mM Phe	1.5 mM Phe
PK	1.843 ± 0.1068	1.887 ± 0.0901	1.960 ± 0.1298	1.764 ± 0.1296
CK cyt	2.765 ± 0.1309	2.750 ± 0.1406	2.878 ± 0.1409	2.967 ± 0.1980
CK mit	1.212 ± 0.1171	1.225 ± 0.0775	1.233 ± 0.1394	1.084 ± 0.0739
AK	1.314 ± 0.1397	1.752 ± 0.2262	1.870 ± 0.2616	1.555 ± 0.1787

Data are expressed as mean ± SEM for 8 animals per group. Astrocyte cultures were treated with phenylalanine (0.5–1.5 mM) for 72 h in DMEM (dulbecco's modified eagle medium) with 5 % serum. Data from CK cyt (cytosolic creatine kinase) and CK mit (mitochondrial creatine kinase) are expressed as μmol of creatine formed per min per mg of protein. Data from PK (pyruvate kinase) are expressed as μmol of pyruvate formed per min per mg of protein. Data from AK (adenylate kinase) are expressed as μmol of ATP formed per min per mg of protein. No significant differences found between the groups (one way ANOVA)

developed by the addition of 0.1 mL 2 % α-naphthol and 0.1 mL 0.05 % diacetyl in a final volume of 1 mL and read after 20 min at 540 nm. Results were expressed as μmol of creatine formed per min per mg of protein.

Pyruvate kinase (PK) activity

Pyruvate kinase activity was assayed essentially as described (Leong et al. 1981). The incubation medium consisted of 0.1 M Tris/HCl buffer pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.16 mM NADH, 75 mM KCl, 5.0 mM ADP, 7 U of L-lactate dehydrogenase, 0.1 % (v/v) Triton X-100, and 10 μL of the mitochondria-free supernatant in a final volume of 0.5 mL. After 10 min of pre-incubation at 37 °C, the reaction was started by the addition of 1 mM phosphoenol pyruvate. All assays were performed in duplicate at 25 °C. Results were expressed as μmol of pyruvate formed per min per mg of protein.

Adenylate kinase (AK) activity

Adenylate kinase (AK) activity was measured with a coupled enzyme assay with hexokinase (HK) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), according to Dzeja (Dzeja et al. 2002). The reaction mixture contained 100 mM KCl, 20 mM HEPES, 20 mM glucose, 4 mM MgCl₂, 2 mM NADP⁺, 1 mM EDTA, 4.5 U/mL of HK, 2 U/mL of G6PD, and 1 μg of protein homogenate. The reaction was initiated by the addition of 2 mM ADP and the reduction of NADP⁺ was followed at 340 nm for 3 min in a spectrophotometer. ADP, NADP⁺, G6PD, and HK were dissolved in water. Reagents concentration and assay time (3 min) were chosen to assure the linearity of the reaction. The results were expressed in μmol of ATP formed per min per mg of protein.

Phe and Tyr measurement

The concentration of free amino acids in cell supernatant was determined by HPLC according to Joseph and Marsden

(Joseph and Marsden 1986). The analysis was performed by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) and fluorescent detection using orthophthaldialdehyde plus mercaptoethanol. The flow rate was 1.5 ml/min in a gradient of the mobile phase (methanol and phosphate buffer: buffer A, 80 % methanol; buffer B, 20 % methanol), and the duration of each analysis was 50 min. The amino acids were quantitatively determined by relating their chromatographic peak areas to those obtained for a known standard mixture and to that of the internal standard homocysteic acid.

Protein determination

Protein content of astrocytes cultures homogenates was determined by the method of Lowry (Lowry et al. 1951), using serum bovine albumin as the standard.

Statistical analysis

Data were expressed as mean ± SEM and were analyzed by one-way ANOVA. Comparison between means was analyzed by the Tukey test when the F value was significant. Correlation analysis was performed using Spearman's correlation. All data were analyzed by the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS). Values were considered significant when $p < 0.05$.

Results

In our study we tested the exposure of astrocyte cultures from Wistar rats to different concentrations of Phe. The concentrations used were based on those found in classic, moderate and mild PKU.

Initially, we determined the overall mitochondrial function by MTT (Fig. 1a) and cell viability performing LDH assays (Fig. 1b). MTT assay showed significant decrease in MTT reduction at 0.5, 1.0 and 1.5 mM Phe concentration by 8, 11

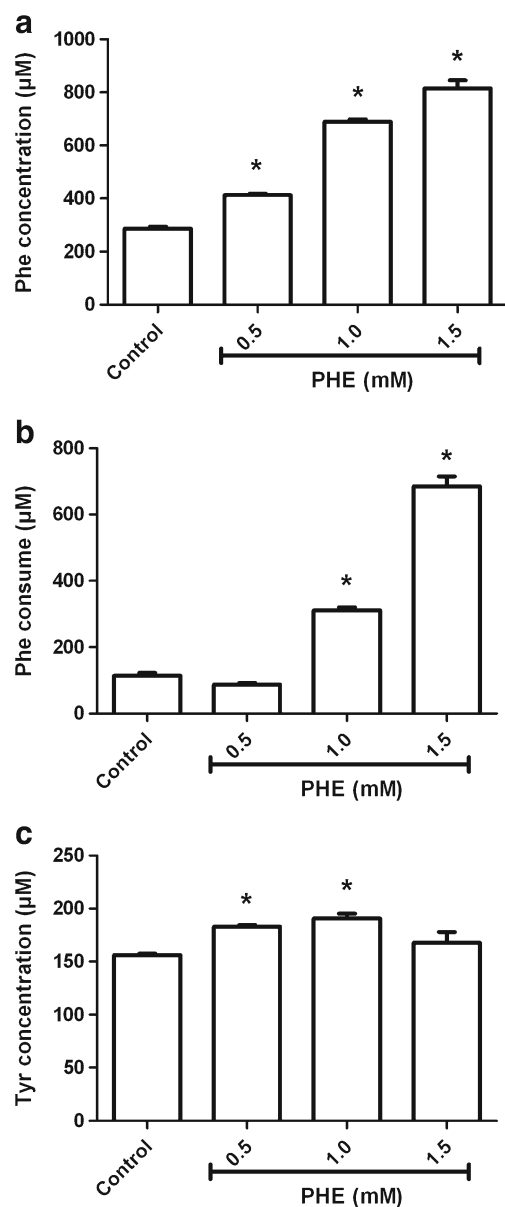


Fig. 4 Final Phe concentration (a), Phe consumed (b) and final Tyr concentration (c) in astrocyte cultures medium from Wistar rats. Data are mean \pm SEM for 5 animals per group. Consumed Phe concentration was calculated subtracting final from initial concentration in the astrocytes culture medium. Astrocytes were treated with phenylalanine (0.5–1.5 mM) for 72 h in DMEM (dulbecco's modified eagle medium) with 5 % serum. Data are expressed as mean \pm SEM, 3 animals per group. * $p < 0.05$ compared to control (one-way ANOVA followed by the Tukey test)

and 7 % respectively [$F(3,61) = 11.69; p < 0.05$]. Extracellular LDH was increase by 31, 39 and 41 % at 0.5, 1.0 and 1.5 mM Phe concentration respectively [$F(3,61) = 9.04; p < 0.05$]. MTT indicated diminished mitochondrial function and LDH assays indicated that cell damage occurred at all Phe concentration. Then, the ROS production in astrocytes was evaluated by a DCFH oxidation assay (Fig. 2a). ROS increased approximately 3 times, showing a significant effect at all Phe

concentration [$F(3,28) = 11.70; p < 0.05$]. Next, GSH content, an important defense mechanism against oxidative damage in brain, was measured and showed a significant decrease by 15 % and 21 % at 1.0 and 1.5 mM Phe concentration, respectively [$F(3,18) = 8.65; p < 0.05$] (Fig. 2b).

We also evaluated three antioxidant enzymes that have shown increased activities compared to control groups. CAT was significantly more active at 1.0 and 1.5 mM Phe concentration, by 74 and 78 % respectively [$F(3,28) = 4.035; p < 0.05$] (Fig. 3a), while SOD presented an increase of 85 % at 1.5 mM Phe concentration [$F(3,28) = 4.46; p < 0.05$] (Fig. 3b). Although demonstrating higher GPx activity at all Phe concentrations tested (Fig. 3c), only at 1.5 mM was significant with 67 % higher than the control group [$F(3,24) = 3.548; p < 0.05$]. These results indicated that the enzymatic defenses were increased.

Next, we evaluated the activities of enzymes of energy homeostasis, showing that AK [$F(3,24) = 1.39; p > 0.05$], PK [$F(3,28) = 0.51; p > 0.05$], and both mitochondrial [$F(3, 26) = 0.39; p > 0.05$] and cytosolic CK [$F(3,28) = 0.43; p > 0.05$] did not present significant differences at all Phe concentrations tested (Table 1).

Amino acids (Phe and Tyr) were determined by HPLC from culture medium. Final Phe concentration in culture medium was shown at Fig. 4a, presenting significant differences, as expected [$F(3,8) = 212.3; p < 0.05$]. Phe consumed levels (Fig. 4b) were calculated subtracting final from initial medium concentration. At Phe concentrations of 1.0 and 1.5 mM the consumption of Phe was 170 % and 500 % respectively higher than control [$F(3,8) = 272.2; p < 0.05$]. Tyr final concentration (Fig. 4c) was apparently increased significantly at 0.5 mM by 17 % and at 1.0 mM by 22 % [$F(3,8) = 7.610; p < 0.05$] when compared with the controls, indicating that phenylalanine possibly reduced the consume of tyrosine.

Spearman correlations among the parameters of oxidative stress and cell death were performed (Table 2). Significant correlation coefficient among all the measured parameters of oxidative stress was found.

Discussion

Astrocyte cultures are good models and are widely used in the study of central nervous system. In the case of studying PKU, it has the advantage of working with cells that do not express phenylalanine hydroxylase, present in liver. It was once believed that the lack of conversion of Phe to Tyr would lead to lower levels of Tyr in the brain and consequently there would be a lack in formation of neurotransmitters, causing neurocognitive problems to the patients. Several studies have attempted unsuccessfully to increase the concentration of Tyr in the brain then without any gain to PKU quality of life (Mazzocco et al. 1992; Pietz et al. 1995; Webster and Wildgoose 2010; Smith et al. 1998; Kalsner et al. 2001).

Table 2 Spearman Correlations between the parameters of oxidative stress, overall mitochondrial function, cell death, phenylalanine and tyrosine concentrations in astrocyte cultures from Wistar rats incubated with phenylalanine

	SOD	GSH	GPx	DCFH	CAT	MTT	LDH	Final Phe	Final Tyr	Phe cons
SOD	-									
GSH	-,839**	-								
GPx	,469*	-,550*	-							
DCFH	,660**	-,593**	,200	-						
CAT	,447*	-,431	,401*	,612**	-					
MTT	-,574**	,469*	-,511**	-,482*	-,591**	-				
LDH	,617**	-,659**	,515**	,492**	,598**	-,725**	-			
Final Phe	,767*	-,782**	,434	,566	,770**	-,566	,860**	-		
Final Tyr	,467	-,636*	,098	,566	,515	-,636*	,364	,434	-	
Phe cons	,450	-,673*	,301	,147	,455	-,252	,671*	,699*	-,035	-

Astrocytes were treated with phenylalanine (0.5–1.5 mM) for 72 h in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) with 5 % serum. SOD (superoxide dismutase) activity; GSH (reduced glutathione) content; GPx (glutathione peroxidase) activity; DCFH (2',7'-dihydrodichlorofluorescein) oxidation; CAT (catalase) activity; MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction; LDH (lactate dehydrogenase) release; Final Phe (phenylalanine concentration found in the medium culture after treatment); Final Tyr (tyrosine concentration found in medium culture after treatment); Phe cons (consumed phenylalanine)

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$ (Spearman's rank correlation coefficient)

Our study shows, for the first time, that doses of 0.5, 1.0 and 1.5 mM Phe are capable of decrease the cleavage of MTT and increase LDH release into the extracellular medium in the astrocytes culture. These changes indicate a significant decrease in cell viability, and this may play an important role in the cognitive changes found in patients, whereas astrocytes are essential for the adequate functioning of neurons.

The increase in the oxidation of DCFH by Phe indicates that there is a great amount of reactive species in cortical astrocytes culture at all tested doses. The activities of antioxidant enzymes SOD, CAT, and GPx are changed. SOD is capable of catalyzing the dismutation of the superoxide anion, forming hydrogen peroxide, a less reactive product. SOD and GPx activities were significantly increased only at 1.5 mM Phe concentration. CAT activity was increased at 1.0 and 1.5 mM Phe concentration. CAT turns hydrogen peroxide into water and molecular oxygen, while GPx removes hydrogen peroxide by coupling oxidation reaction of GSH. In addition to act with GPx, GSH is considered one of the most important non-enzymatic antioxidant defenses in the brain, and can act as a scavenger (Dickinson et al. 2003; Masella et al. 2005). Considering that Phe increases ROS formation and enzymatic defenses, and decreases GSH content in the cells, these results suggest that superoxide anion is present in higher concentration, and it has been transformed into hydrogen peroxide, and then into water by CAT and GPx or scavenged by GSH by non-enzymatic reaction.

CK, AK and PK are important enzymes for brain homeostasis (Wallimann et al. 1992; Dzeja et al. 1999, 2002; Dzeja 2003). This network is responsible for maintaining the balance of consumption and production of ATP. As kinases, they are sensitive

to the action of ROS, due to their structure containing thiol groups (Burmistrov et al. 1992; Weeds and Noda 1968; Gilbert 1984; Arstall et al. 1998). We find no difference in the activity of those enzymes unlike other studies in brain cortex and hippocampus of rats subjected to chemical models of inborn errors of metabolism, including PKU, in vitro and in vivo (Feksa et al. 2002; Costabeber et al. 2003; de Andrade et al. 2012; de Franceschi et al. 2013; Gemelli et al. 2013; Kolling et al. 2013). It is possible that this discrepancy may have occurred because the oxidative stress could have been avoided by increasing in antioxidant enzymes activity and by the consumption of GSH by reactive species. We also considered that as the culture cells have the medium removed and were washed with buffer before collected for experiments, it's possible that alterations in the enzymes of the phosphoryltransfer network cannot be detected after high Phe concentrations were normalized.

The final Phe concentrations found in the culture medium were lower than the initial one, possibly because this amino acid was used mainly for protein synthesis, since this amino acid is considered not to be converted to Tyr in the astrocytes. We observed that the higher was Phe concentration in medium, the greater was their consumption, been significant at doses of 1.0 and 1.5 mM.

The final Tyr concentration (Fig. 4c) was significantly increased by 17 % at 0.5 mM and by 22 % at 1.0 mM [$F(3, 8) = 7.610$; $p < 0.05$] compared to the controls. However, it is important to consider that all final Tyr concentrations were lower than 0.4 mM, the basal Tyr concentration in DMEM, indicating that Tyr was in fact consumed. Therefore, the increase was apparent because the consume by the cells in the controls was greater than the consume in the cultures

incubated with Phe. This indicates that Tyr was consumed along the incubation, less than in the controls, possibly because Phe, as was expected, diminished Tyr uptake by the astrocytes by competition.

A significant correlation coefficient among all measured parameters of oxidative stress was found, strongly indicating that oxidative stress was induced by Phe in the astrocytes. The parameters of cell damage and of mitochondrial function significantly correlate with the parameters of oxidative stress, suggesting that reactive species may be a mechanism inducing cell damage and overall mitochondrial function.

In summary, this investigation used an intact cell system composed of astrocytes, resulting cell death caused by phenylalanine in these cells and the compensatory response of oxidative stress expressed as a higher activity of various antioxidant enzymes trying to combat the greater free radical formation. However, it has been pointed out that the alterations observed may also be, at least in part, a consequence of phenylalanine derivatives formed into the astrocytes.

Therefore, our results strongly suggest that Phe at concentrations usually found in PKU induces oxidative stress and consequently cell death in astrocytes cultures. Considering the importance of the astrocytes for brain function, in case these effects also occur in the PKU patients it is possible that these astrocytes alterations may contribute to the brain damage found in PKU patients.

Acknowledgments This work was supported by the research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
- Allen NJ, Barres BA (2005) Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 15(5):542–548
- Arstall MA, Bailey C, Gross WL, Bak M, Balligand JL, Kelly RA (1998) Reversible S-nitrosation of creatine kinase by nitric oxide in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30(5):979–988
- Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347–352
- Burmistrov SO, Mashek OP, Kotin AM (1992) The action of acute alcoholic intoxication on the antioxidant system and creatine kinase activity in the brain of rat embryos. *Eksp Klin Farmakol* 55(5):54–56
- Costabeber E, Kessler A, Severo Dutra-Filho C, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CMD (2003) Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *Int J Dev Neurosci* 21(2):111–116
- De Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wannmacher CMD (2012) Tyrosine impairs enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of rats. *Mol Cell Biochem* 364(1–2):253–261
- De Franceschi ID, Rieger E, Vargas AP, Rojas DB, Campos AG, Rech VC, et al. (2013) Effect of leucine administration to female rats during pregnancy and lactation on oxidative stress and enzymes activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res* 38(3):632–643
- Dickinson DA, Moellering DR, Iles KE, Patel RP, Levenon A-L, Wigley A, et al. (2003) Cytoprotection against oxidative stress and the regulation of glutathione synthesis. *Biol Chem* 384(4):527–537
- Dzeja PP (2003) Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 206(12):2039–2047
- Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A (1999) Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ Res* 84(10):1137–1143
- Dzeja PP, Bortolon R, Perez-Terzic C, Holmuhamedov EL, Terzic A (2002) Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc Natl Acad Sci* 99(15):10156–10161
- Feillet F, Agostoni C (2010) Nutritional issues in treating phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 33(6):659–664
- Feksa LR, Cornelio AR, Rech VC, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, et al. (2002) Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in brain cortex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia. *Neurochem Res* 27(9):947–952
- Feksa LR, Cornelio A, Dutra-Filho CS, Wyse ATDS, Wajner M, Wannmacher CMD (2005) The effects of the interactions between amino acids on pyruvate kinase activity from the brain cortex of young rats. *Int J Dev Neurosci* 23(6):509–514
- Fuller S, Steele M, Münch G (2010) Activated astroglia during chronic inflammation in alzheimer's disease—do they neglect their neurosupportive roles? *Mutat Res* 690(1–2):40–49
- Gemelli T, de Andrade RB, Rojas DB, Bonorino NF, Mazzola PN, Tortorelli LS, et al. (2013) Effects of β -alanine administration on selected parameters of oxidative stress and phosphoryltransfer network in cerebral cortex and cerebellum of rats. *Mol Cell Biochem* 380(1–2):161–170
- Gilbert HF (1984) Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods Enzymol* 107:330–351
- Gottfried C, Valentim L, Salbego C, Karl J, Wofchuk ST, Rodnight R (1999) Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain Res* 833(2):142–149
- Halliwell B (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 35(5):1147–1150
- Hanley WB (2004) Adult phenylketonuria. *Am J Med* 117(8):590–595
- Hertz L, Peng L, Dienel G (2007) Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 27(2):219–249
- Hughes BP (1962) A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta* 7:597–603
- Joseph MH, Marsden CA (1986) Amino acids and small peptides. in *HPLC of Small Peptides*, Oxford, pp. 13–27
- Kalsner LR, Rohr FJ, Strauss KA, Korson MS, Levy HL (2001) Tyrosine supplementation in phenylketonuria: diurnal blood tyrosine levels and presumptive brain influx of tyrosine and other large neutral amino acids. *J Pediatr* 139(3):421–427
- Kolling J, Scherer EBS, Siebert C, Hansen F, Torres FV, Scaini G, et al. (2013) Homocysteine induces energy imbalance in rat skeletal muscle: is creatine a protector? *Cell Biochem Funct* 31(7):575–584
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5(2):227–231
- Leite MC, Galland F, de Souza DF, Guerra MC, Bobermin L, Biasibetti R, et al. (2009) Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res* 71(11):2439–2446

- Leong SF, Lai JC, Lim L, Clark JB (1981) Energy-metabolizing enzymes in brain regions of adult and aging rats. *J Neurochem* 37(6):1548–1556
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol. *J Biol Chem* 193:265–275
- Marklund SL, Adolfsson R, Gottfries CG, Winblad B (1985) Superoxide dismutase isoenzymes in normal brains and in brains from patients with dementia of alzheimer type. *J Neurol Sci* 67(3):319–325
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16(10):577–586
- Mazzocco MM, Yannicelli S, Nord AM, van Doorninck W, Davidson-Mundt AJ, Greene CL (1992) Cognition and tyrosine supplementation among school-aged children with phenylketonuria. *Am J Dis Child* 146(11):1261–1264
- Mitchell JJ, Trakadis YJ, Scriver CR (2011) Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genitourin Med* 13(8):697–707
- Obara M, Szeliga M, Albrecht J (2008) Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses. *Neurochem Int* 52(6):905–919
- Pietz J (1998) Neurological aspects of adult phenylketonuria. *Curr Opin Neurol* 11(6):679–688
- Pietz J, Landwehr R, Kutscha A, Schmidt H, de Sonnevile L, Trefz FK (1995) Effect of high-dose tyrosine supplementation on brain function in adults with phenylketonuria. *J Pediatr* 127(6):936–943
- Rojas DB, de Andrade RB, Gemelli T, Oliveira LS, Campos AG, Dutra-Filho CS, et al. (2012) Effect of histidine administration to female rats during pregnancy and lactation on enzymes activity of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Metab Brain Dis* 27(4):595–603
- Sitta A, Vanzin CS, Biancini GB, Manfredini V, De OAB, Wayhs CAY, et al. (2011) Evidence that L -carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol* 31(3):429–436
- Slemmer JE, Shacka JJ, Sweeney MI, Weber JT (2008) Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Curr Med Chem* 15(4):404–14.
- Smith ML, Hanley WB, Clarke JT, Klim P, Schoonheydt W, Austin V, et al. (1998) Randomised controlled trial of tyrosine supplementation on neuropsychological performance in phenylketonuria. *Arch Dis Child* 78(2):116–121
- Vilaseca MA, Lambruschini N, Gutiérrez A, Fusté E, Gassió R (2010) Quality of dietary control in phenylketonuric patients and its relationship with general intelligence. *Nutr Hosp* 25(1):60–66
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolayt K, Eppenberger HM (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the ‘phosphocreatine circuit’ for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281:21–40
- Webster D, Wildgoose J (2010) Tyrosine supplementation for phenylketonuria. *Cochrane Database Syst Rev* 8:CD001507
- Weeds AG, Noda L (1968) Amino acid sequences around the thiol groups of myokinase. *Biochem J* 107:311–312
- Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325–333

3. DISCUSSÃO

Os efeitos da Phe em astrócitos são pouco conhecidos, mas trabalhos utilizando outros modelos de EIM e da própria PKU mostraram efeitos tanto em estresse oxidativo quanto na rede de transferência de grupos fosforila. Já foi visto que a Phe é capaz de inibir a PK (Feksa et al., 2005) e a CK em córtex de ratos (Costabeber et al., 2003). Também mostrou-se que filhotes de ratas que receberam sobrecarga de Phe durante a gestação apresentaram diminuição da atividade da CK e AK, tanto no córtex quanto no hipocampo (Bortoluzzi et al., 2014). Já em parâmetros de estresse oxidativo, foi mostrado que a Phe é capaz de inibir a CAT, aumentar a atividade da SOD, além de aumentar a oxidação de DCFH quando comparados com o controle, indicando que ER foram formadas e alteraram as atividades de enzimas de defesa antioxidante (Moraes et al., 2013).

Culturas de astrócitos são bons modelos de pesquisa, utilizadas amplamente para se estudar diversos parâmetros do SNC, tanto fisiológicos quanto patológicos. No caso da PKU, este modelo tem a vantagem de não expressar a Pah, que está presente somente no fígado. Em modelos animais, as sobrecargas de Phe administradas podem não reproduzir de forma tão fidedigna as concentrações permanentemente altas, como em pacientes. Considerando que os animais estão com a Pah ativa, as altas concentrações de Phe provocadas pela sobrecarga administrada não perdurarão muito, pois a enzima, que está funcionando normalmente nesses animais, irá converter em Tyr. Assim estes modelos podem apresentar flutuações nos níveis séricos, alternando em estados hiper e normofenilalaninêmicos entre as administrações do aminoácido. Estas variações podem ser mais prejudiciais do que a concentração sérica constantemente elevada. Anastasoiaie e colaboradores (Anastasoiaie et al., 2008) mostraram que a variabilidade dos níveis de Phe está mais ligada aos problemas da hiperfenilalaninemia do que a média desses

níveis. No estudo, pacientes foram acompanhados e tiveram seus níveis de Phe e testes de QI comparados, mostrando uma relação inversa entre o desvio da média e o QI (Anastasoiaie et al. 2008). Outro modelo utilizado é a combinação da administração de Phe com o inibidor da enzima. Este é um modelo mais próximo à PKU, pois evita o metabolismo da Phe e mantém seus níveis elevados por mais tempo.

Anteriormente, acreditava-se que a baixa conversão de Phe em Tyr causaria déficit na formação de neurotransmissores, como a dopamina, o que geraria os problemas cognitivos e irreversíveis durante o desenvolvimento dos pacientes. A baixa concentração de Tyr no encéfalo seria também causada pela competição deste aminoácido com a Phe pelo transportador de grandes aminoácidos neutros, presentes na barreira hematoencefálica (BHE), que teria mais afinidade pela Phe. Trabalhos que tentaram melhorar a qualidade de vida de pacientes por meio da administração de Tyr não obtiveram sucesso (Kalsner et al., 2001; Mazzocco et al., 1992; Pietz et al., 1995; Smith et al., 1998; Webster and Wildgoose, 1996), talvez por não terem alcançado níveis séricos de Tyr suficientes que pudessem permitir um maior influxo pela BHE.

Este trabalho mostrou que Phe nas concentrações de 0,5 a 1,5 mM alteram os resultados de clivagem de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) e da liberação de lactato desidrogenase (LDH) para o meio extracelular. O MTT é clivado por uma redutase mitocondrial e alterações na atividade mitocondrial podem acelerar ou reduzir a velocidade desta clivagem (Natarajan et al., 1994). Este teste possibilita presumir o número de células comparadas com o controle, considerando que a atividade da redutase mitocondrial seja igual em todos os grupos. Neste caso, acreditamos que haja uma quantidade menor de células nos grupos tratados com Phe. A quantidade elevada de LDH no meio também é um marcador de morte celular. Como os tecidos possuem concentrações 50 vezes maiores de LDH que o meio extracelular, uma

pequena porção de necrose pode elevar de forma bastante significativa sua concentração no meio extracelular. Assim, podemos supor que a morte celular vista no teste do MTT como diminuição da clivagem (entre 7 e 11%) é a responsável pelo aumento de LDH (entre 31 e 41%). Ainda, o teste de Spearman mostra uma correlação bastante significativa ($\rho=-0,725$), mostrando que há relação inversamente proporcional entre as duas medidas. Estes dados são compatíveis com outro estudo, no qual foi observado que a Phe na dose de 5 mM e o seu metabólito PEA na dose de 0,5 mM inibiram a proliferação celular de astrócitos corticais de ratos medidos pela incorporação de timidina (Oberdoerster et al., 2000).

O aumento na oxidação de DCFH nos grupos que receberam Phe é uma indicativo de que formou-se uma quantidade maior de ERs nos astrócitos corticais. As atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx mostraram-se aumentadas significativamente.

A SOD é capaz de catalisar a dismutação do ânion superóxido, formando peróxido de hidrogênio, que é um produto com menor reatividade. A GPx remove o peróxido de hidrogênio, oxidando a GSH. Além de atuar com a GPx, a GSH pode atuar diretamente neutralizando as ERs. Além de atuar com a GPx, a GSH pode atuar diretamente neutralizando as ERs. As enzimas SOD e GPx estavam aumentadas significativamente apenas na dose de 1,5 mM. Já a enzima CAT mostrou-se com maior atividade nas doses de 1 e 1,5mM. A CAT transforma o peróxido de nitrogênio em água e oxigênio molecular.

Os resultados das medidas de parâmetros de estresse oxidativo estão sumarizados na Tabela 1. Considerando que a Phe aumenta a formação de EROs, aumenta a atividade das enzimas de defesas antioxidantes e diminui do conteúdo de

GSH , podemos sugerir que o ânion superóxido é a espécie reativa presente no tecido, sendo dismutada pela SOD a peróxido de hidrogênio e conseqüentemente em água pela CAT e GPx, e ainda por ação direta da GSH.

Parâmetros de Estresse Oxidativo	Phe 0,5 mM	Phe 1,0 mM	Phe 1,5 mM
DCFH	↑	↑	↑
Conteúdo de GSH	-	↓	↓
Atividade CAT	-	↑	↑
Atividade SOD	-	-	↑
Atividade GPx	-	-	↑

Tabela I. Resumo dos resultados dos parâmetros de estresse oxidativo nos grupos tratados com Phe de 0,5 a 1,5 mM comparados com o controle.

Podemos sugerir que o aumento da atividade das enzimas de defesas antioxidantes foi provocado pelo aumento de ER, em especial as EROs, para tentar conter sua formação e possíveis danos provocados por íons superóxidos e peróxido de hidrogênio formados na célula. Observando a tabela com a compilação das alterações significativas nos parâmetros de estresse oxidativo, vemos que o número de parâmetros alterados foi proporcional à dose de Phe.

As enzimas CK, AK e PK são importantes na manutenção energética do tecido cerebral. Esta rede é responsável por equilibrar o consumo e produção de ATP. São proteínas sensíveis à ação de ERO, pois possuem grupos tiólicos em sua estrutura, os quais são suscetíveis à oxidação, podendo sofrer alterações que diminuem sua atividade em até 500% e, conseqüentemente, diminuem também a disponibilidade energética (Kenyon, 1996). Não encontramos diferenças na atividade destas enzimas nas culturas

de astrócitos do córtex cerebral, ao contrário de estudos que avaliaram outros modelos de EIM, incluindo a PKU. Acreditamos que a alteração nestas enzimas no nosso modelo pode ter sido evitada devido à eficiência do sistema de defesas antioxidantes dos astrócitos, o qual trabalhou para eliminar as ERO, evitando assim danos em sítios importantes destas enzimas. Ao final do período de incubação, os níveis de Phe encontraram-se reduzidos, possivelmente utilizados para síntese proteica ou mesmo transformado-se em outros metabólitos, que também podem ser tóxicos, já que consideramos que este aminoácido não é convertido em Tyr nos astrócitos. Outra possível explicação para não termos encontrado alterações seriam que as concentrações de Phe foram diminuindo ao longo do tempo, logo as atividades destas enzimas podem ter sido alteradas em período mais curto e voltado ao normal às 72 horas de cultivo, momento onde as concentrações de Phe estavam bem abaixo da inicial. Assim, quando as células foram coletadas e as atividades de CK, PK e AK medidas, suas atividades poderiam não estar alteradas significativamente.

Observamos que quanto maior a concentração inicial de Phe, maior foi o seu consumo após 3 dias, tendo significância estatística nas doses mais elevadas de Phe (1,0 e 1,5 mM). Uma possível explicação para o consumo proporcional à dose seria que rotas alternativas tornam-se proporcionalmente mais importantes à medida que a Phe fica mais concentrada, podendo causar o aumento de metabólitos em uma progressão geométrica.

As concentrações finais de Tyr foram significativamente maiores em 17 e 22% nos grupos que receberam 0,5 e 1,0 mM, respectivamente, quando comparadas com o controle ao final de 3 dias. Este resultado apenas mostra que houve um consumo menor de Tyr nestes grupos, comparando com os controles, mas não indica que houve conversão da Phe em Tyr, pois em todos os grupos a concentração final foi inferior à

inicial. Possivelmente, também houve diminuição da internalização celular da Tyr nos astrócitos pela competição com a Phe.

Foram encontradas correlações significativas entre todos os parâmetros de estresse oxidativo, indicando que o estresse oxidativo foi induzido pela Phe ou também por algum de seus metabólitos tóxicos nos astrócitos. Os parâmetros de dano celular também possuem correlação com os de estresse oxidativo, sugerindo que as ERO podem fazer parte do mecanismo que induz a morte celular em astrócitos.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitem supor que as doses de Phe utilizadas, baseadas nas concentrações séricas de pacientes, que estão dentro de classificações como PKU clássica (1,5 mM), PKU moderada (1,0 mM) e próximo da PKU leve (0,5 mM), estão relacionadas com morte celular e estresse oxidativo em cultura de astrócitos de ratos tratada por 72 horas. Esta relação pode representar um efeito direto da Phe, de um ou mais de seus metabólitos tóxicos ou de todas essas possibilidades juntas.

Todas as concentrações de Phe causaram morte astrocitária quando comparadas com o controle, sem diferença significativa entre os grupos de Phe.

Quanto ao estresse oxidativo, todas os grupos Phe alteraram os parâmetros de estresse oxidativo estudados. Embora tenha havido morte celular, provavelmente causada por dano de ER, as defesas antioxidantes podem ter evitado maiores danos pelo aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx e pelo consumo de GSH.

Contrariando dados de trabalhos anteriores, as enzimas da rede de transferência de grupos fosforila, CKc, CKm, PK e AK não mostraram alterações significativas em qualquer dose.

Os níveis de Phe nas culturas sofreram grande diminuição ao longo do tempo, principalmente com as doses iniciais de 1,0 e 1,5 mM. Este fenômeno pode ter ocorrido pelo transaminação da Phe em outros metabólitos não tirosínicos que podem ser tóxicos ou não, podendo também terem participado das alterações encontradas em todos os parâmetros medidos.

A Tyr mostrou-se um pouco mais elevada ao final das 72 horas no meio de cultura dos grupos 0,5 e 1,0 mM, mas isto não seria um indício de conversão da Phe e sim de que este aminoácido foi menos incorporado pelas células.

Assim, podemos inferir que a redução no número de astrócitos, relacionada com o estresse oxidativo, pode ser um mecanismo importante na morte neuronal e, conseqüentemente, no desenvolvimento dos sintomas neurológicos encontrados nos pacientes PKU.

PERSPECTIVAS

Mostrar-se-ia interessante a pesquisa de parâmetros de estresse oxidativo, viabilidade e concentração de aminoácidos como a Phe e Tyr em outros momentos da cultura celular como 2, 6, 12, 24 horas.

Seria importante também avaliar a cinética desses aminoácidos ao longo do tratamento em culturas, bem como quantificar a formação de outros metabólitos da Phe e avaliar sua relação com parâmetros de estresse oxidativo e enzimas do metabolismo energético.

Parâmetros de dano oxidativo tanto em proteínas quanto em lipídios poderiam ser determinados para tentar identificar os danos causados pelas ERs e seu desfecho com a diminuição da viabilidade celular.

Além disso, também seria interessante avaliaras enzimas da rede de transferência de grupos fosforila em outros momentos como 2, 6, 12 e 24 horas, a fim de avaliar se em períodos mais curtos há variação na atividade enzimática.

BIBLIOGRAFIA

- Aghasi, P., Setoodeh, A., Sayarifard, A., Rashidiyan, M., Sayarifard, F., Rabbani, A., Mahmoudi-Gharaei, J., 2015. Intellectual and Developmental Status in Children With Hyperphenylalaninemia and PKU Who Were Screened in a National Program. *Iranian journal of pediatrics* 25, e3033.
- Ames, A., 2000. CNS energy metabolism as related to function. *Brain research. Brain research reviews* 34, 42–68.
- Anastasoae, V., Kurzius, L., Forbes, P., Waisbren, S., 2008. Stability of blood phenylalanine levels and IQ in children with phenylketonuria. *Molecular genetics and metabolism* 95, 17–20.
- Anderson, D., 1996. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation research* 350, 103–8.
- Aquaron, R., 2013. Alkaptonuria: a very rare metabolic disorder. *Indian journal of biochemistry & biophysics* 50, 339–44.
- Bergendi, L., Benes, L., Duracková, Z., Ferencik, M., 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life sciences* 65, 1865–74.
- Bickel, H., Bachmann, C., Beckers, R., Brandt, N.J., Clayton, B.E., Corrado, G., Feingold, H.J., Giardini, O., Hammersen, G., Schönberg, D., 1981. Neonatal mass screening for metabolic disorders. *European Journal of Pediatrics* 137, 133–139.
- Bickel, H., Gerrard, J., Hickmans, E.M., 1953. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet (London, England)* 265, 812–3.

- Bortoluzzi, V.T., de Franceschi, I.D., Rieger, E., Wannmacher, C.M.D., 2014. Co-administration of Creatine Plus Pyruvate Prevents the Effects of Phenylalanine Administration to Female Rats During Pregnancy and Lactation on Enzymes Activity of Energy Metabolism in Cerebral Cortex and Hippocampus of the Offspring. *Neurochemical research*.
- Burgard, P., Rey, F., Rupp, A., Abadie, V., Rey, J., 1997. Neuropsychologic functions of early treated patients with phenylketonuria, on and off diet: results of a cross-national and cross-sectional study. *Pediatric research* 41, 368–74.
- Burgard, P., Schmidt, E., Rupp, A., Schneider, W., Bremer, H.J., 1996. Intellectual development of the patients of the German Collaborative Study of children treated for phenylketonuria. *European journal of pediatrics* 155 Suppl , S33–8.
- Cabezas, R., Avila, M., Gonzalez, J., El-Bachá, R.S., Báez, E., García-Segura, L.M., Jurado Coronel, J.C., Capani, F., Cardona-Gomez, G.P., Barreto, G.E., 2014. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 211.
- Carter, S.F., Scholl, M., Almkvist, O., Wall, a., Engler, H., Langstrom, B., Nordberg, a., 2012. Evidence for Astrocytosis in Prodromal Alzheimer Disease Provided by 11C-Deuterium-L-Deprenyl: A Multitracer PET Paradigm Combining 11C-Pittsburgh Compound B and 18F-FDG. *Journal of Nuclear Medicine* 53, 37–46.
- Centerwall, W.R., 1959. Phenylketonuria. *J Am Med Assoc* 165, 392–397.
- Christ, S.E., Moffitt, A.J., Peck, D., White, D. a., 2013. The effects of tetrahydrobiopterin (BH4) treatment on brain function in individuals with phenylketonuria. *NeuroImage: Clinical* 3, 539–47.

- Clayton BE, Jenkins P, R.J., 1980. Pediatric Chemical Pathology - Clinical Tests and Reference Range, in: Pädiatrie in Praxis Und Klinik. Fischer&Thieme, Stuttgart, p. 1163ff.
- Clemens, P., MH, S., A, K., GF, H., 1990. Phenylalanine metabolites in phenylketonuria. *J Pediatr* 116, 665–666.
- Costabeber, E., Kessler, A., Severo Dutra-Filho, C., de Souza Wyse, A.T., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., 2003. Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 21, 111–6.
- Costello, P.M., Beasley, M.G., Tillotson, S.L., Smith, I., 1994. Intelligence in mild atypical phenylketonuria. *European Journal of Pediatrics* 153, 260–263.
- Dabrowska, A., Pietkiewicz, J., Dabrowska, K., Czapińska, E., Danielewicz, R., 1998. Interaction of M1 and M2 isozymes pyruvate kinase from human tissues with phospholipids. *Biochimica et biophysica acta* 1383, 123–9.
- de Andrade, R.B., Gemelli, T., Rojas, D.B., Funchal, C., Dutra-Filho, C.S., Wannmacher, C.M.D., 2012. Tyrosine impairs enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of rats. *Molecular and cellular biochemistry* 364, 253–61.
- de Franceschi, I.D., Rieger, E., Vargas, A.P., Rojas, D.B., Campos, A.G., Rech, V.C., Feksa, L.R., Wannmacher, C.M.D., 2013. Effect of leucine administration to female rats during pregnancy and lactation on oxidative stress and enzymes activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochemical research* 38, 632–43.

- Dyer, C.A., Kendler, A., Philibotte, T., Gardiner, P., Cruz, J., Levy, H.L., 1996. Evidence for central nervous system glial cell plasticity in phenylketonuria. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 55, 795–814.
- Dzeja, P., Terzic, A., 2009. Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *International journal of molecular sciences* 10, 1729–72.
- Dzeja, P.P., 2003. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *Journal of Experimental Biology* 206, 2039–2047.
- Falkowska, A., Gutowska, I., Goschorska, M., Nowacki, P., Chlubek, D., Baranowska-Bosiacka, I., 2015. Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 25959–25981.
- Feksa, L.R., Cornelio, A., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.D.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., 2005. The effects of the interactions between amino acids on pyruvate kinase activity from the brain cortex of young rats. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 23, 509–14.
- Feksa, L.R., Cornelio, A.R., Rech, V.C., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., 2002. Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in brain cortex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia. *Neurochemical research* 27, 947–52.
- Fernandez-Fernandez, S., Almeida, A., Bolaños, J.P., 2012. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochemical Journal* 443,

3–11.

Finsterwald, C., Magistretti, P.J., Lengacher, S., 2015. Astrocytes: New Targets for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Current pharmaceutical design* 21, 3570–81.

Følling, A., 1934a. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. *Ztschr Physio Chem* 227, 169–176.

Følling, A., 1934b. Utskillelse av fenylpyrodruesyre i Urinen som stoffskifteanomalie I forbindelse med imbecillitet. *Nord Med Tidsskr* 8, 1054–1059.

Gibbs, N.K., Woolf, L.I., 1959. Tests for phenylketonuria: results of a one-year programme for its detection in infancy and among mental defectives. *BMJ* 2, 532–535.

Guthrie, R., Susi, A., 1963. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32, 338–43.

Hanley, W.B., 2004. Adult phenylketonuria. *The American journal of medicine* 117, 590–5.

Hegge, K.A., Horning, K.K., Peitz, G.J., Hegge, K., 2009. Sapropterin: a new therapeutic agent for phenylketonuria. *The Annals of pharmacotherapy* 43, 1466–73.

Hoffman, G.F., 1994. Selective screening for inborn errors of metabolism: past, present and future. *Eur J Pediatr* 153, 2–8.

Holtzman, N.A., 1978. Rare diseases, common problems: recognition and management.

Pediatrics 62, 1056–60.

Hood, A., Antenor-Dorsey, J.A. V., Rutlin, J., Hershey, T., Shimony, J.S., McKinstry, R.C., Grange, D.K., Christ, S.E., Steiner, R., White, D. a., 2015. Prolonged exposure to high and variable phenylalanine levels over the lifetime predicts brain white matter integrity in children with phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism* 114, 19–24.

Iadecola, C., Nedergaard, M., 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature neuroscience* 10, 1369–76.

Jervis, G.A., 1953. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proceedings of the Society of Experimental and Biological Medicine* 82, 514–515.

Jervis, G.A., 1947. Studies on phenylpyruvic oligophrenia: The position of the metabolic error. *Journal of Biological Chemistry* 169, 651.

Jimenez-Sanchez, G., Barton Childs, D.V., 2001. The effect of mendelian disease on human health, 8^a ed, *The metabolic & Molecular Bases od Inherited Diseases*. New York.

Kalsner, L.R., Rohr, F.J., Strauss, K.A., Korson, M.S., Levy, H.L., 2001. Tyrosine supplementation in phenylketonuria: Diurnal blood tyrosine levels and presumptive brain influx of tyrosine and other large neutral amino acids. *J. Pediatr.* 139, 421–427.

Kaminsky, V.O., Zhivotovsky, B., 2014. Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxidants & redox signaling* 21, 86–102.

- Kenyon, G.L., 1996. Energy metabolism. Creatine kinase shapes up. *Nature* 381, 281–2.
- Kienzle Hagen, M.E., Pederzolli, C.D., Sgaravatti, A.M., Bridi, R., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S., Dutra-Filho, C.S., 2002. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1586, 344–352.
- Langenbeck, U., Behbehani, A., Mench-Hoinowski, A., 1992. A synopsis of the unconjugated acidic transamination metabolites of phenylalanine in phenylketonuria. *Journal of inherited metabolic disease* 15, 136–44.
- Liu, Z., Chopp, M., 2015. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Progress in Neurobiology*.
- Lyon, M.G., Adams, R.D., Kolodny, E.H., 1996. *Neurology of hereditary metabolic diseases of children*, 2^a Edição. ed. McGraw-Hill, New York.
- Mak, C.M., Lee, H.-C.H., Chan, A.Y.-W., Lam, C.-W., 2013. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 50, 142–62.
- Martínez-Cruz, F., Osuna, C., Guerrero, J.M., 2006. Mitochondrial damage induced by fetal hyperphenylalaninemia in the rat brain and liver: its prevention by melatonin, Vitamin E, and Vitamin C. *Neuroscience letters* 392, 1–4.
- Mazzocco, M.M., Yannicelli, S., Nord, A.M., van Doorninck, W., Davidson-Mundt, A.J., Greene, C.L., 1992. Cognition and tyrosine supplementation among school-aged children with phenylketonuria. *American journal of diseases of children* (1960) 146, 1261–4.

- Mazzola, P.N., Terra, M., Rosa, A.P., Mescka, C.P., Moraes, T.B., Piccoli, B., Jacques, C.E., Dalazen, G., Cortes, M.X., Coelho, J., Dutra-Filho, C.S., 2011. Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. *Metabolic brain disease* 26, 291–7.
- Miner, J.J., Diamond, M.S., 2015. Mechanisms of restriction of viral neuroinvasion at the blood-brain barrier. *Current opinion in immunology* 38, 18–23.
- Mm, M., Comsa, M., Minca, A., Dragos, D., Constantin, P., 2015. Brain-heart axis - Review Article. 8, 266–271.
- Moraes, T.B., Jacques, C.E.D., Rosa, A.P., Dalazen, G.R., Terra, M., Coelho, J.G., Dutra-Filho, C.S., 2013. Role of catalase and superoxide dismutase activities on oxidative stress in the brain of a phenylketonuria animal model and the effect of lipoic acid. *Cellular and molecular neurobiology* 33, 253–60.
- Moraes, T.B., Zanin, F., da Rosa, A., de Oliveira, A., Coelho, J., Petrillo, F., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., 2010. Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *Journal of the neurological sciences* 292, 89–95.
- Natarajan, N., Shambaugh, G.E., Elseth, K.M., Haines, G.K., Radosevich, J.A., 1994. Adaptation of the diphenylamine (DPA) assay to a 96-well plate tissue culture format and comparison with the MTT assay. *BioTechniques* 17, 166–71.
- Nunes, A.K.C., Wachholz, R.G., Rover, M., Souza, L.C., 2013. Prevalência de patologias detectadas pela triagem neonatal em Santa Catarina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 57, 360–367.

- Oberdoerster, J., Guizzetti, M., Costa, L.G., 2000. Effect of phenylalanine and its metabolites on the proliferation and viability of neuronal and astroglial cells: possible relevance in maternal phenylketonuria. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 295, 295–301.
- Occhipinti, R., Somersalo, E., Calvetti, D., 2009. Astrocytes as the glucose shunt for glutamatergic neurons at high activity: an in silico study. *Journal of neurophysiology* 101, 2528–38.
- Parpura, V., Heneka, M.T., Montana, V., Oliet, S.H.R., Haydon, P.G., Jr, R.F.S., Spray, D.C., 2013. *Glial* 121, 4–27.
- Penrose, L., 1935. Inheritance of phenylpyruvic amentia (phenylketonuria). *Lancet* 1, 192–194.
- Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences* 32, 421–31.
- Pietz, J., Landwehr, R., Kutscha, A., Schmidt, H., de Sonneville, L., Trefz, F.K., 1995. Effect of high-dose tyrosine supplementation on brain function in adults with phenylketonuria. *The Journal of pediatrics* 127, 936–43.
- Sanayama, Y., Nagasaka, H., Takayanagi, M., Ohura, T., Sakamoto, O., 2011. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism* 103, 220–225.
- Schuck, F., Malgarin, F., Cararo, J.H., Cardoso, F., Streck, E.L., Ferreira, G.C., 2015. Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations. *Aging and Disease* 6, 1–10.

- Schulpis, K.H., Tsakiris, S., Karikas, G. a, Moukas, M., Behrakis, P., 2003. Effect of diet on plasma total antioxidant status in phenylketonuric patients. *European journal of clinical nutrition* 57, 383–7.
- Sitta, A., Barschak, A.G., Deon, M., Barden, A.T., Biancini, G.B., Vargas, P.R., de Souza, C.F., Netto, C., Wajner, M., Vargas, C.R., 2009. Effect of short- and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients. *International Journal of Developmental Neuroscience* 27, 243–247.
- Smith, C., Marks, A.D., Lieberman, M., 2007. *Marks' Basic medical biochemistry*, 2nd ed. ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Smith, I., Beasley, M.G., Ades, a E., 1991. Effect on intelligence of relaxing the low phenylalanine diet in phenylketonuria. *Archives of disease in childhood* 66, 311–316.
- Smith, I., Beasley, M.G., Ades, A.E., 1990. Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Archives of disease in childhood* 65, 472–8.
- Smith, M.L., Hanley, W.B., Clarke, J.T., Klim, P., Schoonheydt, W., Austin, V., Lehotay, D.C., 1998. Randomised controlled trial of tyrosine supplementation on neuropsychological performance in phenylketonuria. *Archives of disease in childhood* 78, 116–21.
- Sofroniew, M. V, Vinters, H. V, 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119, 7–35.
- Sparks, S.E., 2013. Update on newborn screening. *North Carolina medical journal* 74, 514–7.

- Stadhouders, a M., Jap, P.H., Winkler, H.P., Eppenberger, H.M., Wallimann, T., 1994. Mitochondrial creatine kinase: a major constituent of pathological inclusions seen in mitochondrial myopathies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5089–93.
- Suh, S.W., Bergher, J.P., Anderson, C.M., Treadway, J.L., Fosgerau, K., Swanson, R.A., 2007. Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R*,S*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 321, 45–50.
- Tonin, A.M., Ferreira, G.C., Schuck, P.F., Viegas, C.M., Zanatta, A., Leipnitz, G., Seminotti, B., Duvall Wannmacher, C.M., Wajner, M., 2009. Inhibition of creatine kinase activity by lysine in rat cerebral cortex. *Metabolic brain disease* 24, 349–60.
- Udenfriend, S., Cooper, J.R., 1952. The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *The Journal of biological chemistry* 194, 503–11.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 44–84.
- van Spronsen, F.J., 2011. Mild hyperphenylalaninemia: to treat or not to treat. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 34, 651–656.
- Verhagen, J.N., van der Heijden, M.C., de Jong-van Dijken, J., Rijksen, G., der Kinderen, P.J., van Unnik, J.A., Staal, G.E., 1985. Pyruvate kinase in normal human thyroid tissue and thyroid neoplasms. *Cancer* 55, 142–8.

- Verkhratsky, A., Steardo, L., Parpura, V., Montana, V., 2015. Translational potential of astrocytes in brain disorders. *Progress in Neurobiology*.
- Villasana, D., Butler, I.J., Williams, J.C., Roongta, S.M., 1989. Neurological deterioration in adult phenylketonuria. *Journal of inherited metabolic disease* 12, 451–7.
- Waber, L., 1990. Inborn error of metabolism. *Ped Ann* 19, 105–118.
- Waisbren, S.E., Zaff, J., 1994. Personality disorder in young women with treated phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 17, 584–592.
- Webster, D., Wildgoose, J., 1996. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, The Cochrane database of systematic reviews. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Wolf, L., R, G., Moncrieff, A., 1955. Treatment of phenylketonuria with a diet low in phenylalanine. *British medical journal* 1, 57–64.
- Wolf, L.I., Griffiths, R., Moncrieff, A., 1951. Phenylketonuria with a study of the effect upon it of glutamic acid. *Arch Dis Child* 26, 487–494.
- Zerjav Tansek, M., Groselj, U., Angelkova, N., Anton, D., Baric, I., Djordjevic, M., Grimci, L., Ivanova, M., Kadam, A., Kotori, V., Maksic, H., Marginean, O., Margineanu, O., Miljanovic, O., Moldovanu, F., Muresan, M., Nanu, M., Samardzic, M., Sarnavka, V., Savov, A., Stojiljkovic, M., Suzic, B., Tincheva, R., Tahirovic, H., Toromanovic, A., Usurelu, N., Battelino, T., 2015. Phenylketonuria screening and management in southeastern Europe - survey results from 11 countries. *Orphanet journal of rare diseases* 10, 68.

Zhang, S.F., Hennessey, T., Yang, L., Starkova, N.N., Beal, M.F., Starkov, A.A., 2011.

Impaired brain creatine kinase activity in Huntington's disease. *Neurodegenerative diseases* 8, 194–201.

Zhu, X.-H., Qiao, H., Du, F., Xiong, Q., Liu, X., Zhang, X., Ugurbil, K., Chen, W.,

2012. Quantitative imaging of energy expenditure in human brain. *NeuroImage* 60, 2107–2117.