

# PREVENÇÃO DE DISTÚRBIOS DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA ATRAVÉS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA COM PIRUVATO EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS *WISTAR* FENILCETONÚRICOS

Bruna Nitzke Minuzzi; Clovis Milton Duval Wannmacher

Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo de Aminoácidos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## Introdução

### Fenilcetonúria (PKU):

- ⇒ Erro inato do metabolismo (EIM) de aminoácidos mais frequentemente diagnosticado;
- ⇒ A forma clássica da doença é resultado de uma **deficiência na enzima fenilalanina hidroxilase hepática (PAH)**, acumulando fenilalanina (Phe) e compostos derivados do seu catabolismo alternativo -> excreção em grande quantidade pela urina<sup>1</sup>;
- ⇒ Pacientes normais ao nascer, porém sem o tratamento adequado podem apresentar graves sintomas nos primeiros meses de vida, como retardo mental<sup>2</sup>;
- ⇒ O tratamento é basicamente **dietético**, com restrição de Phe, porém a adesão é bastante complicada devido à falta de palatabilidade<sup>3</sup>.



### PKU & Homeostase energética cerebral:

- ⇒ Pacientes fenilcetonúricos apresentam **anormalidades no metabolismo energético cerebral**<sup>4</sup> e no **metabolismo glicolítico**<sup>5</sup>; Phe e seus metabólitos **podem inibir a captação de glicose** e inibir **enzimas da rede de transferência de fosforil**<sup>6-10</sup>.

### Creatina (Cre) & Piruvato (Pyr):

- ⇒ **Cre** está envolvida na **manutenção da homeostase energética** e a enzima creatina-cinase (CK) atua no fornecimento de energia<sup>11</sup>;
- ⇒ **Pyr** age como um mecanismo de **defesa contra citotoxicidade** e a enzima piruvato-cinase (PK) é uma enzima chave no metabolismo celular<sup>12</sup>.



- ⇒ A coadministração de **Cre+Pyr** vem sendo estudada como **estratégia protetora** em eventos que levam à hipóxia cerebral, como AVC, em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, e nosso grupo estuda a coadministração como tratamento suplementar em EIM.

## Objetivo

Considerando o restabelecimento da homeostase energética como passível de oferecer melhores condições para um neurodesenvolvimento mais próximo do normal, o objetivo deste trabalho é **investigar se a suplementação de Cre+Pyr previne desequilíbrios energéticos em córtex cerebral de ratos submetidos à PKU, a partir da determinação da atividade das enzimas da rede de transferência de fosforila.**

## Metodologia

- ⇒ **Animais:** 24 ratos *Wistar* divididos em 4 grupos, submetidos a um modelo de PKU. As doses foram administradas de 12/12h (exceto  $\alpha$ -Me-Phe, induzida somente 1x ao dia), do P7 ao P14.

GRUPO	VIA	DOSE
(1) Controle	2 i.p. + 1 s.c.: salina	
(2) PKU	i.p.: $\alpha$ -metil-DL-Phe (inibidor da PAH) + salina s.c.: Phe	Phe: 5,2 $\mu\text{mol/g}$ de peso <sup>13</sup> $\alpha$ -metil-DL-Phe: 1,6 $\mu\text{mol/g}$ de peso <sup>14</sup>
(3) Tratamento	i.p.: Cre+Pyr + salina s.c.: salina	Cre: 0,4 mg/g de peso <sup>15</sup> Pyr: 0,2 mg/g de peso <sup>16</sup>
(4) PKU + Tratamento	i.p.: Cre+Pyr + $\alpha$ -metil-DL-Phe s.c.: Phe	Mesmas doses a cima

Indução do modelo químico de PKU na 1ª dose do dia. Na 2ª dose somente era injetado 1 i.p. e 1 s.c., excluindo  $\alpha$ -Me-Phe.

- ⇒ **P15:** Decapitação dos animais  $\rightarrow$  Córtex cerebral dissecado e homogeneizado (Tampão SET - 10 v/v)
- ⇒ **Parâmetros analisados:** Atividade das enzimas da rede de transferência de fosforil.

- ✓ Hexocinase (HK);
- ✓ Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH);
- ✓ Adenilato-cinase (AK);
- ✓ Piruvato-cinase (PK);
- ✓ Creatina-cinase citosólica (CKcit) e mitocondrial (CKmit).

- ⇒ **Análise estatística:** Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e analisados por ANOVA de 1 via, para comparação de médias, seguida por Teste de Tukey; e por ANOVA de 2 vias para verificar a interação entre os tratamentos (fatores: PKU e Cre+Pyr).

CEUA/UFRGS: #29388

## Resultados

Figura 1

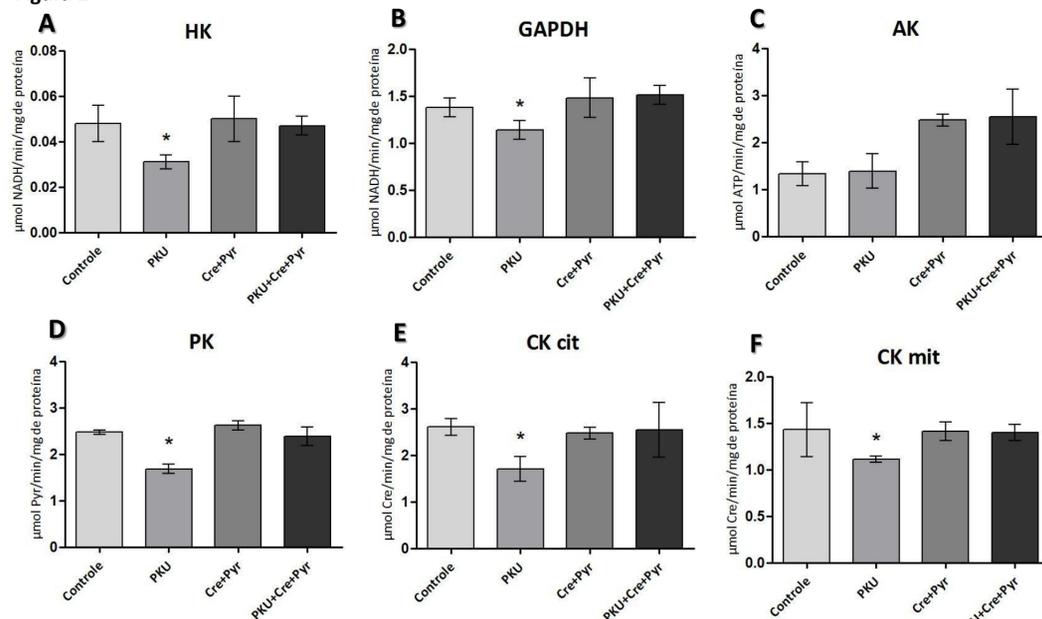


Figura 1: Efeitos da administração do modelo de PKU e/ou Cre+Pyr no córtex cerebral de ratos Wistar aos 14 dias de vida (n=6 animais por grupo) sobre as atividades das enzimas da rede de transferência de fosforil (A) Hexocinase; (B) Gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase; (C) Adenilato-cinase; (D) Piruvato-cinase; (E) Creatina-cinase citosólica e (F) mitocondrial. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão; \* p < 0,05 comparado aos outros grupos (ANOVA de 1 via seguida pelo Teste de Tukey).

	ANOVA 2 vias (Interação PKU by Cre+Pyr)
HK	[F(1,20) = 5,72; p = 0,027]
GAPDH	[F(1,20) = 5,89; p = 0,025]
AK	[F(1,20) = 0,95; p = 0,34]
PK	[F(1,20) = 4,55; p = 0,045]
CKcit	[F(1,20) = 12,38; p = 0,002]
CKmit	[F(1,20) = 5,81; p = 0,026]

## Conclusão

A coadministração de Cre+Pyr foi eficaz em prevenir a maioria das alterações causadas pela PKU, sugerindo que a suplementação com substratos capazes de oferecer aporte energético pode ser uma estratégia útil na prevenção do dano neurológico observado na PKU. Mais estudos demonstrando o papel da homeostase energética nesta doença são necessários a fim de compreendermos melhor sua fisiopatologia e, como resultado, vir a oferecer terapias auxiliares aos pacientes.

### REFERÊNCIAS:

- Scriver, C.P., et al. (2003). The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8th edition (New York: McGraw-Hill Professional).
- Wattani, C., et al. (2013). Long term outcomes of blood phenylalanine concentrations in children with classical phenylketonuria. Molecular Genetics and Metabolism 106, 255-258.
- Limmer, A.M., et al. (2013). Mean levels in microdialysis supplementations in phenylketonuria. Molecular Genetics and Metabolism 110 Suppl, S15.
- Reis, A., Rupp, A., Stanger, F., Kung'u, D., Moustafa, S., Borch, C., et al. Central energy metabolism in phenylketonuria: findings by quantitative in vivo 31P MR spectroscopy. Pediatric research. 2010;33(5):543-52.
- Kocoglu, C., et al. A Pilot Study of Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Findings in Patients with Phenylketonuria before and during Sapropterin Supplementation. Journal of clinical neurology. 2013;9:155-6.
- Glaser, R., Weber, G. The effects of phenylalanine and phenylpyruvate on glycolysis in rat cerebral cortex. Brain research. 1971;33:439-50.
- Glaser, R., Weber, G. The effects of L-phenylalanine and phenylpyruvate on glycolysis in rat cerebral cortex. Brain research. 1971;33:439-50.
- Wallman, T. (1994). Bioenergetics: Dissociating the role of creatine kinase. Current Biology. 4: 42-46.
- DeGroot, S., Cizewski, J., and Freeman, J. (1997). Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. The Journal of Neuroscience. The Official Journal of the Society for Neuroscience 17, 9000-9007.
- Fekula, R., et al. Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in rat brain subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia. Neurochemical research. 2002;27:947-52.
- Kozul, H., et al. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. Biochimica et Biophysica Acta. 2002;1586:344-52.
- Stoohler, R., et al. Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. Pediatric research. 2004;36:402-13.
- Ryu, J.K., Choi, H.B., McLarnon, J.G. Combined minocycline plus pyruvate treatment enhances effects of each agent to inhibit inflammation, oxidative damage, and neuronal loss in an excitotoxic animal model of Huntington's disease. Neuroscience. 2006;141:1835-46.