

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Bruna Nitzke Minuzzi

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE CREATINA E PIRUVATO COMO
ESTRATÉGIA ANTIOXIDANTE EM ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS
WISTAR SUBMETIDOS A UM MODELO DE FENILCETONÚRIA**

Porto Alegre

2 de janeiro de 2018

Bruna Nitzke Minuzzi

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE CREATINA E PIRUVATO COMO
ESTRATÉGIA ANTIOXIDANTE EM ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS
WISTAR SUBMETIDOS A UM MODELO DE FENILCETONÚRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval
Wannmacher

Coorientadora: MSc. Vanessa Trindade
Bortoluzzi

AGRADECIMENTOS

Agradeço, não só para a conclusão deste trabalho, mas sim por estarem presentes desde o primeiro dia de aula da pré-escola, principalmente meus avós, que sempre me deram o maior apoio que eu poderia ganhar até então; e aos meus pais e toda minha família que sempre torceram por mim e comemoraram todas minhas pequenas e grandes vitórias acadêmicas e de vida.

Aos melhores amigos que eu ganhei desde 2014 quando entrei na faculdade e que, ao longo destes 4 anos, compartilharam comigo os melhores e mais angustiantes momentos, desde festas e comemorações, a finais de semestres e estresses não só acadêmicos, mas pessoais também: Clara, Luana, Mark, Milene, Pedro, Stéphanie e Yahi: Amo vocês e torço para que esses laços se fortaleçam mesmo pós-UFRGS!

Aos meus colegas do laboratório 34, em especial aos meus orientadores deste trabalho, Prof. Clóvis e Vanessa, que me deram todo suporte necessário, confiaram na minha autonomia, me ensinaram desde a teoria até a prática e que foram meus guias nesta jornada do TCC e nestes 9 meses que nos conhecemos. Também agradeço à Itiane, que além de aceitar ser minha banca, me explicou nos mínimos detalhes toda rotina do laboratório desde o primeiro dia e me guiou em todos experimentos e projetos que trabalhamos juntas.

Ao CNPq, pela bolsa de iniciação científica concedida e ao Instituto de Biociências pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de figuras e tabelas _____	5
Lista de abreviaturas e siglas _____	6
Resumo _____	7
1. Introdução	
1.1. Erros Inatos do Metabolismo _____	8
1.2. Espécies Reativas, Antioxidantes e Estresse Oxidativo _____	11
1.3. Creatina e Piruvato _____	14
2. Objetivos	
2.1. Objetivos gerais _____	17
2.2. Objetivos específicos _____	17
3. Material e Métodos	
3.1. Animais _____	18
3.2. Experimentos _____	18
4. Resultados _____	23
5. Discussão _____	26
6. Referências bibliográficas _____	28

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Metabolismo da fenilalanina em seres humanos.

Figura 2: Produção de espécies reativas durante a redução de O_2 a H_2O .

Figura 3: Atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase.

Figura 4: Efeitos da administração de creatina e piruvato em modelo fenilcetonúrico na formação de espécies reativas ao oxigênio pelo ensaio de oxidação de DCFH.

Figura 5: Efeitos da administração de creatina e piruvato em modelo fenilcetonúrico no conteúdo total de sulfidrilas.

Figura 6: Efeitos da administração de creatina e piruvato em modelo fenilcetonúrico na atividade da enzima GPx.

Figura 7: Efeitos da administração de creatina e piruvato em modelo fenilcetonúrico na atividade da enzima CAT.

Figura 8: Efeitos da administração de creatina e piruvato em modelo fenilcetonúrico na atividade da enzima SOD.

Tabela 1: Estudos demonstrando o estresse oxidativo na fenilcetonúria.

Tabela 2: Indução do modelo de hiperfenilalaninemia pela manhã.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH₂: Di-hidrobiopterina

BH₄: Tetraidrobiopterina

CAT: Catalase

CK: Creatina-cinase

Cre: Creatina

DCF: diclorofluoresceína

DCFH-DA: 2'7' dihidrodiclorofluoresceína

EIM: Erros inatos do metabolismo

EO: Estresse oxidativo

ERN: Espécies reativas ao nitrogênio

ERO: Espécies reativas ao oxigênio

GPx: Glutathione peroxidase

GSH: Glutathione reuzida

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HPA: Hiperfenilalaninemia

PAH: Fenilalanina hidroxilase hepática

PCr: Fosfocreatina

Phe: Fenilalanina

PK: Piruvato-cinase

PKU: Fenilcetonúria

Pyr: Piruvato

SOD: Superóxido dismutase

Tyr: Tirosina

RESUMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) compreendem um grupo de desordens hereditárias causadas normalmente por uma deficiência total ou parcial proteica, geralmente enzimática, que afeta rotas metabólicas levando ao acúmulo de metabólitos intermediários tóxicos ou diminuindo a formação de produtos derivados. A categoria de EIM com maior frequência corresponde às aminoacidopatias, os erros inatos do metabolismo de aminoácidos. A fenilcetonúria (PKU) foi a primeira aminoacidopatia estudada e a de maior incidência na América Latina. Esta desordem é consequência, em sua forma clássica, de uma deficiência na enzima fenilalanina hidroxilase hepática (PAH), que catalisa a hidroxilação da fenilalanina (Phe) em tirosina, acumulando Phe nos líquidos e tecidos dos afetados, levando a disfunções neurológicas e outros sintomas clínicos. Estresse oxidativo é o termo utilizado quando há um desequilíbrio entre as espécies reativas e as defesas antioxidantes. O acúmulo de Phe provoca estresse oxidativo e alguns estudos propõem a hipótese do estresse oxidativo estar diretamente relacionado com as disfunções neurológicas apresentadas pelos pacientes. Neste trabalho foi avaliada a possível estratégia antioxidante da associação de creatina + piruvato em um modelo de PKU (administração de fenilalanina + α - metil-DL-fenilalanina, um inibidor da PAH) sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar com 21 dias de idade. Esta coadministração de creatina com piruvato foi eficaz em proteger as estruturas analisadas das alterações do conteúdo de sulfidrilas, oxidação do DCFH, atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase no modelo de PKU.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) compreendem um grupo de desordens hereditárias causadas normalmente por uma total ou parcial deficiência proteica, geralmente uma enzima, que conseqüentemente afeta uma rota metabólica, levando ao acúmulo de metabólitos intermediários tóxicos ou diminuindo a formação de produtos derivados da rota (Mak et al., 2013).

O termo foi proposto pelo médico inglês Archibald Garrod quando estudava pacientes com alcaptonúria. Embasado nas leis de Mendel, propôs um modelo de herança autossômica recessiva (Garrod, 1923); um tempo depois Beadle considerou que todos os processos bioquímicos do organismo ocorrem sob controle gênico, portanto, mutações gênicas levariam a rotas bioquímicas deficientes (Beadle e Tatum, 1941).

Os EIM estão presentes em pacientes de qualquer etnia ou idade, desde estágios fetais a avançados, afetando qualquer tipo de célula (Mak et al., 2013). Quanto aos sintomas e manifestações clínicas, destaca-se muita variação, dependendo da rota metabólica e tecido envolvidos, podendo ser de nulos/brandos até graves/incapacitantes, inclusive levando à morte. Alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central são os aspectos clínicos mais comuns dos EIM (Gropman, 2012).

Desde os primeiros estudos de Garrod até o momento, mais de 1.000 EIM diferentes foram identificados. Individualmente eles são raros, porém quando analisados em conjunto a incidência cumulativa é de aproximadamente 1 em cada 800 nascidos vivos, representando 10% de todas as doenças genéticas (Mak et al., 2013). Diversas classificações para os mesmos têm sido aplicadas, a mais utilizada leva em consideração a área do metabolismo afetada: EIM de ácidos orgânicos, aminoácidos, glicídios, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, purinas e pirimidinas, enzimas eritrocitárias, metais, lipoproteínas, hormônios e proteínas plasmáticas (Scriver et al., 2001). Aproximadamente 1/3 dos EIM correspondem aos erros inatos do metabolismo de aminoácidos (aminoacidopatias), sendo a fenilcetonúria (PKU) a de maior incidência na América Latina (Hoffmann, 1994).

1.1.1. Fenilcetonúria

A fenilalanina (Phe) é um aminoácido aromático essencial proveniente da dieta humana, indispensável para a síntese proteica e para biossíntese de outros metabólitos (Womack e Rose, 1934). Este aminoácido pode ser incorporado por proteínas celulares, ser convertido em ácido fenilpirúvico ou em tirosina (Tyr); normalmente 75% da Phe é convertida em Tyr por hidroxilação e 25% é incorporada a proteínas (McGee et al., 1972). Através da dieta, a Phe é absorvida pelo organismo e é reciclada através do *pool* de aminoácidos. A hidroxilação de Phe é feita pela enzima fenilalanina hidroxilase hepática (PAH) juntamente com O_2 e com seu cofator tetraidrobiopterina (BH_4), o qual é oxidado a di-hidrobiopterina (BH_2) e deve ser reduzido de volta a BH_4 para que a PAH continue formando Tyr (Scriver, 2001) (Figura 1). Esta reação dependente de BH_4 é o passo inicial e limitante na degradação de excesso Phe proveniente de proteínas na dieta, no qual a Tyr é degradada a produtos que são metabolizados no ciclo dos ácidos tricarbóxicos.

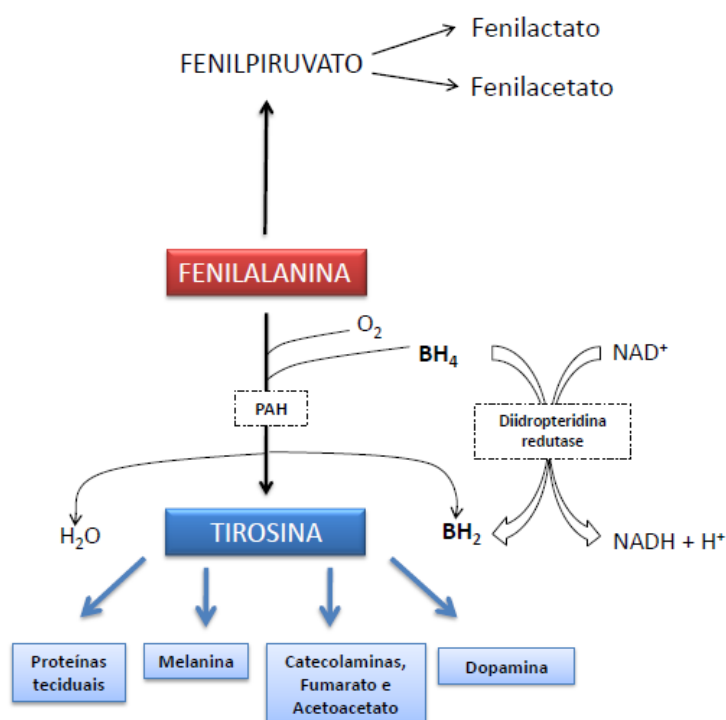


Figura 1: Metabolismo da Fenilalanina em humanos (Adaptada de (Champe et al., 2004))

Asbjorn Fölling, em 1934, observou que dois irmãos com retardo mental apresentavam grandes quantidades de corpos fenilcetônicos na urina, os quais eram

caracterizados por um odor marcante de mofo. Mais tarde descobriu que doses altas de Phe e proteínas aumentavam a excreção destes corpos, propondo um modelo de doença autossômica recessiva do metabolismo da Phe. Décadas depois os estudos se tornaram mais consideráveis, detectando a deficiência da PAH nos pacientes, a toxicidade de Phe, a participação do cofator BH₄, a descrição da estrutura molecular, diagnóstico e tratamentos (Erlandsen e Stevens, 1999; Kaufman, 1963; Lichter-Konecki et al., 1988; van Spronsen, 2010).

A PKU (OMIM #261600) é resultado, mais comumente, de uma deficiência na PAH ou, mais raramente, na deficiência no cofator BH₄ ou na biossíntese de BH₂. É uma doença autossômica recessiva que leva ao acúmulo de Phe e de compostos derivados do seu catabolismo alternativo, resultando na excreção de grandes quantidades destes pela urina (Scriver, 2001). Quando a rota metabólica da Phe está bloqueada, há uma via alternativa para o metabolismo da mesma, onde pode ser descarboxilada a feniletilamina e oxidada a ácido fenilacético e a ácido mandélico, ou ser transaminada a fenilpiruvato, o qual é convertido em fenilacetato e fenilactato, também encontrados em grandes quantidades na urina dos pacientes (Clemens et al., 1990; Langenbeck et al., 1992). Hiperfenilalaninemia (HPA) é o nome dado a diferentes distúrbios resultantes do acúmulo de Phe no sangue, que podem ser classificadas de acordo com as suas concentrações plasmáticas: (1) HPA não PKU, na qual os prejuízos ao paciente são mais brandos; (2) HPA transitória, com os níveis de Phe elevados ao nascer (de 3,5 a 10 mg/dl) mas logo normalizados; (3) PKU atípica, apresentando níveis estritos de Phe, entre 10 a 20 mg/dl e (4) PKU clássica, com níveis plasmáticos de Phe superiores a 20 mg/dl e a atividade enzimática menor que 1% (Scriver, 2001; Smith e Lee, 2000).

Os pacientes fenilcetonúricos são normais ao nascer, porém sem o tratamento adequado os sintomas aparecem já nos primeiros meses de vida. Os sintomas clínicos são variáveis e inespecíficos, relacionados com as concentrações plasmáticas do aminoácido; entre eles: microcefalia, eczema, dificuldades motoras e de comunicação, anormalidades detectadas em eletroencefalograma e ressonância magnética, hipopigmentação dérmica, atraso no desenvolvimento psicomotor, convulsões, hiperatividade, baixo QI, agressividade, hipotonia muscular, tremores, descalcificação de ossos, retardo no crescimento, distúrbios emocionais e comportamentais (Anastasoiaie et al., 2008; Hartnett et al., 2013). Pelo lado fisiológico, a elevada concentração de Phe afeta indiretamente a formação da mielina, transporte de aminoácidos através da barreira hemato-encefálica, o metabolismo energético

cerebral e leva a redução de neurotransmissores, especialmente dopamina (Huttenlocher, 2000; Surtees e Blau, 2000).

A incidência da PKU na população caucasiana é de aproximadamente 1:10.000 nascidos vivos (Williams et al., 2008); no Brasil está entre 1:12.000 a 15.000 e as regiões Sul e Sudeste são, respectivamente, as mais afetadas (Monteiro e Cândido, 2006). A PKU foi o primeiro EIM para o qual se desenvolveu triagem neonatal (Muchamore et al., 2006) e no Brasil o Programa de Triagem Neonatal para PKU já está implantado em todos os estados, com a coleta de sangue do calcanhar entre o 3º e 7º dia de vida do bebê, possibilitando iniciar o tratamento dietético antes de 10-14 dias de idade, antecipadamente aos sintomas clínicos (Mira e Marquez, 2000)

O tratamento consiste em, basicamente, retirar a Phe da dieta, com restrição de proteínas e suplementação especial de vitaminas, AA's essenciais, minerais e outros, incluindo Tyr, com níveis mínimos de Phe; porém a adesão é complicada, pois este aminoácido está presente em praticamente todas as proteínas existentes naturalmente (Lammardo et al., 2013) e pela falta de palatabilidade das fórmulas comerciais. Novas estratégias de tratamento vêm sendo estudadas nos últimos anos, incluindo suplementos alimentícios mais palatáveis (Ney et al., 2009).

1.2. Espécies Reativas, Antioxidantes e Estresse Oxidativo

Durante o processo da cadeia transportadora de elétrons, uma das etapas da respiração celular, pode ocorrer escape de elétrons, os quais se forem capturados por moléculas de oxigênio circulantes podem se transformar em espécies reativas, como o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxil ($OH\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como mostra a Figura 2.

Espécies reativas são definidas como moléculas que contêm um ou mais elétrons não pareados no orbital mais externo e na maioria dos casos são radicais livres. São altamente reativos por conta da sua instabilidade, podendo reagir com qualquer composto formando uma reação em cadeia que pode ser lesiva a várias estruturas celulares; quando estes são derivados do oxigênio ou nitrogênio, são chamados de espécies reativas ao oxigênio (ERO) e ao nitrogênio (ERN), respectivamente (Halliwell e Gutteridge, 1984).

As EROs são produzidas naturalmente pelo metabolismo celular, seja por subprodutos acidentais ou por produtos de reações enzimáticas e não-enzimáticas, podendo ser benéficas ou prejudiciais para o organismo (Smith et al., 2007; Valko et al., 2007).

A figura 2 mostra a produção de algumas destas espécies durante a redução do oxigênio à água. Entre 0,1 e 4% do oxigênio que não é reduzido à água na cadeia respiratória pode gerar EROs, quantidade suficiente para ter efeitos letais caso não seja rapidamente neutralizado (Kaminsky e Zhivotovsky, 2014).

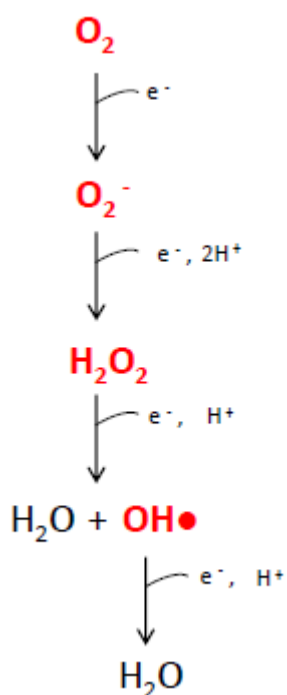


Figura 2: Produção de espécies reativas durante a redução de O_2 a H_2O (Adaptada de Smith et al., 2007).

Quando em elevadas concentrações, é gerado um estado pró-oxidante, no qual as espécies reativas podem causar danos às estruturas celulares, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas; a lesão permanente do material genético resultante do dano oxidativo é o primeiro passo para mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (Halliwell e Gutteridge, 2007; Valko et al., 2007; Valko et al., 2006). As alterações causadas por este processo oxidativo podem também alterar a conformação de proteínas, levando à perda de sua função. Entre as principais formas de EROs, o radical hidroxila é o mais reativo, porém com menor poder de difusão quando comparado com o H_2O_2 , e o ânion superóxido possui baixa capacidade oxidativa (Halliwell, 2000).

O aparecimento de oxigênio se deu em quantidades significativas há 2,2 bilhões de anos em grande parte devido à evolução da fotossíntese pelas cianobactérias; a vantagem do O_2 ter se acumulado na atmosfera gerou vantagens para os organismos, como a proteção da radiação pela camada de ozônio que favoreceu a colonização terrestre por organismos anaeróbicos. A adaptação aos elevados níveis de oxigênio marcou o aparecimento de espécies aeróbicas, que desenvolveram defesas antioxidantes contra a toxicidade do O_2 , aumentando o rendimento de energia e favorecendo o desenvolvimento de organismos multicelulares complexos (Halliwell, 2006).

As defesas antioxidantes reduzem a formação de espécies reativas ou promovem a sua inativação, podendo ser qualquer substância que quando presente em baixa concentração comparada a do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne a oxidação do mesmo, segundo Halliwell (2000). Estas defesas podem ser enzimáticas ou não enzimáticas; entre as enzimáticas destacamos as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx), as quais convertem espécies reativas em menos reativas, como o H_2O_2 , ou em água (Figura 3). Entre as não enzimáticas, além de vitaminas, destacamos a glutatona reduzida (GSH) como uma das mais importantes do sistema nervoso central pelos seus diversos papéis contra o estresse oxidativo, podendo neutralizar EROs e servir de substrato para a GPx (Masella et al., 2005).

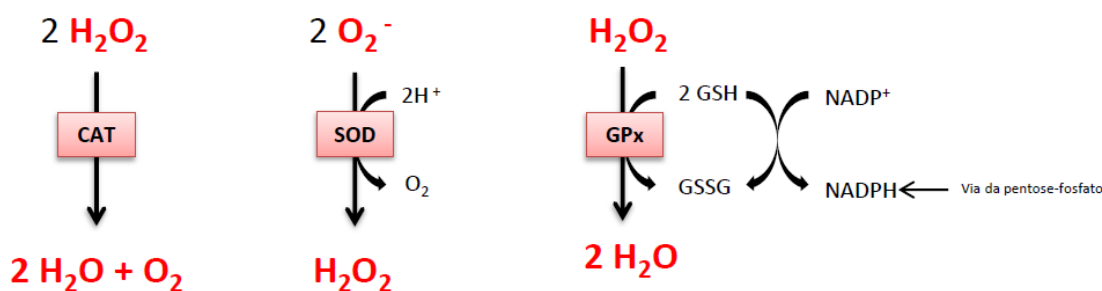


Figura 3: Atividade das enzimas antioxidantes Catalase, Superóxido Dismutase e Glutationa Peroxidase (Adaptada de Smith et al., 2007).

Estresse Oxidativo (EO) é o termo utilizado quando a produção de ER ultrapassa a capacidade de remoção destes pelos mecanismos de defesas, podendo ser resultante tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto da produção excessiva de substâncias pró-oxidantes (Halliwell, 2006). Estudos recentes relatam o envolvimento do EO na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (Chiurchiù et al. 2016).

Na PKU, o estresse oxidativo tem sido bem estudado em humanos e animais, com estudos demonstrando a diminuição de algumas defesas antioxidantes, danos lipídicos, proteicos e ao DNA, como resumido na Tabela 1 (Schuck et al., 2015).

Tabela 1: Estudos demonstrando o estresse oxidativo na PKU
(Adaptada de Schuck et al., 2005).

Amostra	Achados	Referência
Sangue de pacientes PKU	- SAT	Schulpis et al., 2005
Leucócitos de pacientes PKU	+ Dano ao DNA	Sitta et al., 2009
Sangue de pacientes PKU	- RAT; + TBA-RS	Sitta et al., 2009
Plasma e eritrócitos de pacientes PKU	- GSH, GPx, RAT, SH; + TBA-RS, CAR	Sitta et al., 2009
Plasma e eritrócitos de pacientes PKU	- RAT, GPx; + TBA-RS, CAT, SOD	Sitta et al., 2009
Plasma e eritrócitos de pacientes PKU	- RAT, GPx; + TBA-RS	Sirtori et al., 2005
Córtex e eritrócitos de camundongos	- GSH/GSSG, NADPH; + CAT	Ercal et al., 2002
Córtex de rato	- CAT, GPx	Kienzel et al., 2002
Córtex e cerebelo de rato	- GPx, GR; + GSSG	Martinez et al., 2002
Córtex de rato	- SH, GSH; + TBA-RS	Fernandes et al., 2010
Córtex de rato	- CAT, SOD, GPx, GSH; + TBA-RS, EROs	Moraes et al., 2010
Córtex de rato	- CAT; + TBA-RS, CAR, SOD, EROs	Moraes et al., 2013
Córtex e sangue de rato	+ Dano ao DNA	Simon et al., 2013
Plasma e urina de pacientes PKU	+ Dano ao DNA	Deon et al., 2015

CAR: Carbonilas; CAT: Catalase; GSH: Glutaciona reduzida; GSSG: Glutaciona oxidada; GPx: Glutaciona peroxidase; GR: Glutaciona redutase; RAT: Reatividade antioxidante total; SAT: Status antioxidante total; SH: Sulfidril; SOD: Superóxido dismutase; TBA-RS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. + = aumento; - = diminuição

1.3. Creatina e Piruvato

A creatina (Cre) é uma substância orgânica, formada naturalmente no organismo, envolvida na manutenção da homeostase energética principalmente no músculo esquelético e cérebro, juntamente com a sua forma fosforilada, a fosfocreatina (PCr). Também serve como suplemento nutricional para atletas com o objetivo de manter alta energia durante o exercício físico (Wallimann, 1994). O fornecimento de energia se dá pela enzima creatina-cinase (CK), a qual catalisa a transferência reversível de um grupo N-fosforil da PCr para o ADP, gerando ATP e Cre, em uma reação dependente de magnésio, formando o chamado Sistema PCr/CK. Este sistema age como um tampão de energia que mantém a concentração de ATP e ADP estáveis (buscando manter a relação ATP/ADP elevada), tamponando prótons e evitando a acidificação intracelular (Rojo et al., 1991; Wallimann, 1994; Wyss et al., 1992). Além disso, a Cre protege as células contra o ânion superóxido e peroxinitrito (Lawler et al., 2002; Sartini et al., 2012) e os neurônios contra neurotoxinas (Brewer and Wallimann, 2000).

O piruvato (Pyr), ou ácido pirúvico, é um composto orgânico metabolizado de forma endógena ao fim da glicólise no citosol; age como um mecanismo de defesa contra a citotoxicidade induzida por H_2O_2 (Desagher et al., 1997). Sua oxidação é a etapa mais curta da respiração celular e ocorre na matriz mitocondrial. A enzima piruvato-cinase (PK) é uma enzima chave no metabolismo celular e catalisa a transferência de um grupamento fosforil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o ADP, formando ATP e Pyr, de forma irreversível; esta é a última etapa da via glicolítica, processo essencial para o cérebro, uma vez que a glicose é seu principal substrato (Jurica et al., 1998; Mattevi et al., 1996; Sokoloff, 1993). Estudos mostram que a Phe inibe a PK por competição pelos substratos da mesma, como o ADP e o PEP (Feksa et al., 2003).

A suplementação de creatina e/ou piruvato vem sendo estudada como estratégia protetora em doenças neurodegenerativas e situações de hipóxia e isquemia, e também em erros inatos do metabolismo de aminoácidos. Já observamos que o tratamento com cre+pyr preveniu a diminuição dos espinhos dendríticos no hipocampo de ratos Wistar submetidos a um modelo de PKU (Dos Reis et al., 2013); vimos também a prevenção das alterações da rede de transferência de fosforila e de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo na tirosinemia e hiperleucinemia (de Andrade et al., 2015; Rieger et al., 2017); em modelo de hipertriptofanemia e HPA induzidos em ratos Wistar através de administração intra-hipocampal dos aminoácidos triptofano e Phe, respectivamente, a combinação Cre+Pyr

preveniu alterações comportamentais e relacionadas ao estresse oxidativo (Andrade et al., 2012; Berti et al., 2012) e foi eficaz na proteção frente ao estresse oxidativo e alterações da rede de transferência de fosforila causadas na prole pela hiperleucinemia e hiperfenilalaninemia maternas (de Franceschi et al., 2013; Bortoluzzi et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Avaliar em cérebro de ratos Wistar com 21 dias de vida a possível proteção da associação de creatina e piruvato em relação a parâmetros de estresse oxidativo em modelo animal de PKU.

2.2. Objetivos específicos

Estudar os seguintes parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos Wistar, na presença ou ausência de creatina e piruvato em modelo de PKU:

- Produção de espécies reativas (oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato);
- Dano oxidativo proteico (conteúdo de grupamento tióis);
- Defesas antioxidantes não-enzimáticas (concentração de glutathiona reduzida);
- Defesas antioxidantes enzimáticas (atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Os animais utilizados no estudo foram provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, mantidos 8 filhotes por gaiola mais a mãe (dimensões: 49 cm comprimento x 34 cm de largura x 16 cm de altura), cama de maravalha autoclavada, em ambiente climatizado à temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com ciclos claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração comercial padrão e água a vontade.

O presente trabalho de conclusão de curso está amparado no projeto “Metabolismo energético e morte celular em estruturas cerebrais de ratos Wistar submetidos a modelo de hiperfenilalaninemia” nº 29388, aprovado pelo CEUA – UFRGS.

3.2. Experimentos

3.2.1. Desenho experimental

O modelo de PKU foi induzido conforme anteriormente descrito. Os animais foram separados randomicamente em 4 grupos: **(1)** Controle (salina 0,85%); **(2)** PKU (Phe + α -metil-DL-fenilalanina, inibidor da enzima fenilalanina hidroxilase); **(3)** Cre + Pyr e **(4)** PKU + Cre + Pyr. Cada grupo teve um número amostral de 8 filhotes, totalizando 32. O cálculo amostral para cada grupo experimental foi realizado pelo programa MINITAB 15®, o qual expressou um valor de 8 ratos de ninhadas diferentes por grupo. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais neste estudo, conforme as Diretrizes para Prática de Eutanásia do CONCEA.

3.2.2. Indução química do modelo de Fenilcetonúria

As doses foram administradas 2 vezes ao dia com o intervalo de 12 horas (uma pela manhã e outra pela tarde, sendo que α -metil-DL-Phe foi administrada somente pela manhã), do 7º (P7) ao 21º (P21) dia de vida pelas vias subcutâneas (s.c.) e intraperitoneal (i.p.) de acordo com seu grupo em doses calculadas de acordo com seu peso conforme o seu grupo (Tabela 2).

O grau de severidade do tratamento é considerado moderado de acordo com o Guia de Severidade dos Procedimentos Científicos CEUA-Propesq UFRGS.

Tabela 2: Indução do modelo de hiperfenilalaninemia (PKU) pela manhã.

Grupo	Via	Doses (i.p.: peso x 0,01; s.c.: peso x 0,03)
1 - Controle	2 i.p. e 1 s.c.	
2 – PKU	i.p.: α -metil-DL-Phe e salina s.c.: Phe	Phe: 5,2 μ mol/g de peso (Feksa et al., 2002) α -metil-DL-Phe: 1,6 μ mol/g de peso (Kienzle Hagen et al., 2002)
3 – Tratamento	i.p.: Cre+Pyr e salina s.c.: salina	Cre: 0,4 mg/g de peso (Stockler et al., 1994) Pyr: 0,2 mg/g de peso (Ryu, 2006)
4 – PKU + Tratamento	i.p.: Cre+Pyr e α -metil-DL-Phe s.c.: Phe	Cre: 0,4 mg/g de peso (Stockler et al., 1994) Pyr: 0,2 mg/g de peso (Ryu, 2006) α -metil-DL-Phe: 1,6 μ mol/g de peso (Kienzle Hagen et al., 2002)

3.2.3. Obtenção das amostras

Os animais foram sacrificados no 22º dia de vida, 12h após a última injeção, por decapitação sem anestesia e sem sofrimento (Holson, 1992). Eles não receberam anestesia para a decapitação pois a mesma interfere nas medidas de estresse oxidativo utilizadas em nosso estudo (La Monaca and Fodale, 2012; Yamada et al., 2009; Yon et al., 2005).

A caixa craniana foi aberta e o seu conteúdo retirado. O cérebro foi limpo, sendo removido o excesso de sangue dos vasos externos e a substância branca das vias descendentes. O córtex cerebral, hipocampo e cerebelo foram isolados e utilizados para determinação dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo. O grau de severidade para a obtenção das amostras que foram utilizadas na determinação de todos os parâmetros bioquímicos é considerado sem recuperação, conforme o guia de severidade formulado pelo CEUA-Propesq UFRGS.

3.2.4. Parâmetros de estresse oxidativo

O córtex cerebral, hipocampo e cerebelo foram isolados, pesados e homogeneizados (1:10; p/v) com tampão fosfato de sódio 100mM com KCl 40mM pH 7,4 em Potter de vidro, com pistilo de teflon com 10 movimentos verticais, e a seguir centrifugados a uma velocidade de 800 rpm por 10 min a 4° C. O sobrenadante das amostras foi utilizado para análise dos parâmetros a seguir:

(a) Ensaio de oxidação da 2'7' diclorofluoresceína (DCFH): A produção de espécies reativas foi mensurada de acordo com LeBel e colaboradores, 1992, utilizando diacetato de 2'7' dihidrodiclorofluoresceína (DCFH-DA). Em resumo, 30 µL de amostra foram incubados por 30 minutos a 37°C no escuro em 30 µL de tampão Fosfato de Sódio 20mM com pH 7.4, KCl 140 mM e 240 µL da solução de diacetato de 2'7' diclorofluoresceína reduzida (H₂DCF-DA) 100 mM em uma placa de 96 poços. O DCFH-DA é hidrolisado enzimaticamente por esterases intercelulares para formar um composto não fluorescente (DCFH) que depois é oxidado por espécies reativas presentes nas amostras a uma forma altamente fluorescente (DCF). A intensidade da fluorescência de DCF é proporcional à quantidade de espécies reativas formadas, e foi mensurada usando comprimentos de ondas com excitação e emissão de 480 e 535 nm, respectivamente. A curva de calibração foi realizada com DCF padrão e os níveis de espécies reativas foram expressos em nmol de DCF formado por mg de proteína.

(b) Conteúdo total de sulfidrilas: O método descrito por Aksenov e Marksbery, 2001, baseia-se na redução do ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) cuja absorção é medida por espectrofotometria a 412 nm. A diminuição do teor total de sulfidrilas pode se correlacionar com a oxidação de compostos não proteicos ou danos oxidativo nas proteínas. Os resultados foram expressos em nmol de TNB por mg de proteína.

(c) Conteúdo de glutatona reduzida (GSH): Um dos principais antioxidantes não enzimáticos presente nas células é a GSH; esta reduz os peróxidos principalmente através da atividade da glutatona peroxidase (GPx), elimina os radicais superóxido e hidroxil e regenera a vitamina C oxidada. Os níveis de GSH foram medidos de acordo com Browne e Armstrong, 1998, cujo ensaio é baseado na reação de GSH com o fluoróforo oftaldeído (OPT) após a amostra ser desproteinizada com ácido metafosfórico. Em seguida, 150 µl das amostras foram incubadas com volume igual de OPT (1 mg/mL de metanol) em

15 min a 37°C. Após isso, a fluorescência foi medida usando excitação de 350 nm e emissão de 420 nm. A curva de calibração foi realizada com GSH padrão (1mM) e as concentrações do sobrenadante do tecido foram expressas em nmol de GSH por mg de proteína.

(d) Atividade da catalase (CAT): A atividade da CAT foi mensurada de acordo com Aebi, 1984, onde mede-se o decaimento da absorbância de H₂O₂ a 240 nm. O meio da reação continha H₂O₂ 20 mM, Triton X-100 0,1%, tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 e 10 µl do sobrenadante. A CAT é responsável pela transformação de H₂O₂ em H₂O; o peróxido de hidrogênio pode reagir com grupos tiol e metionil e outras proteínas para formar radicais hidroxil de alta reatividade. Uma unidade de CAT é definida como 1 µmol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT por mg de proteína.

(e) Atividade da glutaciona peroxidase (GPx): A atividade da GPx foi medida de acordo com Wendel, 1981, utilizando como substrato o hidroperóxido de terc-butil. A atividade desta enzima foi determinada monitorando o decaimento do fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) a 340 nm em um meio contendo tampão de fosfato de potássio 100 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM pH 7,7, glutaciona 2 mM, 0,15 U/mL de glutaciona redutase, azida 0,4 mM, hidroperóxido de terc-butil 0,5 mM, NADPH 0,1 mM e 10 µl de sobrenadante. Uma unidade de GPx é definida como 1 µmol de NADPH consumido por minuto. A atividade específica da enzima foi expressa como µmol de NADPH consumido por minuto por mg de proteína.

(f) Atividade da superóxido dismutase (SOD): A SOD é responsável pela dismutação de radicais superóxido livres em peróxido de hidrogênio, uma substância menos reativa. A atividade desta enzima foi determinada como descrito por Marklund, 1985, se baseia na capacidade do pirogalol se auto-oxidar, um processo altamente dependente do radical superóxido. A inibição da auto-oxidação deste composto ocorre na presença da SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada por espectrofotometria a 420 nm. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como padrão. Uma inibição de 50% da auto-oxidação do pirogalol é definida como 1 unidade de SOD e a atividade específica foi expressa como unidades de SOD por mg de proteína.

3.2.5. Determinação de proteínas

O conteúdo de proteína das estruturas homogeneizadas foi determinado pelo método de Lowry, 1951, utilizando albumina sérica bovina como padrão.

3.2.6. Análise Estatística

Quando a distribuição dos dados foi normal, foi realizada análise de variância (ANOVA) de 2 vias (fatores: fenilalanina, creatina + piruvato). A comparação entre médias para fins de demonstração gráfica, foi realizada por ANOVA de 1 via seguida pelo teste de Tukey quando o valor de F foi significativo ($p < 0,05$) em pelo menos uma das estruturas analisadas. Todas as análises foram realizadas usando o programa Statistical Package for Social Sciences 18.0[®] (SPSS).

4. RESULTADOS

Neste trabalho foram analisados os possíveis efeitos antioxidantes da coadministração de creatina com piruvato em córtex, cerebelo e hipocampo de ratos Wistar com 21 dias de vida submetidos a um modelo de fenilcetonúria.

Primeiramente, foi verificada a formação de espécies reativas através do ensaio de oxidação do DCFH. ANOVA de duas vias indicou uma interação significativa entre PKU e Cre+Pyr somente no hipocampo [$F(1,20) = 14,21$; $p < 0,01$] (Fig. 4).

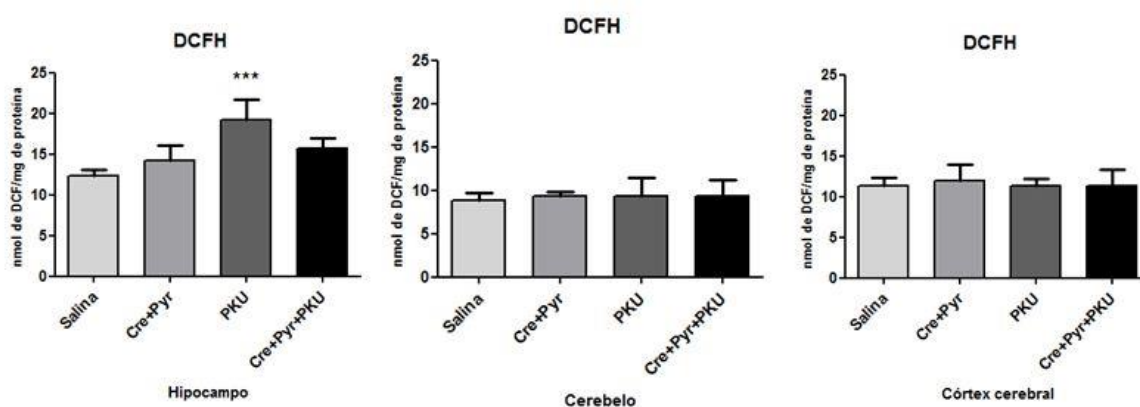


Figura 4: Efeitos da administração de creatina e piruvato em modelo fenilcetonúrico na formação de espécies reativas pelo ensaio de oxidação de DCFH em hipocampo, cerebelo e córtex cerebral. Dados expressos em média \pm desvio padrão ($n = 8$ por grupo). ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey; *** $p < 0,001$ em comparação com os outros grupos.

O dano proteico foi avaliado através do conteúdo total de sulfidrilas. ANOVA de duas vias mostrou uma interação significativa entre PKU e Cre+Pyr no hipocampo [$F(1,20) = 5,56$; $p < 0,05$], cerebelo [$F(1,20) = 5,53$; $p < 0,05$] e no córtex cerebral [$F(1,20) = 7,73$; $p < 0,05$] (Fig. 5).

O sistema antioxidante não enzimático foi avaliado pela concentração de GSH. ANOVA de duas vias não expressou interação significativa entre PKU e Cre+Pyr em nenhum dos tecidos analisados.

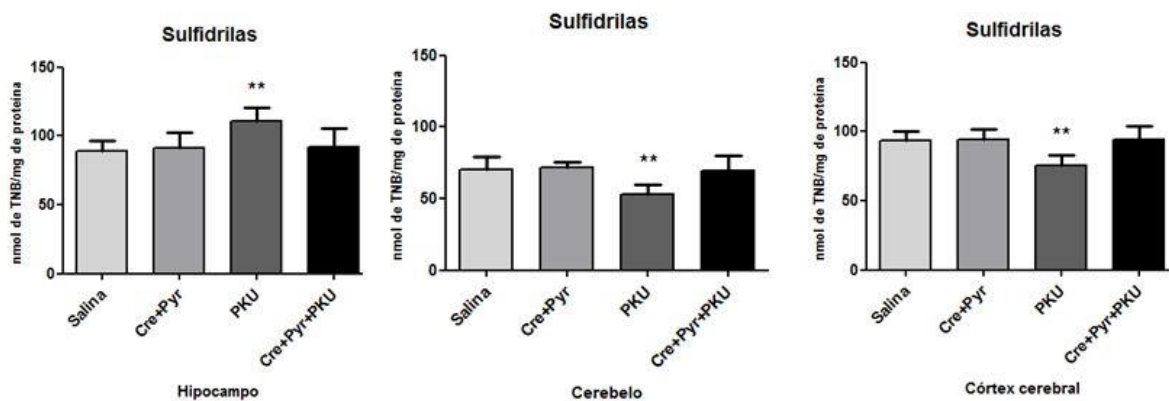


Figura 5: Efeitos da administração de creatina e piruvato em modelo de fenilcetonúria no conteúdo total de sulfidrilas em hipocampo, cerebelo e córtex cerebral. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n= 8 por grupo). ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey; ** p < 0,01 em comparação com os outros grupos.

Por fim, foi analisado o sistema antioxidante enzimático, através da atividade das enzimas GPx, CAT e SOD. Analisando a atividade da GPx, ANOVA de duas vias mostrou uma interação significativa entre PKU e Cre+Pyr somente no cerebelo [F (1,20) = 15,06; p < 0,01], demonstrando que a suplementação de Cre+Pyr preveniu o aumento da atividade da enzima causada pelo acúmulo de PKU (Fig. 6). ANOVA de duas vias também indicou interação significativa entre PKU e Cre+Pyr quando analisada a atividade da CAT no hipocampo [F (1,20) = 9,93; p < 0,01], cerebelo [F (1,20) = 37,43; p < 0,001] e córtex cerebral [F (1,20) = 5,08; p < 0,05] (Fig. 7). Foi visto que quando mensurada a atividade da SOD no cerebelo [F (1,20) = 4,74; p < 0,05] e córtex cerebral [F (1,20) = 6,99; p < 0,05], PKU e Cre+Pyr interagiram entre si significativamente, como mostra a ANOVA de duas vias (Fig. 8).

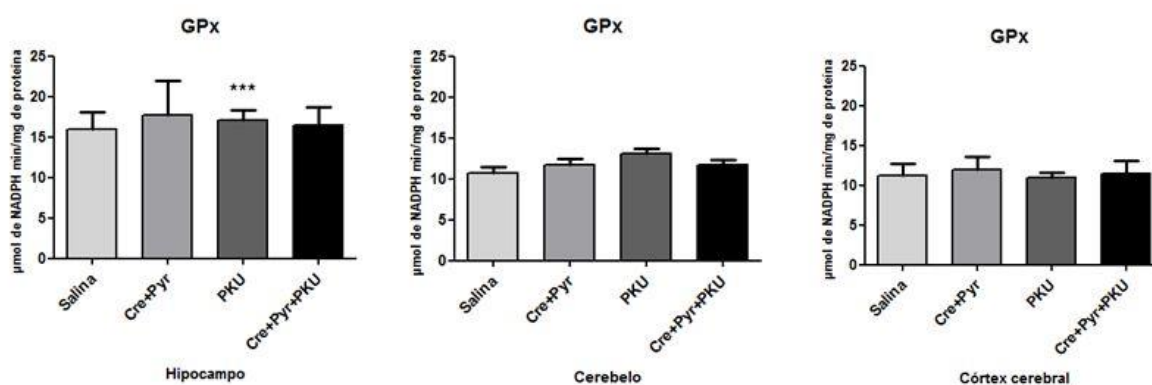


Figura 6: Efeitos da administração de creatina e piruvato em modelo fenilcetonúrico na atividade da enzima GPx em hipocampo, cerebelo e córtex cerebral. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n= 8 por grupo). ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. *** p < 0,001 em comparação com os outros grupos.

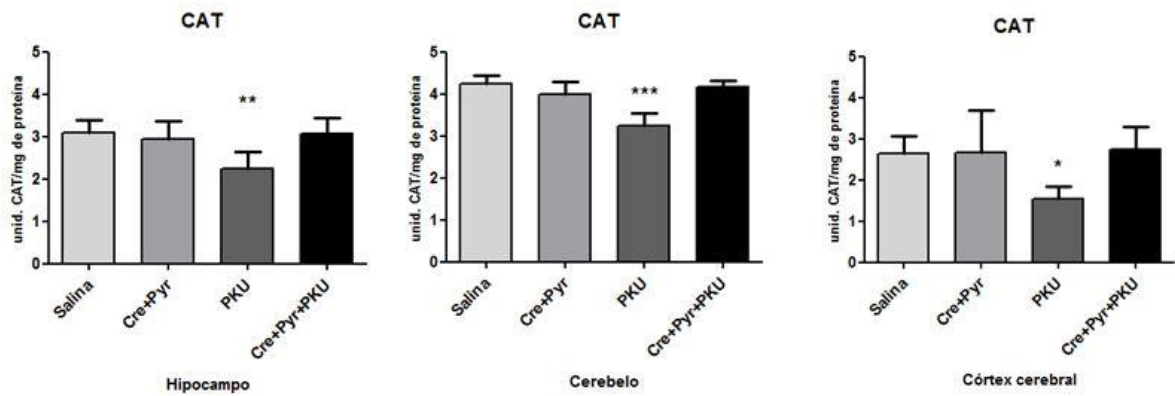


Figura 7: Efeitos da administração de creatina e piruvato em modelo fenilcetonúrico na atividade da enzima CAT em hipocampo, cerebelo e córtex cerebral. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 8 por grupo). ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 em comparação com os outros grupos.

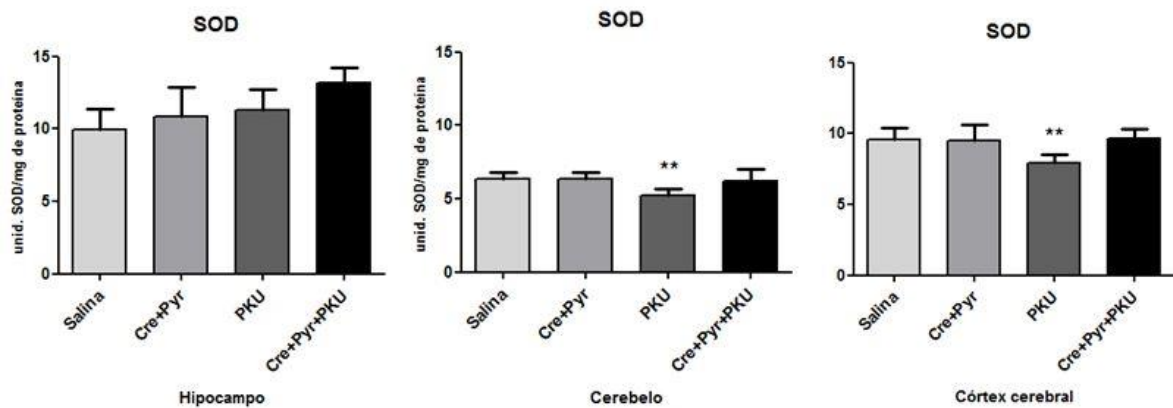


Figura 8: Efeitos da administração de creatina + piruvato em modelo fenilcetonúrico na atividade da enzima SOD em hipocampo, cerebelo e córtex cerebral. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n= 8 por grupo). ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. ** p < 0,01 em comparação com os outros grupos.

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em modelo animal, quais são os efeitos do modelo de PKU sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos, juntamente com a investigação de uma possível estratégia antioxidante utilizando a suplementação de creatina com piruvato. Já está elucidado que há estresse oxidativo na PKU e alguns estudos propõem que estresse oxidativo está diretamente relacionado às disfunções neurológicas apresentadas pelos pacientes (Rocha e Martins, 2012).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. As 3 estruturas cerebrais estudadas mostraram respostas diferentes à HPA. Houve um aumento da geração de espécies reativas pela oxidação de DCFH a DCF no hipocampo e a coadministração de creatina com piruvato preveniu este aumento. Em córtex cerebral e cerebelo não foi detectado aumento das espécies reativas que reagem com DCFH. O uso da DCFH-DA como sonda para detecção de espécies reativas é alvo de muita controvérsia, como por exemplo o fato de que não reage diretamente com H_2O_2 para formar seu produto fluorescente, o DCF, e, dessa forma, não pode ser empregada como medida direta de H_2O_2 (Kalyanaraman et al., 2012). Considerando as alterações observadas na atividade das enzimas CAT, GPx e SOD nas três estruturas avaliadas, não é possível descartar que o H_2O_2 tenha sido a principal espécie reativa envolvida nesse estudo, e, dadas as limitações da técnica empregando DCFH, não se observa aumento de espécies reativas no córtex cerebral e cerebelo. Embora o H_2O_2 seja um composto instável e que se degrada em outras espécies reativas, detectáveis através da DCFH, é possível que os resultados observados em córtex cerebral e cerebelo, no que diz respeito à presença de espécies reativas, se devam às condições experimentais e limitações da técnica utilizada. Por outro lado, as alterações observadas no conteúdo de sulfidrilas totais indicam que houve produção de espécies reativas em todos os tecidos. Portanto, as espécies reativas podem ter reagido e não serem detectadas no momento da sua determinação, justificando as alterações de grupamento sulfidrilas em córtex e cerebelo. Em um quadro de estresse oxidativo, as espécies reativas podem reagir com algumas biomoléculas como proteínas, lipídeos e material genético, causando dano às mesmas (Halliwell and Gutteridge, 2007). A alteração dos grupamentos -SH (sulfidrilas) é um dos principais indicativos de estresse oxidativo, gerando perda proteica, inativação catalítica, diminuição da capacidade antioxidante, entre outras funções específicas (Sohal, 2002). A fenilcetonúria pode gerar a diminuição dos níveis de sulfidrilas (oxidados principalmente

pelo radical hidroxila), que são avaliados pela redução do DTNB em TNB por tiois, demonstrando uma correlação com danos oxidativos à proteínas. Neste trabalho, observamos uma interação entre PKU e Cre+Pyr, evidenciando que a co-administração de creatina e piruvato foi eficaz em prevenir os danos proteicos causados no grupo fenilcetonúrico nos três tecidos analisados.

A GSH é um dos mais importantes sistemas antioxidantes não enzimáticos, e neste trabalho não foi verificada interação entre PKU e Cre+Pyr, e em nenhum dos quatro grupos os níveis de GSH foram alterados. A atividade da GPx, uma das enzimas responsáveis pelo sistema antioxidante enzimático, foi preservada através da suplementação de creatina e piruvato no cerebelo, uma vez que foi detectada uma interação entre PKU e Cre+Pyr. Esta enzima remove hidroperóxidos orgânicos, como o peróxido de hidrogênio. Porém, a glutathione opera em ciclos entre a sua forma oxidada e reduzida juntamente com mais uma enzima, a glutathione redutase, e para avaliarmos a integridade total deste sistema, os níveis de todos os componentes devem ser avaliados.

Outras duas enzimas responsáveis pelo sistema antioxidante enzimático e que foram avaliadas são a superóxido dismutase e a catalase. A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido, com grande potencial de dano celular, em uma molécula menos reativa, o H_2O_2 . A CAT atua na dismutação do H_2O_2 em duas moléculas de água e uma de oxigênio e sua atividade é dependente de NADPH. Foi observado que no hipocampo não houve diferença entre os grupos na atividade da SOD e que a suplementação com Cre+Pyr protegeu o tecido frente à diminuição da atividade da CAT causada pela PKU. Já em cerebelo e córtex cerebral ambas as enzimas tiveram sua atividade diminuída no grupo fenilcetonúrico e a suplementação de creatina e piruvato interagiu com PKU prevenindo este dano. Pode-se inferir que o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio estariam, no grupo fenilcetonúrico, em quantidades alteradas e que com a co-administração de creatina e piruvato estes níveis se normalizaram, uma vez que as enzimas envolvidas na detoxificação dessas espécies reativas tiveram suas atividades também normalizadas.

Em conclusão, a coadministração de creatina + piruvato foi eficaz em prevenir os danos causados pelo acúmulo de Phe na maioria dos parâmetros e estruturas cerebrais analisadas. Entretanto, mais estudos são necessários, especialmente no que diz respeito à geração de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio no cérebro frente ao modelo de PKU. Além disso, seria interessante investigar se a atuação da PKU sobre os parâmetros de estresse oxidativo se dá primeiramente através da formação direta de espécies reativas ou

modulação das defesas antioxidantes enzimáticas, uma vez que estas foram as mais alteradas no presente estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi, H. (1984). **Catalase in vitro**. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.

Aksenov, M.Y., and Markesbery, W.R. (2001). **Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease**. *Neuroscience Letters* 302, 141-145.

Anastasoae, V., Kurzius, L., Forbes, P., and Waisbren, S. (2008). **Stability of blood phenylalanine levels and IQ in children with phenylketonuria**. *Molecular Genetics and Metabolism* 95, 17-20.

Andrade, V.S., Rojas, D.B., Oliveira, L., Nunes, M.L., de Castro, F.L., Garcia, C., Gemelli, T., de Andrade, R.B., and Wannmacher, C.M. (2012). **Creatine and pyruvate prevent behavioral and oxidative stress alterations caused by hypertryptophanemia in rats**. *Molecular and Cellular Biochemistry* 362, 225-232.

Beadle, G.W., and Tatum, E.L. (1941). **Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 27, 499-506.

Berti, S.L., Nasi, G.M., Garcia, C., Castro, F.L., Nunes, M.L., Rojas, D.B., Moraes, T.B., Dutra-Filho, C.S., and Wannmacher, C.M. (2012). **Pyruvate and creatine prevent oxidative stress and behavioral alterations caused by phenylalanine administration into hippocampus of rats**. *Metabolic Brain Disease* 27, 79-89.

Bortoluzzi, V.T., de Franceschi, I.D., Rieger, E., and Wannmacher, C.M. (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* 39, 1594-1602.

Brewer, G.J., and Wallimann, T.W. (2000). **Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons**. *Journal of Neurochemistry* 74, 1968-1978.

- Browne, R.W., and Armstrong, D. (1998). **Reduced glutathione and glutathione disulfide.** *Methods in Molecular Biology* 108, 347-352.
- Carl P. LeBel, H.I., Stephen C. Bondy (1992). **Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress.** *Chemical Research in Toxicology* 5, 227-231.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., and Ferrier, D.R. (2004). **Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry**, 4 edn (LWW).
- Clemens, P.C., Schunemann, M.H., Kohlschutter, A., and Hoffman, G.F. (1990). **Phenylalanine metabolites in phenylketonuria.** *The Journal of Pediatrics* 116, 665-666.
- de Andrade, R.B., Gemelli, T., Rojas, D.B., Bonorino, N.F., Costa, B.M., Funchal, C., Dutra-Filho, C.S., and Wannmacher, C.M. (2015). **Creatine and pyruvate prevent the alterations caused by tyrosine on parameters of oxidative stress and enzyme activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex of Wistar rats.** *Molecular Neurobiology* 51, 1184-1194.
- de Franceschi, I.D., Rieger, E., Vargas, A.P., Rojas, D.B., Campos, A.G., Rech, V.C., Feksa, L.R., and Wannmacher, C.M. (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, 632-643.
- Desagher, S., Glowinski, J., and Premont, J. (1997). **Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity.** *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17, 9060-9067.
- Dos Reis, E.A., Rieger, E., de Souza, S.S., Rasia-Filho, A.A., and Wannmacher, C.M. (2013). **Effects of a co-treatment with pyruvate and creatine on dendritic spines in rat hippocampus and posterodorsal medial amygdala in a phenylketonuria animal model.** *Metabolic Brain Disease* 28, 509-517.
- Erlandsen, H., and Stevens, R.C. (1999). **The structural basis of phenylketonuria.** *Molecular Genetics And Metabolism* 68, 103-125.

- Feksa, L.R., Cornelio, A.R., Dutra-Filho, C.S., de Souza Wyse, A.T., Wajner, M., and Wannmacher, C.M. (2003). **Characterization of the inhibition of pyruvate kinase caused by phenylalanine and phenylpyruvate in rat brain cortex.** Brain Research 968, 199-205.
- Feksa, L.R., Cornelio, A.R., Rech, V.C., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T., Wajner, M., and Wannmacher, C.M. (2002). **Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in brain cortex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia.** Neurochemical Research 27, 947-952.
- Garrod, A.E. (1923). **Inborn errors of metabolism**, 2d edn (London,: H. Frowde and Hodder & Stoughton).
- Gropman, A.L. (2012). **Patterns of brain injury in inborn errors of metabolism.** In Seminars Pediatric Neurology pp. 203-210.
- Halliwell, B. (2000). **Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity?** Oral Diseases 6, 136-137.
- Halliwell, B. (2006). **Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life.** Plant Physiology 141, 312-322.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1984). **Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage.** Lancet 2, 1095.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (2007). **Free radicals in biology and medicine**, 4 edn (Oxford University Press).
- Hartnett, C., Salvarinova-Zivkovic, R., Yap-Todos, E., Cheng, B., Giezen, A., Horvath, G., Lillquist, Y., Vallance, H., and Stockler-Ipsiroglu, S. (2013). **Long-term outcomes of blood phenylalanine concentrations in children with classical phenylketonuria.** Molecular Genetics and Metabolism 108, 255-258.
- Hoffmann, G.F. (1994). **Selective screening for inborn errors of metabolism--past, present and future.** European Journal of Pediatrics 153, S2-8.
- Holson, R.R. (1992). **Euthanasia by decapitation: evidence that this technique produces prompt, painless unconsciousness in laboratory rodents.** Neurotoxicology and Teratology 14, 253-257.

Huttenlocher, P.R. (2000). **The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies.** European Journal of Pediatrics 159 Suppl 2, S102-106.

Jurica, M.S., Mesecar, A., Heath, P.J., Shi, W., Nowak, T., and Stoddard, B.L. (1998). **The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate.** Structure 6, 195-210.

Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J., 2nd, and Ischiropoulos, H. (2012). **Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations.** Free Radical Biology & Medicine 52, 1-6.

Kaminsky, V.O., and Zhivotovsky, B. (2014). **Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis.** Antioxidants & Redox Signaling 21, 86-102.

Kaufman, S. (1963). **The Structure of the Phenylalanine-Hydroxylation Cofactor.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 50, 1085-1093.

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

La Monaca, E., and Fodale, V. (2012). **Effects of anesthetics on mitochondrial signaling and function.** Current drug safety 7, 126-139.

Lammardo, A.M., Robert, M., Rocha, J.C., van Rijn, M., Ahring, K., Belanger-Quintana, A., MacDonald, A., Dokoupil, K., Ozel, H.G., Goyens, P., et al. (2013). **Main issues in micronutrient supplementation in phenylketonuria.** Molecular Genetics And Metabolism 110 Suppl, S1-5.

Langenbeck, U., Behbehani, A., and Mench-Hoinowski, A. (1992). **A synopsis of the unconjugated acidic transamination metabolites of phenylalanine in phenylketonuria.** Journal of Inherited Metabolic Disease 15, 136-144.

- Lawler, J.M., Barnes, W.S., Wu, G., Song, W., and Demaree, S. (2002). **Direct antioxidant properties of creatine.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 47-52.
- Lichter-Konecki, U., Konecki, D.S., DiLella, A.G., Brayton, K., Marvit, J., Hahn, T.M., Trefz, F.K., and Woo, S.L. (1988). **Phenylalanine hydroxylase deficiency caused by a single base substitution in an exon of the human phenylalanine hydroxylase gene.** *Biochemistry* 27, 2881-2885.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Mak, C.M., Lee, H.C., Chan, A.Y., and Lam, C.W. (2013). **Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update.** *Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences* 50, 142-162.
- Marklund, S.L. (1985). **Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis.** *FEBS letters* 184, 237-239.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., and Giovannini, C. (2005). **Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes.** *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 577-586.
- Mattevi, A., Bolognesi, M., and Valentini, G. (1996). **The allosteric regulation of pyruvate kinase.** *FEBS letters* 389, 15-19.
- McGee, M.M., Greengard, O., and Knox, W.E. (1972). **Liver phenylalanine hydroxylase activity in relation to blood concentrations of tyrosine and phenylalanine in the rat.** *The Biochemical Journal* 127, 675-680.
- Mira, N. V. M., Marquez, U. M. L. **Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria.** *Rev Saúde Pública.* 2000; 34:86-96.
- Monteiro, L.T.B., and Cândido, L.M.B. (2006). **Phenylketonuria in Brazil: evolution and cases.** *Rev Nutr* 19.
- Muchamore, I., Morphett, L., and Barlow-Stewart, K. (2006). **Exploring existing and deliberated community perspectives of newborn screening: informing the development**

of state and national policy standards in newborn screening and the use of dried blood spots. Australia and New Zealand health policy 3, 14.

Ney, D.M., Gleason, S.T., van Calcar, S.C., MacLeod, E.L., Nelson, K.L., Etzel, M.R., Rice, G.M., and Wolff, J.A. (2009). **Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey.** Journal of Inherited Metabolic Disease 32, 32-39.

Rieger, E., de Franceschi, I.D., Preissler, T., and Wannmacher, C.M.D. (2017). **Neuroprotective Effect of Creatine and Pyruvate on Enzyme Activities of Phosphoryl Transfer Network and Oxidative Stress Alterations Caused by Leucine Administration in Wistar Rats.** Neurotoxicity Research.

Rocha, J.C., and Martins, M.J. (2012). **Oxidative stress in phenylketonuria: future directions.** Journal of Inherited Metabolic Disease 35, 381-398.

Rojo, M., Hovius, R., Demel, R., Wallimann, T., Eppenberger, H.M., and Nicolay, K. (1991). **Interaction of mitochondrial creatine kinase with model membranes. A monolayer study.** FEBS letters 281, 123-129.

Ryu JK1, C.H., McLarnon JG. (2006). **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 141, 1835-1848.

Sartini, S., Sestili, P., Colombo, E., Martinelli, C., Bartolini, F., Ciuffoli, S., Lattanzi, D., Sisti, D., and Cuppini, R. (2012). **Creatine affects in vitro electrophysiological maturation of neuroblasts and protects them from oxidative stress.** Journal of Neuroscience Research 90, 435-446.

Schuck, P.F., Malgarin, F., Cararo, J.H., Cardoso, F., Streck, E.L., and Ferreira, G.C. (2015). **Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations.** Aging and Disease 6, 390-399.

Scriver, C.P., William S. Sly, Barton Childs, Arthur L. Beaudet, David Valle, Kenneth W. Kinzler, Bert Vogelstein (2001). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 8th edition edn (New York: McGraw-Hill Professional).

- Smith, C., Marks, A.D., and Lieberman, M. (2007). **Marks' Basic Medical Biochemistry: a Clinical Approach** (Lippincott Williams e Wilkins).
- Smith, I., and Lee, P. (2000). **Inborn Metabolism Disease**, 3 edn.
- Sohal, R.S. (2002). **Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process**. *Free Radical Biology & Medicine* 33, 37-44.
- Sokoloff, L. (1993). **Function-related changes in energy metabolism in the nervous system: localization and mechanisms**. *The Keio Journal of Medicine* 42, 95-103.
- Stockler, S., Holzbach, U., Hanefeld, F., Marquardt, I., Helms, G., Requart, M., Hanicke, W., and Frahm, J. (1994). **Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism**. *Pediatric Research* 36, 409-413.
- Surtees, R., and Blau, N. (2000). **The neurochemistry of phenylketonuria**. *European Journal of Pediatrics* 159 Suppl 2, S109-113.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease**. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer**. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1-40.
- van Spronsen, F.J. (2010). **Phenylketonuria: a 21st century perspective**. *Nature Reviews Endocrinology* 6, 509-514.
- Villasana, D., Butler, I.J., Williams, J.C., and Roongta, S.M. (1989). **Neurological deterioration in adult phenylketonuria**. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 12, 451-457.
- Wallimann, T. (1994). **Bioenergetics. Dissecting the role of creatine kinase**. *Current Biology* : CB 4, 42-46.
- Wendel, A. (1981). **Glutathione peroxidase**. *Methods in Enzymology* 77, 325-333.
- Williams, R.A., Mamotte, C.D., and Burnett, J.R. (2008). **Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism**. *The Clinical Biochemistry Reviews* 29, 31-41.

Womack, M., and Rose, W.C. (1934). **Feeding experiments with mixtures of highly purified amino acids: Vi. The relation of phenylalanine and tyrosine to growth.** *Jornal of Biology Chemistry* 107, 449-458.

Wyss, M., Smeitink, J., Wevers, R.A., and Wallimann, T. (1992). **Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism.** *Biochimica Et Biophysica Acta* 1102, 119-166.

Yamada, A., Yamamoto, K., Imamoto, N., Momosaki, S., Hosoi, R., Yamaguchi, M., and Inoue, O. (2009). **Lactate is an alternative energy fuel to glucose in neurons under anesthesia.** *Neuroreport* 20, 1538-1542.

Yon, J.H., Daniel-Johnson, J., Carter, L.B., and Jevtovic-Todorovic, V. (2005). **Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways.** *Neuroscience* 135, 815-827.